

dc\_206\_11

**MTA Doktori Értekezés**

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

**Dr. Igaz Péter PhD**

**Budapest**

**2011**

## Tartalomjegyzék

|              |                                                                                              |          |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
|              | Rövidítések jegyzéke                                                                         | 5. old.  |
|              | A gyakran használt génszimbólumok és fehérjénevek rövidítéseinek kifejtése                   | 8. old.  |
| 1.           | BEVEZETÉS                                                                                    | 11. old. |
| 1.1          | Endokrin daganatok                                                                           | 11. old. |
| 1.2.         | Immun-neuroendokrin kölcsönhatások                                                           | 13. old. |
| 1.3.         | Módszertani jelentőség                                                                       | 14. old. |
| 2.           | IRODALMI ÁTTEKINTÉS                                                                          | 16. old. |
| 2.1.         | Endokrin daganatok                                                                           | 16. old. |
| 2.1.1.       | A mellékvesekéreg daganatai                                                                  | 16. old. |
| 2.1.1.1.     | A mellékvesekéreg-daganatok patogenezise                                                     | 17. old. |
| 2.1.1.2.     | A funkcionális genomikai/bioinformatikai vizsgálatok eredményei mellékvesekéreg-daganatokban | 22. old. |
| 2.1.2.       | A mellékvesevelő daganatai (phaeochromocytoma)                                               | 24. old. |
| 2.1.2.1.     | A phaeochromocytomák patogenezise                                                            | 25. old. |
| 2.1.2.1.1.   | Phaeochromocytoma kialakulására hajlamosító öröklődő betegségek                              | 26. old. |
| 2.1.2.1.1.1. | A multiplex endokrin neoplasia 2-es típusa (MEN2)                                            | 26. old. |
| 2.1.2.1.1.2. | von Hippel-Lindau szindróma (VHL)                                                            | 27. old. |
| 2.1.2.1.1.3. | A neurofibromatosis 1-es típusa (NF1)                                                        | 27. old. |
| 2.1.2.1.1.4. | Öröklődő paraganglioma szindrómák (PGL1-4)                                                   | 28. old. |
| 2.1.2.1.2.   | A génexpressziós vizsgálatok eredményei phaeochromocytomákban                                | 29. old. |
| 2.2.         | A hisztamin                                                                                  | 32. old. |
| 2.2.1.       | A hisztamin és a mellékvese                                                                  | 33. old. |
| 2.3.         | Az immun-neuroendokrin kölcsönhatások főbb jellemzői                                         | 35. old. |
| 2.3.1.       | A hypothalamikus GnRH-neuronok                                                               | 36. old. |
| 2.3.2.       | Az interleukin-1 (IL-1) és interleukin-6 (IL-6) citokinek családja                           | 38. old. |
| 2.4.         | A mikroRNS-ek (miRNS, miR)                                                                   | 40. old. |
| 2.4.1.       | A mikroRNS-ek génjei és képződésük folyamata                                                 | 40. old. |
| 2.4.2.       | A mikroRNS-ek nevezéktana                                                                    | 42. old. |
| 2.4.3.       | A mikroRNS-ek hatásmódja                                                                     | 42. old. |
| 2.4.4.       | A mikroRNS-ek élettani és kórélettani jelentősége                                            | 43. old. |
| 2.4.5.       | A mikroRNS-ek daganatokban játszott szerepe                                                  | 43. old. |
| 2.5.         | Rövid módszertani kitekintő: a bioinformatikai vizsgálatok                                   | 46. old. |
| 2.5.1.       | A szabadon elérhető microarray adatbázisok                                                   | 47. old. |
| 2.5.2.       | Az mRNS microarray adatok statisztikai elemzése                                              | 47. old. |
| 2.5.3.       | Speciális bioinformatikai módszerek a microarray adatok további elemzésére                   | 48. old. |
| 2.5.3.1.     | Hálózat- és útvonalelemzés (Ingenuity Pathway Analysis (IPA))                                | 48. old. |
| 2.5.3.2.     | A géncsoport dúsulás vizsgálata (Gene Set Enrichment Analysis (GSEA))                        | 50. old. |
| 2.5.4.       | A mikroRNS-ek potenciális célmolekuláinak azonosítása bioinformatikai módszerekkel           | 51. old. |
| 2.5.5.       | Szekvenciavariánsok <i>in silico</i> azonosítása                                             | 52. old. |

|            |                                                                                                                                                         |          |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|
| 3.         | CÉLKITŰZÉSEK                                                                                                                                            | 54. old. |
| 4.         | BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK                                                                                                                           | 56. old. |
| 4.1.       | Betegek és szövetminták                                                                                                                                 | 56. old. |
| 4.2.       | Sejttenyészetek és <i>in vitro</i> kezelések                                                                                                            | 58. old. |
| 4.3.       | Molekuláris genetikai és molekuláris biológiai vizsgálatok                                                                                              | 59. old. |
| 4.3.1.     | A mikroRNS-ek kifejeződésének vizsgálata                                                                                                                | 59. old. |
| 4.3.2.     | A mikroRNS expressziós eredmények validálása qRT-PCR módszerrel                                                                                         | 62. old. |
| 4.3.3.     | MikroRNS biomarkerek azonosítása                                                                                                                        | 63. old. |
| 4.3.4.     | Teljes genom génexpressziós vizsgálatok                                                                                                                 | 64. old. |
| 4.3.5.     | Komparatív genom hibridizáció (CGH)                                                                                                                     | 65. old. |
| 4.3.6.     | Egyes génekre vonatkozó génexpressziós (qRT-PCR) vizsgálatok                                                                                            | 65. old. |
| 4.3.6.1.   | Mellékvesekéreg-daganatok                                                                                                                               | 65. old. |
| 4.3.6.2.   | Hypothalamikus GnRH-neuronok                                                                                                                            | 66. old. |
| 4.3.7.     | DNS-szekvenálás és mutációanalízis                                                                                                                      | 66. old. |
| 4.3.8.     | Fehérjeexpressziós vizsgálatok és a hisztamintartalom mérése                                                                                            | 68. old. |
| 4.3.9.     | Bioinformatikai vizsgálatok                                                                                                                             | 69. old. |
| 4.3.9.1.   | A mikroRNS-ek célpontjainak, biológiai jelentőségének vizsgálata                                                                                        | 69. old. |
| 4.3.9.1.1  | A szignifikáns expressziós eltérést mutató mikroRNS-ek potenciális cél mRNS-einek azonosítása bioinformatikai módszerekkel mellékvesekéreg-daganatokban | 69. old. |
| 4.3.9.1.2. | A biológiailag releváns cél mRNS-ek bioinformatikai módszerekkel történő azonosítása mellékvesekéreg-daganatokban – SZÖVETSPECIFIKUS TARGET PREDIKCIÓ   | 70. old. |
| 4.3.9.1.3. | Útvonalelemzés                                                                                                                                          | 72. old. |
| 4.3.9.2.   | mRNS microarray és citogenetikai adatok funkcionális genomikai metaanalízise mellékvesekéreg-daganatokban                                               | 75. old. |
| 4.3.9.2.1. | A felhasznált microarray adatok                                                                                                                         | 75. old. |
| 4.3.9.2.2. | A génexpressziós adatok statisztikai elemzése és a Géncsoport Dúsulási Vizsgálat (GSEA)                                                                 | 77. old. |
| 4.3.9.2.3. | A szabadon elérhető génexpressziós (mRNS) microarray adatok és az irodalomban közölt citogenetikai eltérések korrelációja                               | 79. old. |
| 4.3.9.2.4. | Az azonos mintákon, párhuzamosan végzett génexpressziós (mRNS) microarray és CGH vizsgálatok eredményeinek korrelációja                                 | 79. old. |
| 4.3.9.3.   | Szekvenciavariánsok <i>in silico</i> keresése                                                                                                           | 80. old. |
| 5.         | EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS                                                                                                                               | 81. old. |
| 5.1.       | Mellékvesekéreg-daganatok mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálata                                                                                  | 81. old. |
| 5.1.1.     | A mellékvesekéreg rosszindulatúságát jelző mikroRNS biomarkerek azonosítása                                                                             | 86. old. |
| 5.1.2.     | Összevetés más munkacsoportok eredményeivel                                                                                                             | 88. old. |
| 5.2.       | Új módszer kifejlesztése a mikroRNS-ek cél mRNS-einek azonosítására (szövetspecifikus target predikció) és útvonalelemzés mellékvesekéreg-daganatokban  | 91. old. |
| 5.2.1.     | Teljes genom génexpressziós vizsgálatok                                                                                                                 | 91. old. |

|            |                                                                                                                                                              |           |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2.2.     | A cél mRNS-ek körének szűkítése a teljes genom génexpressziós eredmények felhasználásával                                                                    | 92. old.  |
| 5.2.3.     | Útvonalelemzés a szövetspecifikus target predikció eredményei alapján                                                                                        | 94. old.  |
| 5.3.       | Phaeochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálata                                                                                              | 97. old.  |
| 5.3.1.     | A szignifikánsan változó mikroRNS-ek mRNS célpontjainak <i>in silico</i> azonosítása                                                                         | 104. old. |
| 5.3.2.     | Útvonalelemzés az <i>in silico</i> azonosított mikroRNS-ek patogenetikai jelentőségének vizsgálatára                                                         | 105. old. |
| 5.4.       | Funkcionális genomikai metaanalízis a szakirodalomban eddig közölt génexpressziós és CGH eredmények, valamint saját eredményeink felhasználásával            | 109. old. |
| 5.4.1.     | Párhuzamos mRNS expressziós microarray és komparatív genom hibridizáció (CGH) ugyanazon mellékvesekéreg-daganat mintákon                                     | 111. old. |
| 5.4.2.     | Útvonalelemzés a mellékvesekéreg-carcinoma patogenezisében alapvető molekuláris útvonalak azonosítása céljából                                               | 113. old. |
| 5.4.2.1.   | A sejtciklus G1/S és G2/M átmenetének eltérései mellékvesekéreg-carcinomában                                                                                 | 113. old. |
| 5.4.2.2.   | A c-myc központi szerepe a mellékvesekéreg-carcinoma patogenezisében. Hipotézis.                                                                             | 116. old. |
| 5.4.2.3.   | A retinsav jelátviteli út                                                                                                                                    | 118. old. |
| 5.4.2.3.1. | Koleszterin és lipid anyagcsere: az RXR/LXR és az RXR/PPARG jelátviteli utak                                                                                 | 120. old. |
| 5.4.2.3.2. | Lipopoliszacharid receptor (Toll-like receptor 4 (TLR4)) út                                                                                                  | 121. old. |
| 5.4.2.4.   | A komplementrendszer és az antigénprezentáció eltérései                                                                                                      | 122. old. |
| 5.5.       | A hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebomlásában szerepet játszó gének és fehérjék kifejeződése az egészséges és daganatos mellékvesekéregben         | 126. old. |
| 5.6.       | <i>In silico</i> genomikai vizsgálatok szekvenciavariánsok felderítésére a hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebontásában szereplő fehérjék génjeiben | 133. old. |
| 5.7.       | <i>In silico</i> genomikai vizsgálatok a szteroidhormon bioszintézis és metabolizmus enzimei és a glükokortikoidreceptor génjeiben                           | 137. old. |
| 5.7.1.     | Szteroidhormon bioszintézis és metabolizmus                                                                                                                  | 137. old. |
| 5.7.2.     | Glükokortikoidreceptor (GR)                                                                                                                                  | 142. old. |
| 5.8.       | Citokinek és receptoraik kifejeződésének vizsgálata hypothalamikus GnRH-neuronokban: az oncostatin M (OSM) hatásai                                           | 146. old. |
| 5.9.       | Multiplex endokrin neoplasia 2A típusában (MEN2A) szenvedő betegek vizsgálata                                                                                | 153. old. |
| 5.9.1.     | A SE ÁOK II. Belgyógyászati Klinikán elsőként igazolt MEN2A család esete                                                                                     | 153. old. |
| 5.9.2.     | Új klinikai fenotípusok MEN2A szindrómában                                                                                                                   | 155. old. |
| 5.9.2.1.   | Phaeochromocytoma előfordulása a RET protoonkogén 10-es exon 609-es kodon mutációja esetén                                                                   | 155. old. |
| 5.9.2.2.   | Bilaterális phaeochromocytoma és hyperparathyreosis előfordulása                                                                                             | 157. old. |

|       |                                                                                                                                                      |           |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
|       | medulláris pajzsmirigyrák nélkül MEN2A szindrómában                                                                                                  |           |
| 5.10. | <i>In silico</i> genomikai vizsgálatok a multiplex endokrin neoplasia szindrómák (MEN1, MEN2) génjeiben előforduló szekvenciavariánsok felderítésére | 161. old. |
| 6.    | ÖSSZEFOGLALÁS                                                                                                                                        | 163. old. |
| 6.1.  | Vizsgálataim eredményeinek összefoglalása, új megállapítások                                                                                         | 163. old. |
| 6.2.  | Eredményeim potenciális klinikai-gyakorlati hasznosítási lehetőségei                                                                                 | 167. old. |
| 7.    | Az értekezést megalapozó közlemények listája:                                                                                                        | 168. old. |
| 7.1.  | Idegen nyelvű folyóiratcikkek ΣIF: 40,04                                                                                                             | 168. old. |
| 7.2.  | Magyar nyelvű folyóiratcikkek                                                                                                                        | 171. old. |
| 7.3.  | Az értekezéshez kapcsolódó szerkesztőségi hozzászólások                                                                                              | 172. old. |
| 7.4.  | Az értekezéshez kapcsolódó könyvfejezetek                                                                                                            | 173. old. |
| 8.    | Az értekezésben nem szereplő folyóiratcikkek listája                                                                                                 | 175. old. |
| 9.    | Scientometria mutatók                                                                                                                                | 183. old. |
| 10.   | Az értekezésben hivatkozott közlemények                                                                                                              | 184. old. |
| 11.   | Köszönetnyilvánítás                                                                                                                                  | 215. old. |

## Rövidítések jegyzéke:

**A:** adenin

**ACA:** mellékvesekéreg (adrenocorticalis) adenoma

**ACC:** mellékvesekéreg (adrenocorticalis) carcinoma

**ANOVA:** variancia-analízis (Analysis of Variance)

**APA:** aldosterontermelő mellékvesekéreg-adenoma

**AUC:** görbe alatti terület (Area Under the Curve)

**bp:** bázispár

**C:** citozin

**cAMP:** ciklikus adenzin-monofoszfát

**cDNS:** komplementer dezoxiribonukleinsav

**CGH:** komparatív genom hibridizáció

**CPA:** kortizoltermelő mellékvesekéreg-adenoma (Cushing-adenoma)

**CT:** cycle threshold (cikluszám küszöb polimeráz láncreakcióban)

**dCT:** normalizált cycle threshold (delta cycle threshold)

**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)

**G:** guanin

**GEO:** Gene Expression Omnibus

**GO:** Gene Ontology

**GSEA:** Gene Set Enrichment Analysis/Géncsoport dúsulás vizsgálata

**IA:** hormonálisan inaktív mellékvesekéreg-adenoma

**IL:** interleukin

**IL-1Rap:** IL-1 receptor járulékos fehérje/IL-1 receptor accessory protein

**IPA:** Ingenuity Pathway Analysis

**LEA:** Leading Edge Analysis/Vezetőél Analízis

**LOH:** heterozigócia elvesztése (loss of heterozigosity)

**LPS:** lipopoliszacharid

**MAPK:** mitogén aktiválta protein kináz

**MEN1:** multiplex endokrin neoplasia 1-es típusa

**MEN2:** multiplex endokrin neoplasia 2-es típusa

**mRNS:** hírvivő ribonukleinsav (messenger RNA)

**miRISC:** mikroRNS indukálta csendesítő komplex (miRNA induced silencing complex)

**miRNS, miR:** mikroRNS

**MTC:** medulláris pajzsmirigy carcinoma

**NA:** normális (ép) mellékvese

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**NF1:** 1-es típusú neurofibromatosis

**NMDA:** N-metil-D-aszpartát

**nt:** nukleotid

**PCR:** polimeráz láncreakció

**PGL:** paraganglioma

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

**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 (hatásfokmérő karakterisztika)

**RT:** reverz transzkripció

**SB:** sporadikus benignus phaeochromocytoma

**SD:** standard deviáció

**SEM:** átlag szórása (standard error of mean)

**siRNS:** kis interferáló RNS (small interfering RNA)

**SNP:** egy nukleotidot érintő polimorfizmus (single nucleotide polymorphism)

**SR:** sporadikus recidíváló phaeochromocytoma

**SSCP:** single strand conformational polymorphism (egyláncú DNS konformációs vizsgálat)

**TGS:** Total Gene Signal/Teljes Gén Sznál

**TLDA:** TaqMan Low Density Array

# dc\_206\_11

**U:** uracil

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

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

**VHL:** von Hippel-Lindau szindróma

**WHO:** World Health Organization

**A gyakran használt génszimbólumok és fehérjénevek rövidítéseinek kifejtése:**

**ACTH:** adrenokortikotropin

**AKR1B1:** aldo-keto reduktáz család 1/B1

**ALDH:** aldehyd-dehidrogenáz

**$\beta 2m$ :**  $\beta 2$  mikroglobulin

**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)

**C-MYC:** v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog

**CNTF:** ciliáris neurotrofikus faktor

**CYP11A1:** p450 oldallánchasító enzim

**CYP11B1:** 11 $\beta$ -hidroxiláz 1 (kortizol-szintáz)

**CYP11B2:** 11 $\beta$ -hidroxiláz 2 (aldoszteron-szintáz)

**CYP17:** 17 $\alpha$ -hidroxiláz/17-20 liáz

**CYP19:** aromatáz

**CYP21B:** 21-hidroxiláz

**DAO:** diamin-oxidáz

**DHEA-ST:** dehidroepiandroszteron szulfotranszferáz

**Egr-1:** early growth response-1 – korai növekedési válasz 1 gén

**FGF:** fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)

**FSH:** follikulus stimuláló hormon

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

**GAPDH:** glicerinaldehyd-3 foszfát dehidrogenáz

**GnRH:** gonadotropin releasing hormon

**GR:** glükokortikoidreceptor

**GSK-3:** glikogén-szintáz kináz 3 $\beta$

## dc\_206\_11

**HDC:** hisztidin-dekarboxiláz

**HIF1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ :** hypoxia-indukált faktor 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1, 2 alpha subunit)

**HIF1AN:** hypoxia-indukált faktor 1, alpha alegység inhibitor (hypoxia inducible factor 1, alpha subunit inhibitor)

**HNMT:** hisztamin N-metil transzferáz

**HRH:** hisztaminreceptor

**HSD3B1 és HSD3B2:** 3 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 és 2 izotípusa

**HSD11B1 és HSD11B2:** 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 és 2

**HSD17B1-3:** 17 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1, 2 és 3

**IGF:** inzulinszerű növekedési faktor (insulin like growth factor)

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

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

**IGFBP-2, 5:** IGF-binding protein 2, 5 (IGF-kötő fehérje 2-es, 5-ös típus)

**IL-1RN:** IL-1 receptor antagonist

**LH:** luteinizáló hormon

**LIF:** leukemia inhibiting factor/leukémia gátló faktor

**LXR:** liver X receptor

**Max:** myc-associated X gén

**MHC:** fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)

**MKP-1:** MAPK phosphatase 1 – mitogén aktiválta protein kináz foszfátáz 1

**mTOR:** mammalian target of rapamycin

**MTPN:** myotrophin

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

**NF1:** neurofibromin 1

**OSM:** oncostatin M

**OSMR $\beta$ :** oncostatin M receptor  $\beta$

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

**PPARG:** peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor gamma

**PRKAR1A:** cAMP-dependens protein-kináz RI $\alpha$  inhibitor alegységet kódoló gén

**pVHL:** von Hippel-Lindau fehérje (von Hippel-Lindau tumor suppressor protein)

**RAR:** Retinsav receptor

**RET:** rearranged during transfection

## dc\_206\_11

**RXR:** retinoid X receptor; **RXRA:** RXR-alfa; **RXRB:** RXR-béta

**SDHB, C, D:** szukcinát dehidrogenáz B, C, D alegységet kódoló gének (succinate dehydrogenase complex, subunit B, C, D iron sulfur)

**SDH5 (SDHAF2):** succinate dehydrogenase complex assembly factor 2

**SRD5A1 és SRD5A2:** szteroid 5 $\alpha$ -reduktáz 1 és 2

**SRD5B1:** szteroid 5 $\beta$ -reduktáz

**TGF- $\beta$ :** transzformáló növekedési faktor  $\beta$

**TLR:** Toll like receptor/Toll-szerű receptor

**TNF- $\alpha$ :** tumor nekrosis faktor  $\alpha$

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

**TP53:** tumor protein p53 (*p53*)

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

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

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

**WNT:** wingless-type MMTV integration site family  
**CDKN1C:** ciklin-dependens kináz inhibitor 1C

**XPO1:** exportin 1

## 1. BEVEZETÉS

### 1.1. Endokrin daganatok

A daganatok patogenezeise 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 [1].** 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 [2].** A mellékvese daganatainak 5-8 %-a **phaeochromocytoma**, amely katekolamintermelése következtében **életveszélyes szövődményeket** (stroke, myocardialis infarctus) **okozhat**. 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 [3, 4].

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 patogenezeise csak kevésbé ismert [1, 5].

Az MTA doktori értekezésem alapját képező munkák hangsúlyos részét képezik a mellékvese-daganatok mikroRNS expresszió mintázatának vizsgálatai. A génexpresszió poszttranszkripció 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 [6]. 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 [7].

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-daganatok mikroRNS expressziós mintázata terén elsőként, a phaeochromocytomák körében a világon az első 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) [3, 8]. Bár e daganatszindrómák klinikai képe jellegzetes, **egyes esetekben egyedi 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 [3, 4]. 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 recidiva 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 [9]. 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 homeosztatisztikus rendszer számos szinten kapcsolódik egymáshoz. E kapcsolatok hátterében részben a két rendszer mediátorainak 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 (HPA) rendszer, ahol a gyulladásos citokinek (tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6) hatására a rendszer aktiválódik és a mellékvesekéreg glükokortikoid termelése megindul [10-12]. A citokinek számos endokrin folyamatot befolyásolnak, így a reproduktív szabályozás több szintjét is [13], 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, emlőrák, vastagbélrák) patogenezisében szerepet játszik [14-16], azonban a **mellékvesekéreg daganataiban betöltött jelentőségére vizsgálataink**

**szolgáltattak 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 hátterét a microarray (chip) metodika képezi. Lehetséges a kromoszómaeltérések bioinformatikai vizsgálata (komparatív genom hibridizáció (CGH)) is számos más alkalmazási lehetőség mellett [17].

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 daganatok elkülönítését lehetővé tévő 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 hátterében 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 [18]. *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**) [19]. Ezek azonban olyan nagy mennyiségű potenciális cél mRNS-t adnak ki, amelyek közül a biológiailag releváns mRNS-ek kiválasztása igen nehéz. E probléma megoldásaként **egy új, párhuzamos mRNS expresszió meghatározáson alapuló, szövetspecifikus predikciós módszert dolgoztunk ki.**

A molekuláris biológiai szakirodalom általános problémája, hogy csak az angol szakkifejezések töredékének van használható magyar megfelelője. Az értekezésben megpróbáltam az angol szakkifejezések egy részét magyar szakszóval pótolni, de ez sajnos nem minden esetben volt lehetséges.

## 2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Endokrin daganatok

#### 2.1.1. A mellékvesekéreg daganatai

A mellékvesekéreg daganatai teszik ki a mellékvese sporadikus daganatainak döntő részét. A mellékvesekéreg daganatainak többsége hormonálisan inaktív jóindulatú daganat. A hormontermelő mellékvesekéreg-daganatok ritkák, de súlyos klinikai következményekkel járnak. A kortizoltúlermelés következtében kialakuló Cushing-szindrómát leggyakrabban elhízás, magas vérnyomás, cukorbetegség, csontritkulás, rossz sebgyógyulási hajlam, fokozott fertőzési fogékonyság jellemzi. Az aldosteron túlermelése súlyos hypertóniát, hypokalaemiát okozhat és a szív-érrendszeri morbiditás és mortalitás számottevő növekedésével jár [20].

A mellékvesekéreg-carcinoma (ACC) ritka daganat (incidencia: 0.5-2/millió/év). Prognózisa rossz, különösen az előrehaladott stádiumokban (invazív vagy áttétképző daganat, McFarlane III-IV stádium), ahol öt éves túlélése 35 % alatt van [2]. E daganatok körülbelül 50 %-a hormontermelő. Leggyakrabban kortizol, valamint androgén elválasztása fordul elő, utóbbi nőben hirsutismus, virilizáció megjelenését eredményezheti. A sebészi kezeléstől eltekintve, terápiás lehetőségeink korlátozottak. A mellékvesekéreg-carcinoma kemoterápiára kevésbé érzékeny, citosztatikus kezelésében elsősorban az etopozid, ciszplatin, doxorubicin és streptozotocin alkalmazásáról vannak adatok. Az adjuváns kezelés fontos részét képezi a per os szedhető mitotán. Bár már több mint 50 éve alkalmazzák a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében, a mitotán pontos hatásmechanizmusa nem ismert. A tumorágy besugárzása egyes adatok szerint a daganat kezelésében hasznos lehet, valamint a csontáttétek kezelésében is szóbajön, de összességében a daganat sugárkezelésre kevésbé érzékeny [2, 9].

A daganatképződés mechanizmusainak tanulmányozása hozzásegíthet új, gyógyszeresen potenciálisan befolyásolható patogenetikai utak feltárásához.

A mellékvesekéreg-daganatok szövettani vizsgálata nagy gyakorlatot igényel. A malignitás megállapításában legelterjedtebben az ún. Weiss pontozási skálát használják, ami kilenc szövettani jellemzőt vesz figyelembe és így az összpontszám 0-9 között változhat. Míg az 1-es és 2-es pontszám a jóindulatúságra utal, 4 feletti pontszám rosszindulatúságot jelez.

A 3-as pontszám megítélése bizonytalan. E módszer meglehetősen szubjektív és különböző vizsgálók, sőt egyes tanulmányok szerint még ugyanazon vizsgálók különböző időpontban ugyanazon daganatokon tett megfigyelései között is jelentősek a különbségek [2, 21]. A Weiss pontozási skála mellett a gyakorlatban a Ki-67 proliferációs marker és a ciklin E immunhisztokémiai vizsgálatát alkalmazzák, de a rosszindulatúságot jelző értékeikről megoszlanak a vélemények [2, 22]. Tekintettel arra, hogy a rosszindulatúság megállapítása nehéz, nagy igény lenne új, a malignitást megbízhatóan jelző molekuláris markerek azonosítására.

A nagy áteresztőképességű bioinformatikai vizsgálatok mind a patogenezis megismerésben, új biomarkerek és potenciális gyógyszeres támadáspontok azonosításában hasznosak lehetnek.

#### **2.1.1.1. A mellékvesekéreg-daganatok patogenezise**

Az utóbbi években a mellékvesekéreg-daganatok patogenezisében több fontos patomechanizmust azonosítottak. A legtöbb adat a mellékvesekéreg-carcinoma patogenezisére vonatkozik. E folyamatok megismerésében nagy jelentőségűek a ritka, monogén, mellékvesekéreg-daganatra hajlamosító daganatszindrómák, mivel az ezekben szereplő kórfolyamatok többségét a sporadikus daganatokban is megtalálták.

**A monogén daganatszindrómák mind jó-, mind rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok kialakulására hajlamosíthatnak.** Elsősorban **jóindulatú mellékvesekéreg-daganatok kialakulására hajlamosít a multiplex endokrin neoplasia 1-es típusa (MEN1), a Carney-komplex és a McCune-Albright-szindróma, míg a Li-Fraumeni-szindróma, a Beckwith-Wiedemann-szindróma mellékvesekéreg-carcinomával társul** [1, 5]. A familiáris adenomatosus polyposisban a mellékvesekéreg daganatai ritkák, és mind jó-, mind rosszindulatú daganat előfordulhat [5, 23]. A nem öröklődő McCune-Albright- szindróma kivételével e daganatszindrómák autoszomális domináns öröklésmentet követnek.

A MEN1 szindrómát hyperparathyreosis, az endokrin pancreas és a hypophysis daganatainak előfordulása jellemzi elsősorban, de az érintettek 25-40 %-ában mellékvesekéreg-daganatok is előfordulnak. A MEN1-ben előforduló mellékvesekéreg-daganatok döntően jóindulatú, hormonálisan inaktív kéregadenomák [24]. Patogenezisében a *MEN1* tumorsuppresszor gén mutációi meghatározóak. A *MEN1* gén 10 exonból áll és a mutációk a génben bárhol előfordulhatnak. A *MEN1* gén termékét menin fehérjének nevezik.

E fehérje többek között a sejtciklus szabályozásában fontos fehérjével és a transzformáló növekedési faktor béta (TGF- $\beta$ ) jelátvitel úttal áll kapcsolatban [25]. A *MEN1* gén mutációi a rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokban nagyon ritkák, ugyanakkor a *MEN1* gént hordozó 11q13 kromoszómális régió az ép allél elvesztése (LOH, a heterozigócia elvesztése, loss of heterozygosity) a daganatok 90%-ában kimutatható [5]. Több tumorsuppresszor aktivitású gén esetén is megfigyelhető, hogy a gének szomatikus mutációi és az őket hordozó kromoszómaregiók heterozigóciájának elvesztése számos esetben nem mutat párhuzamot. E jelenség hátterében egyrészt az adott kromoszómaregió elhelyezkedő más gének, illetve epigenetikai szabályozó területek egyidejű elvesztése, illetve a kromoszómaregió vesztés sokkal drasztikusabb, több gént befolyásoló és a sejtműködést kifejezettebben megzavaró hatása játszhat szerepet.

A rendkívül ritka Carney-komplex számos daganat kialakulására hajlamosít: agyalapi mirigy adenoma, pajzsmirigydaganat, hererák, pitvari myxoma stb. A mellékvesekéregben Cushing-szindrómát okozó primer pigmentált noduláris adrenális hyperplasia (PPNAD: primary pigmented nodular adrenal disease) fordul elő. A PPNAD a Cushing-szindróma ritka oka, azonban a Carney-komplexben észlelt leggyakoribb endokrin eltérés (az esetek kb. 25 %-ban), ill. a PPNAD esetek jelentős részének hátterében Carney-komplex áll. Klinikailag a PPNAD-ra leginkább fiatal korban (30 éves kor alatt) jelentkező Cushing-szindróma kialakulása jellemző, amely általában ciklikus formában jelentkezik. Az esetek 45-65 %-ában a Carney-komplex hátterében a **protein kináz A** (PKA)  $R1\alpha$  (*PRKAR1A*) alegységét kódoló gén mutációit azonosították. E gén a 17-es kromoszóma 17q22-24-es régiójában található. A PKA egy valamennyi sejtben előforduló szerin-treonin kináz, amely a sejtproliferáció és a kromoszómastabilitás szabályozásában meghatározó jelentőségű. A PKA a ciklikus adenosin monofoszfát (cAMP) szabályozása alatt áll [26, 27].

A McCune-Albright-szindrómában ritkán Cushing-szindrómát okozó mellékvesekéreg-adenoma és -hyperplasia fordul elő [28]. E betegség is a monogénes kórképek közé tartozik, hiszen hátterében a **G-fehérjék alfa alegységét** ( $G\alpha$ ) kódoló *GNAS1* gén egyetlen kodonját (201-es) érintő mutációt írtak le. Bár monogénes, mégsem öröklődik, mivel a *GNAS1* csírasejtes mutációi az élettel összeegyeztethetetlennek tűnnek. A McCune-Albright-szindrómában előforduló, több szervet érintő eltéréseket (csontok, mellékvesekéreg agyalapi mirigy stb.) a gén embrionális stádiumban bekövetkező mutációival magyarázzák. A *GNAS1* McCune-Albright-szindrómára jellemző mutációja a kódolt fehérje működését

serkentő (gain-of-function) hatású, ami az adenilát-cikláz hormonfüggetlen aktiválódását eredményezi a GTP-áz gátlása révén. Ennek következtében a cAMP intracelluláris koncentrációja megnő, ami több jelátviteli utat aktiválhat [28].

Mindezek alapján a döntően benignus mellékvesekéreg-daganatokra hajlamosító Carney-komplex és a McCune-Albright-szindróma patogenezisében is a **PKA-cAMP jelátviteli út** meghatározó szerepet játszik. Ezzel szemben a mellékvesekéreg-carcinoma kialakulásában az ACTH-adenilát-cikláz-cAMP jelátviteli út szerepe nem tűnik központi jelentőségűnek. Szomatikus *PRKAR1A* mutációt a mellékvesekéreg-adenomák 10%-ban mutattak ki, ugyanakkor carcinomákban nem találtak [29]. Ezzel szemben, a *PRKAR1A*-t hordozó 17q22-24 kromoszomális régió heterozigócia vesztesét (LOH) a mellékvesekéreg-carcinomák több mint 50%-ában figyelték meg [5]. Valószínű, hogy e jelenség hátterében a MEN1 szomatikus mutációi és a 11q13 kromoszómarégió fent említett diszkrepanciájához hasonlóan, itt sem maga a *PRKAR1A*, hanem az érintett kromoszómaterület más génjei vagy a szabályozás zavara állhatnak.

Rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokra hajlamosít a Li-Fraumeni-szindróma. E betegséget a mellékvesekéreg-carcinoma mellett emlőrák, leukémia és agydaganatok megjelenése jellemzi. Molekuláris patogenezisében a **TP53** (tumor protein 53) gén mutációit mutatták ki. A *TP53* a legtöbbet tanulmányozott gének közé tartozik, és az egyik legfontosabb tumorszuppresszor génként tartjuk számon, ami a sejtprolifерáció szabályozásában és a DNS-károsodások felismerésében alapvető szerepet játszik. A Li-Fraumeni-szindrómában előforduló *TP53* mutációk többsége aminosavcserét eredményező, missense mutáció, a gén delécióját mindössze az érintett családok 10 %-ában mutatták ki [30]. A Li-Fraumeni-szindrómára jellemző csírasejtes *TP53* mutációk szomatikus megfelelőit a felnőttkori, sporadikus mellékvesekéreg-carcinomák 25-30%-ában találták meg, elsősorban a nagyméretű, előrehaladott stádiumú daganatokban. E mutációk jelenléte a betegség rosszabb prognózisával, rövidebb túlélési idejével társul [31].

A Beckwith-Wiedemann-szindróma ritka, újszülöttkori macrosomiával járó betegség. Jellemző eltérései közé tartoznak a macroglossia és hasfali eltérések (omphalokele, köldöksérv, rectus diastasis), a hemihyperplasia, visceromegalia, fül és vesefejlődési rendellenességek, neonatális hypoglycaemia, száypadhasadék. A Beckwith-Wiedemann-szindróma több gyermekkori daganatra, többek között mellékvesekéreg-carcinomára hajlamosíthat. Kialakulásának hátterében a 11p15 kromoszómarégió genomikus

imprintingjének zavara és ennek nyomán több gén megváltozott kifejeződése áll. Patogenezisében az **inzulinszerű növekedési faktor 2 (IGF-2)** fokozott, míg a *H19* gén csökkent kifejeződése tűnik meghatározónak. Az IGF-2 növekedési faktor számos szervben, pl. a magzati mellékvesében trofikus hatást fejt ki [32]. Túltermelődése mind a Beckwith-Wiedemann- szindrómára jellemző túlnövekedés, mind az ismétlődő hypoglycaemiás epizódok kialakulásában meghatározó lehet. A *H19* egy fehérjét nem kódoló gén, melynek pontos funkciója nem ismert. Valószínű, hogy az *IGF-2* kifejeződését is gátló mikroRNS-t, a *miR-675*-öt kódolja [33]. Beckwith-Wiedemann-szindrómában a sejtciklus szabályozásának negatív szabályozójaként ismert tumorsuppresszor hatású p57<sup>kip</sup> fehérjét kódoló *CDKN1C* (ciklin-dependens kináz inhibitor 1C) gén csökkent kifejeződését is kimutatták [34, 35].

**A sporadikus rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokban az IGF-2 fokozott expressziója a legkonzekvensebben észlelt génexpressziós eltérés.** Az *IGF-2* gén fokozott kifejeződése mind az egészséges mellékvesekéreg szövethez, mind a jóindulatú adenomákhoz képest kimutatható [36]. Az *IGF-2* gént is hordozó 11p15 kromoszómaregiót érintő heterozigótia vesztesét a mellékvesekéreg-carcinomák 67%-ában, míg az adenomák 13%-ában írták le [1]. A mellékvesekéreg-carcinómában szenvedő betegekben az IGF-2 fehérje szérumkoncentrációját is növekedettnek találták [37]. Az IGF-2 sejtosztódást serkentő hatását az IGF-1 receptoron keresztül fejt ki. Mellékvesekéreg-carcinómában az *IGF-1R* fokozott kifejeződését is leírták [38]. Az IGF-2 hatását számos kötőfehérje befolyásolja, és ezek között mellékvesekéreg-carcinómában az *IGFBP-2* (IGF binding protein) növekedett szöveti expresszióját is kimutatták, sőt a kötőfehérje koncentrációjának növekedését rosszabb prognózissal is összefüggésbe hozták [37]. Az IGF-1 receptor jelátvitelét gátló kismolekulasúlyú hatóanyag, ill. ellenanyag a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében is hatékony lehet, ezek klinikai vizsgálatai jelenleg is folynak [9]. Az *IGF-2* és Ki-67 proliferációs marker együttes vizsgálatával a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok elkülöníthetőek lehetnek [39].

Az elsősorban vastagbélpolyposisra és vastagbélrákra hajlamosító familiáris adenomatosus polyposis (FAP) ritkán mellékvesekéreg-daganatokkal is társulhat. E betegség patogenezisében az *APC* (adenomatosus polyposis coli) gén mutációit igazolták. Az *APC* fehérje a **Wnt/β-katenin jelátviteli út** szabályozásában vesz részt. Az *APC* a glikogén-szintáz kináz 3β (*GSK-3*) fehérjével alkot komplexet. A *GSK-3* fehérje a β-katenin foszforilációja nyomán annak sejtmembránközeli elhelyezkedéshez vezet. A Wnt receptorához kötődése

nyomán az APC/GSK-3 komplex aktivitása csökken, ami a  $\beta$ -katenin foszforilációjának gátlásához vezet, és sejtmagba történő transzlokációját fokozza. A  $\beta$ -katenin több gén átírásának szabályozásában vesz részt. Az APC gén mutációi következtében e jelátviteli út a Wnt receptorhoz kötődése nélkül önállóan aktiválódhat és a sejtosztódás serkentésén keresztül számos daganat kialakulásában szerepet játszhat [40].

Sporadikus mellékvesekéreg-carcinomában is számos adat támasztja alá a **Wnt/ $\beta$ -katenin út jelentőségét**. A jelátviteli út aktiválódására jellemző diffúz citoplazmatikus  $\beta$ -katenin festődést e daganatok többségében leírták, ugyanakkor a  $\beta$ -katenin szomatikus mutációit csak a daganatok 25-35%-ában mutatták ki [41].

2009-es összefoglaló cikkükben Jérôme Bertherat és Xavier Bertagna [5] a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok közös patogenetikai modelljének felállítására tettek kísérletet. Modellükben a **Wnt/ $\beta$ -katenin út aktiválódása korai eltérésként, az IGF-2 fokozott kifejeződése már a rosszindulatúság stádiumában, míg a TP53 mutációi kései eseményekként** jelentkeznek. Vita tárgyát képezi azonban, hogy a mellékvesekéreg rosszindulatú daganatai a vastagbél-daganatok kialakulására (ép-polip-adenoma-carcinoma) jellemző jóindulatú stádiumokon keresztül alakulnak-e ki, vagy ettől függetlenül. E hipotézis ellen szól, hogy a vastagbél daganataival szemben a mellékvesekéreg rosszindulatú daganatainak gyakorisága a jóindulatú adenomákhoz képest messze alulmarad.

### 2.1.1.2. A funkcionális genomikai/bioinformatikai vizsgálatok eredményei mellékvesekéreg-daganatokban

Az mRNA expressziót vizsgáló transzkriptomikai vizsgálatokban a jóindulatú adenomák és a mellékvesekéreg-carcinoma összehasonlításáról áll rendelkezésünkre a legtöbb adat. Legkonzekvensebb eltérésként az *IGF-2* fokozott kifejeződését írták le mellékvesekéreg-carcinomában, de e mellett számos **a sejtciklus szabályozásában szerepet játszó fehérjét kódoló gén fokozott kifejeződését** is kimutatták. Ezek közül kiemelhető a a DNS-replikáció folyamataiban alapvető jelentőségű **topoizomeráz 2A (TOP2A)** [36]. A topoizomeráz 2A a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében is alkalmazott citosztatikumok (pl. doxorubicin és etopozid) célfehérjéjeként is szerepel [42], sőt a rosszindulatúság markereként is felhasználható [36]. A sejtosztódás folyamataiban alapvető szerepet játszó több ciklin és ciklint szabályozó kináz gén eltérését is igazolták [43-46].

Tekintettel a mellékvesekéreg-daganatok szövettani vizsgálatának nehézségeire, a bioinformatikai vizsgálatok egyik elsődleges célja a rosszindulatúság markereként alkalmazható géncsoportok azonosítása. A rosszindulatú daganatokra jellemző génexpressziós eltérések között az *IGF-2* és a sejtosztódás szabályozásában szereplő gének megnövekedett kifejeződése mellett több, a **szteroidhormonok bioszintézisében fontos gén csökkent kifejeződését** írták le a jóindulatú adenomákhoz képest [47]. Ezek közé tartozik a *HSD3B* (3-béta-hidroxisteroid dehidrogenáz) és a szteroidhormon metabolizmusban szerepet játszó *AKR1B1* (aldo-keto reduktáz család 1/B1) [44, 47, 48]. Érdekes megfigyelés, hogy a *HSD3B* és az *AKR1B1* gének csökkent kifejeződését mind a magzati mellékvesekéreg, mind a felnőttkori mellékvesekéreg-carcinoma génexpressziós mintázatában azonosították [32]. **A felnőttkori mellékvesekéreg-carcinomában és a magzati mellékvesekéregben megfigyelhető génexpresszió párhuzamai a mellékvesekéreg-carcinoma „dedifferenciálódását” jelezhetik.**

A microarray vizsgálatok további fontos eredménye a Wnt/ $\beta$ -katenin jelátviteli út fontosságát jelzik, ugyanis számos microarray vizsgálatban kimutatható az e jelátviteli út által befolyásolt gének megváltozott expressziója [43, 44, 47, 49, 50].

A funkcionális genomikai vizsgálatok másik fő alkalmazási lehetőségét a daganatok osztályozása képezi. Két nagy elemszámú vizsgálatban a mellékvesekéreg-carcinomán belül egy jobb és egy rosszabb prognózisú csoport felállítása volt lehetséges [43, 44]. Ennek nagy

gyakorlati lehetősége lehet a betegek kezelési stratégiájának megválasztásában, a gondozás kérdéseiben, és ezeken keresztül az egyénre szabott kezelés távlati céljának lehetővé tételében. A recidívamentes és a teljes túlélés génmarkereit is azonosították. E gének mindegyike a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet [44].

A további génexpressziós vizsgálatok közül kiemelendő de Fraipont és mtsai. [51] tanulmánya, amelyben egyedi tervezésű, gyulladásos és immunológiai folyamatokban szereplő génekre összpontosító microarray lemezeket használtak. Vizsgálták a mellékvesekéreg-carcinoma recidívájára jellemző génexpressziós eltéréseket és az erre jellemző gének között több immunológiai szempontból fontos fehérjét kódoló gént találtak (granzyme A, integrin2, interleukin-2 (IL-2) receptor  $\gamma$  lánc), ami az **immunológiai folyamatok jelentőségét jelzi a mellékvesekéreg-carcinoma recidívájának folyamataiban** [51]. Fernandez-Ranvier és mtsai. [45] tanulmányában is **több, immunológiai szabályozásban is fontos gén eltérését is igazolták** mellékvesekéreg-carcinomában: így a *HTR2B* (szerotonin receptor 2B) fokozott, míg a az IL-13 receptorát kódoló *IL13RA2* gén csökkent kifejeződését. Mindezen megfigyelések **az immun-neuroendokrin kölcsönhatások** fontosságát támasztják alá a mellékvesekéreg vonatkozásában is.

### 2.1.2. A mellékvesevelő daganatai (phaeochromocytoma)

A kromaffin szövetből kiinduló phaeochromocytoma a szekunder, endokrin hypertonia ritka oka, az összes hypertonia kevesebb, mint 0,5 %-áért felelős. A phaeochromocytoma ritka daganat, incidenciája 1-20 beteg/millió fő/év [52, 53]. Ritkasága ellenére klinikai jelentősége mégis számottevő, mivel klinikai következményei súlyosak (súlyos hypertonia, myocardialis infarktus, stroke, hirtelen halál), másrészt az esszenciális hypertoniával szemben nemcsak kezelhető, hanem gyógyítható okát jelenti a magas vérnyomásnak.

Az utóbbi évek kutatásai számos új megfigyeléssel gazdagították a phaeochromocytomákról alkotott ismereteinket. A korábban érvényesnek tartott 10 %-os szabály (a phaeochromocytomák 10 %-a gyermekkori, 10 %-a bilaterális, 10 %-a öröklődő, 10 %-a extraadrenális, 10 %-a malignus) jelenleg már több vonatkozásban sem tartható. Az egyik legjelentősebb változás az öröklődő daganatok gyakoriságát érinti. Újabb adatok szerint a phaeochromocytomák különleges daganatok, mivel **a sporadikusnak tűnő daganatok 25-30 %-a csírasejtes mutációk talaján kialakult öröklődő daganatszindrómák talaján alakulnak ki**. A legfontosabb phaeochromocytomára hajlamosító daganatok közé a multiplex endokrin neoplasia 2-es típusa (MEN2), a von Hippel-Lindau szindróma (VHL), a neurofibromatosis 1-es típusa (NF1) és az öröklődő paraganglioma szindrómák (PGL) tartoznak [8]. Nemrégiben újabb gének mutációit is azonosították phaeochromocytomában szenvedő betegekben: a *TMEM127* gén [54], valamint a 2011. júliusában közölt *Max* gén (myc-associated X gén) [55] mutációit, azonban ezekről még csak kevés adattal rendelkezünk.

A phaeochromocytomák többsége mellékvese kiindulású (adrenális), de 10-20 %-uk a szimpatikus és paraszimpatikus ganglionokból kiinduló extraadrenális forma, amelyeket más néven paragangliomaként ismerünk. A rosszindulatú formák gyakorisága különböző tanulmányokban eltérő, 5-26 % között változik [56]. Saját anyagunkban (SE ÁOK II. Belgyógyászati Klinika) a rosszindulatú phaeochromocytoma/paraganglioma nagyon ritka előfordulásúnak bizonyult (kb. 5 %).

A phaeochromocytomák rosszindulatúságát szövettani vizsgálattal nem lehet megállapítani, mivel nincsen olyan, a gyakorlatban megbízhatóan alkalmazható morfológiai paraméter, ami alapján a malignitás kórisméje egyértelműen felállítható lenne. Korábbi vizsgálatokban a nagy daganatméretet (> 5 cm), az ér- és tokinváziót, a tumor DNS

kópiaszám változásait (aneuploidia, tetraploidia), és számos különböző mRNS illetve fehérje (pl. neuropeptid-Y, inhibin/aktivin  $\beta$ B alegység, ciklooxygenáz-2, tenascin C, hősokk-fehérje 90 (*HSP90*), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), VEGF receptor 2 (*VEGF-R2*), hypoxia-indukált faktor 2 $\alpha$  (*HIF2 $\alpha$* ), N-kadherin és a humán telomeráz reverz transzkriptáz) - expressziós eltéréseit tartották a rosszindulatúság jelének [56-62], azonban ezek egyike sem váltotta be a hozzá fűzött reményeket. A jelenlegi immunhisztokémiai gyakorlatban elsősorban a *Ki-67* és az *S-100* markereket alkalmazzák, de ezek megbízhatósága sem egyértelmű az eltérő értékelési szempontok miatt [63-65].

A WHO érvényes kritériumai szerint a phaeochromocytoma rosszindulatúságát csak áttétek jelenlétében mondhatjuk ki [4]. Áttétek azonban a primer daganat eltávolítása után évekkel, akár évtizedekkel később is jelentkezhetnek. Szintén nem ismert olyan paraméter, ami a phaeochromocytomák recidívahajlamát jelezne. Mivel a molekuláris (mRNS, mikroRNS) markerek már több szövettanilag nehezen vizsgálható daganatban hatékonyan bizonyultak a dignitás megállapításában, lehetséges, hogy a phaeochromocytomák körében is alkalmasak lennének e célra.

Phaeochromocytoma diagnózisa esetén a műtéti eltávolítás a választandó kezelési mód. Az áttétképző phaeochromocytomák kezelése nem megoldott, a daganatok szisztémás kemoterápiára és sugárkezelésre kevésbé érzékenyek [4, 56]. Új patogenetikai utak és ezen belül potenciális gyógyszeres támadáspontok azonosítása ezért komoly gyakorlati jelentőséggel bírhat.

#### **2.1.2.1. A phaeochromocytomák patogenezise**

Szemben a mellékvesekéreg-daganataival, ahol az öröklődő formák az összes daganat töredékéért felelősek, a phaeochromocytomák jelentékeny része (25-30 %-a) jól körülhatárolt örökletes daganatszindrómák talaján alakul ki [8]. Jelenlegi ismereteink szerint, a sporadikus phaeochromocytomák patogenezisében az öröklődő daganatszindrómákhoz hasonló kórfolyamatok játszanak szerepet.

### 2.1.2.1.1. Phaeochromocytoma kialakulására hajlamosító öröklődő betegségek

#### 2.1.2.1.1.1. A multiplex endokrin neoplasia 2-es típusa (MEN2)

Az autoszomális domináns öröklődésű MEN2 szindrómát három alcsoportra bonthatjuk: MEN2A, MEN2B és a familiáris medulláris pajzsmirigyrák (FMTC). Prevalenciája 1:30000. Legfontosabb jellemzőjük a medulláris pajzsmirigyrák (medullary thyroid cancer, MTC), amely a pajzsmirigy kalcitonintermelő C-sejtjeiből kiinduló agresszív, áttétképző daganat. A medulláris pajzsmirigyrák penetranciája MEN2-ben a 100 %-ot közelíti, vagyis e rosszindulatú daganat szinte minden érintettben kialakul. Megelőzésének egyetlen módja a profilaktikus thyreoidectomia. MEN2A-ban e mellett az esetek 40-50%-ában phaeochromocytoma, 20-30 %-ban primer hyperparathyreosis alakul ki. A MEN2B-re agresszív medulláris pajzsmirigyrák mellett 50 %-ban phaeochromocytoma valamint jellegzetes fenotípusos eltérések (mucocután neurinomák, intestinalis ganglioneuromatosis, cornealis idegek hypertrophiája stb.) jellemzőek. FMTC-ben kizárólag medulláris pajzsmirigyrák fordul elő [66].

A MEN2 kialakulása hátterében a **RET (Rearranged on Transfection) receptor tirozin kinázt kódoló protoonkogén mutációi** állnak. A *RET* gén 21 exonból áll, de ezek között a genetikai diagnózist nagyban megkönnyítő mutációs „tűzfészkek” (hotspot – a gének azon régiói, ahol mutációk gyakran fordulnak elő) ismertek. A mutációk döntő többsége MEN2A-ban a 11-es, 10-es exonokat érinti, a MEN2B-re a 16-os (5 %-ban a 15-ös exon) mutációi jellemzőek, míg a 13-as, 14-es exonok mutációi főként az FMTC-ben ritkábban a MEN2A-ban fordulnak elő. MEN2B-re a 16-os exon mutációi jellemzők. A mutációk többsége pontmutáció és ezen belül elsősorban aminosav cserére vezető, a fehérje működését fokozó aktiváló hatású missense mutációk ismertek, amelyek legtöbbször a 634-es, ciszteint kódoló kodont érintik [67].

A MEN2-ben számos geno-fenotípus korreláció ismert. A medulláris pajzsmirigyrák agresszivitása a mutációk típusával áll összefüggésben és ezek alapján tervezhető a profilaktikus thyreoidectomia időpontja is. A MEN2-ben döntően a mellékvesében elhelyezkedő adrenalintermelő phaeochromocytomák fordulnak elő klasszikus klinikai tünetek kíséretében [66].

### 2.1.2.1.1.2. von Hippel-Lindau szindróma (VHL)

A VHL-szindróma legfontosabb megjelenési formái a retinális és kisagyi haemangioblastoma, a világossejtes veserák, a pancreas cystái és daganatai, epididymis cysták valamint a phaeochromocytoma. Két fő csoportját annak alapján különítik el, hogy phaeochromocytomával társul-e vagy sem: VHL1-ben nincs phaeochromocytoma, míg a VHL2-ben előfordul. VHL2-t három altípusra bontjuk: a VHL2A-ban a veserák kockázata kicsi, míg VHL2B-ben nagy, a VHL2C-ben viszont csak phaeochromocytoma fordul elő. A VHL-ben előforduló phaeochromocytomák döntően a mellékvesében alakulnak ki és noradrenalint választanak el. Prevalenciája 1:36000 és az öröklődő daganatszindrómák többségéhez hasonlóan a VHL-szindróma is autoszomális domináns öröklésmentet követ [3].

A VHL-szindróma hátterében a *VHL* tumorszuppresszor gén mutációit mutatták ki. A *VHL* gén három exonból áll, amelyben számos mutáció ismert, de mutációs tűzfészeket és egyértelmű geno-fenotípus korrelációkat eddig nem írtak le. A VHL fehérje a **hypoxia-indukált faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )** lebontásában működik közre. Hypoxia esetén a HIF-1 $\alpha$  aktiválódik és számos érképződésben fontos tényező (pl. vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF)) kifejeződését serkenti. Normális oxigéntenzió esetén azonban a HIF-1 $\alpha$  lebomlik és ebben a VHL-fehérjének elsődleges szerepe van. A VHL gén mutációi esetén ez a mechanizmus nem működik, a HIF-1 $\alpha$  normoxia esetén is aktív marad és serkenti az érképződést. A VHL-szindrómában kialakuló daganatokra kifejezett érdűség jellemző, amire a molekuláris mechanizmus magyarázatul szolgálhat [68].

### 2.1.2.1.1.3. A neurofibromatosis 1-es típusa (NF1)

A neurofibromatosis 1-es típusa a leggyakoribb öröklődő daganatszindróma, amelynek prevalenciája 1:3.500 körül van. Jellemzői a tejeskávészínű (café-au-lait) foltok, neurofibromák, a szivárványhártya Lisch-nodulusai ill. számos daganat, amelyek között az idegrendszeri lokalizációjuk mellett phaeochromocytoma is előfordul [69]. A NF1 is autoszomális domináns öröklődésű, de diagnózisa a többi e fejezetben említett daganatszindrómától eltérően alapvetően nem genetikai, hanem klinikai vizsgálaton alapul. Ennek hátterében technikai okok állnak, mivel a NF1 hátterében álló *NF1* gén az egyik legnagyobb méretű ismert gén (60 exon, 350 kb) és ezért ennek rutinszerű genetikai vizsgálata nehezen oldható meg. Az *NF1* gén terméke a neurofibromin, ami a RAS jelátviteli

út gátlásában vesz részt és mutációi esetén ennek aktiválódása vezethet a daganatok megjelenésére [3, 4].

#### 2.1.2.1.1.4. Öröklődő paraganglioma szindrómák (PGL1-4)

Az öröklődő paraganglioma szindrómákat az utóbbi három évtizedben írták le. E betegcsoport közös jellemzője, hogy az adrenális phaeochromocytomákon túlmenően mellékvesén kívüli elhelyezkedésű (extraadrenális) phaeochromocytoma (paraganglioma) kialakulására hajlamosítanak. Mivel öröklődő paraganglioma szindrómában szenvedő betegből eltávolított phaeochromocytoma mintát munkáimban nem tanulmányoztunk, e betegségeket csak röviden ismertetem.

Négy paraganglioma szindrómát (PGL) ismerünk, amelyek közül a PGL-1 a leggyakoribb. A PGL-1-et döntően fej-nyak paragangliomák jellemzik, amelyek rosszindulatúsága ritka. A PGL-4-szindróma különlegessége, hogy rosszindulatú paragangliomák gyakran fordulnak elő: a PGL-4-ben észlelt daganatok 35% a malignus. A PGL-2 és PGL-3 nagyon ritka betegségek. E daganatszindrómák is autoszomális domináns öröklésmentet követnek. A PGL-1 öröklődése azonban különleges, mivel a betegség anyai genomikai imprinting következtében csak akkor alakul ki, ha a hibás gént az apától öröklik [70].

A PGL-szindrómák hátterében az utóbbi évek kutatásai során a mitokondriális légzési lánc II-es komplexét alkotó, illetve azzal kapcsolatos fehérjéket kódoló gének mutációit mutatták ki. Ezek az első olyan daganatszindrómák, ill. olyan daganatok, amelyek egyetlen mitokondriális funkciójú fehérje eltéréseivel hozhatók kapcsolatba. A szukcinát dehidrogenáz (SDH) fehérje B, C és D alegységeit kódoló gének mutációi állnak a PGL-4 (*SDHB*), PGL-3 (*SDHC*) és a PGL-1 (*SDHD*) hátterében. A PGL-2 hátterében nemrégiben azonosították a szintén a légzési lánchoz kapcsolódó *SDHAF2* (*SDH5*) gén mutációit [71]. A mitokondriális II-es komplex működési zavara a szukcinát-fumarát átalakulás elmaradásához és a szukcinát koncentráció következményes emelkedéséhez vezet. A szukcinát magas koncentrációban a *HIF1α* hidroxilálásában szerepet játszó prolil-hidroxiláz enzimet gátolja, és a hidroxiláció elmaradása következtében a *HIF1α* ellenállóvá válik a VHL fehérje lebontását elősegítő hatásával szemben [70]. Mindezek alapján a VHL-szindróma és a PGL-szindrómák

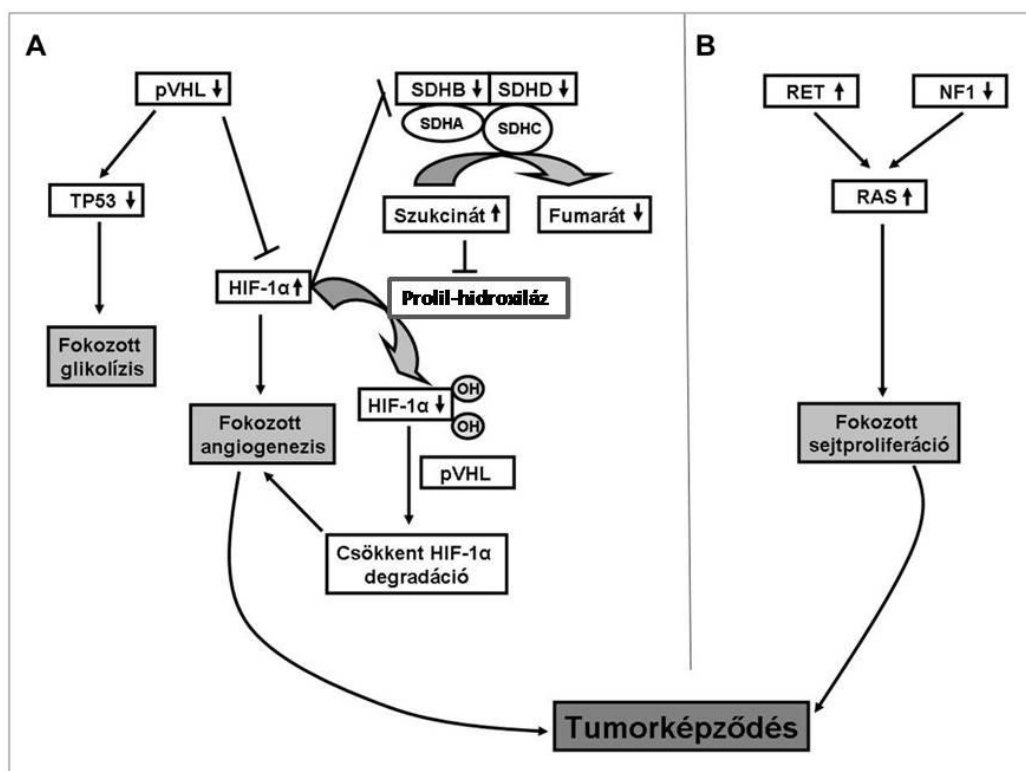
patomechanizmusa hasonló és mindkettőben a hypoxia/angiogenezis útvonal aktiválódása az elsődleges a daganatok kialakulásában.

#### 2.1.2.1.2. A génexpressziós vizsgálatok eredményei phaeochromocytomákban

Az utóbbi években a phaeochromocytomák kutatása terén is több génexpressziót vizsgáló tanulmányt közöltek, amelyekben molekuláris markerek azonosítására és a patogenezis vizsgálatára tettek kísérletet. Az egyes tanulmányok között itt is jelentősek a különbségek, amiben a különböző csoportosítási szempontok, vizsgálati platformok és bioinformatika elemzés különbségei is közrejátszhatnak.

Dahia és munkatársai 76 öröklődő (VHL, MEN2, NF1 és PGL) és sporadikus phaeochromocytoma génexpressziós mintázatát vizsgálták. A klaszter (cluster) elemzés során két fő csoportot különítettek el: az egyiket a VHL és SDHB/SDHD mutáció talaján kialakuló phaeochromocytomák, míg a másikat a MEN2 és NF1 talaján kialakult daganatok alkották [72]. A MEN2 csoporttal történő összehasonlítás során a VHL/PGL szindrómához társuló phaeochromocytoma mintákban a hypoxia-angiogenezis útvonalban szereplő gének fokozott kifejeződését figyelték meg. A génexpressziós és korábbi molekuláris vizsgálatok eredményei alapján az öröklődő phaeochromocytomák patogenezisében **két alapvető patogenetikai út** tűnik meghatározónak. A VHL és SDH mutációk talaján kialakuló phaeochromocytomák patogenezisében a *HIF1 $\alpha$*  jelenti a funkcionális kapcsolatot a [72]. A MEN2 és NF1 mutációk talaján jelentkező phaeochromocytomák patomechanizmusának közös eleme a RAS jelátviteli útvonal túlműködése, ami a sejtosztódás serkentésén keresztül segítheti a daganatképződést (**1. ábra**).

E tanulmány további fontos eredménye, hogy a sporadikus, nem öröklődő daganatszindrómák keretében kialakuló daganatok génexpressziós mintázata is az öröklődő phaeochromocytomák valamelyik csoportjához volt hasonló. Ez arra utalhat, hogy a sporadikus, nem csírasejtes mutációk talaján kialakult phaeochromocytomákban is az öröklődő daganatokhoz hasonló kórfolyamatok zajlanak [72].



**1. ábra: Az örökletes phaeochromocytomák patogenezisében szerepet játszó két fő molekuláris mechanizmus.**

A VHL és SDH mutáció talaján kialakuló phaeochromocytomákra a HIF-1α megnövekedett aktivitása jellemző, aminek következtében fokozódik az érképződés és csökken az oxidoreduktáz aktivitás (A). MEN2 és NF1 talaján kialakuló phaeochromocytomákban a RAS jelátviteli út vonal túlműködése meghatározó (B).

A hypoxia-angiogenesis út vonal számos tagjának (például VEGF, VEGFR-2, HIF-2α, ciklooxygenáz 1 és 2 (COX1, COX2), angiopoietin 2, mátrix metalloproteáz 1, tenascin C) mRNS expresszióját fokozott mértékűnek találták noradrenalin-termelő örökletes (VHL) és sporadikus phaeochromocytomákban [73].

Mivel a phaeochromocytomák rosszindulatúságát jelző megbízható szövettani illetve molekuláris marker nem ismert, a funkcionális genomikai vizsgálatok egyik fő célja a malignitást jelző molekuláris markerek azonosítása.

Thouënnon és munkatársai egy körülbelül 100 génből álló készletet azonosítottak, amelyek segítségével el tudták különíteni a sporadikus jó- és rosszindulatú phaeochromocytomákat [74]. Érdekes módon a vizsgált gének többsége (>80%) csökkent kifejeződést mutatott a rosszindulatú phaeochromocytomákban a jóindulatúakhoz képest. E

tendenciát más vizsgálatokban is [75, 76] észlelték. Ezek alapján a rosszindulatú **phaeochromocytomákban is feltételeznek „dedifferenciálódási” folyamatokat** [75].

Rosszindulatú **phaeochromocytomákban** a sejtadhézióban résztvevő gének (*asztraktin*, *plexin C1*, *okkludin*) csökkent, valamint a *γ-tubulin* fokozott expresszióját írták le, ami a sejtosztódás zavaraihoz vezethet. **Az immunrendszer és az endokrin daganatok kapcsolatának fontosságát jelezheti az a megfigyelés, hogy több citokin ill. citokinreceptor fokozott kifejeződését is leírták rosszindulatú phaeochromocytomákban (pl. granulocita-makrofág kolónia-stimuláló faktor 2 (GM-CSF2) és az interleukin 2 (IL2) receptor γ-alegység)** [74, 77].

Fontos megemlíteni Suh és munkatársai vizsgálatát, ahol a szerzők hat, a jó- és rosszindulatú daganatok között szignifikánsan eltérő kifejeződést mutató gén felhasználásával a rosszindulatú **phaeochromocytomák** jelzésére alkalmas biomarker készletet azonosítottak. A genomikai eredmények bioinformatikai vizsgálatával (Gene Set Enrichment Analysis=GSEA, géncsoport dúsulási vizsgálat) több, a más daganatokban is fontos molekuláris útvonal (*c-Myc* és *RAS* aktiváció, sejtciklus eltérések, Notch-jelátvitel stb.) patogenetikai jelentőségére utalt [78].

Természetesen e néhány vizsgálat eredményei alapján messzemenő következtetéseket nem vonhatunk le. További, nagyobb elemszámú vizsgálatok szükségesek a biomarkerek gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálatára és a patogenezis ismeretlen aspektusainak feltárására.

## 2.2. A hisztamin

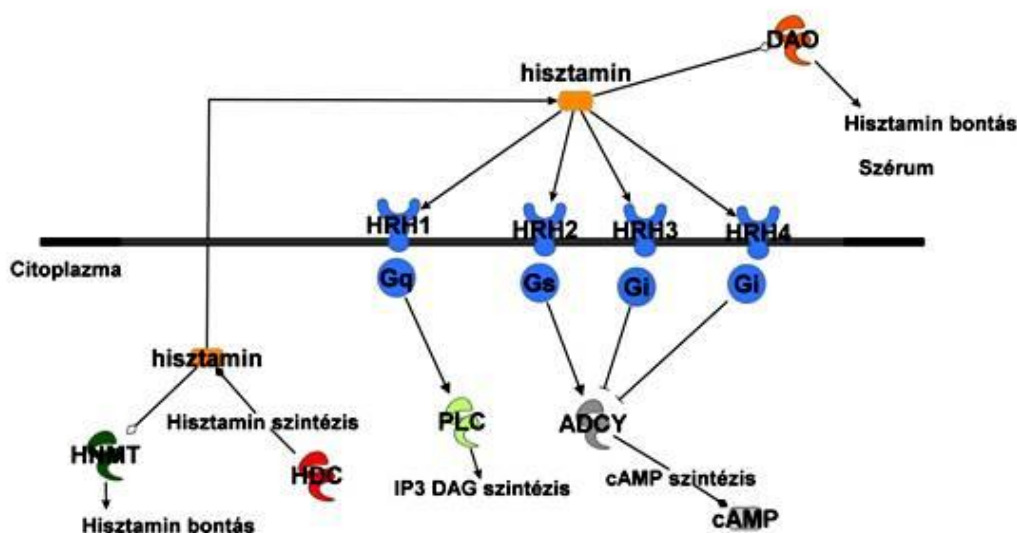
A hisztamin egy biogén amin, amely számos alapvető élettani folyamat, így a sejtosztódás, differenciálódás, vérképzés, embrionális fejlődés szabályozásában fontos szerepet játszik. Kiemelkedő jelentősége van a gyulladásos-immunológiai-allergiás folyamatok és a központi idegrendszer működésének szabályozásában is [79, 80]. A hisztamin bioszintéziséért egyetlen enzim, a hisztidin-dekarboxiláz (HDC) felelős [80]. A HDC-hiányos génkiütött (knockout) egerekben hisztamin egyáltalán nem termelődik [81].

A hisztamin hatását négyféle receptoron keresztül fejti ki: a H1 receptor (HRH1) a túlérzékenységi reakciók kialakulásában, a H2 receptor (HRH2) a gyomorsav elválasztás szabályozásában bír meghatározó jelentőséggel. Mind a HRH1, mind a HRH2 szerepet játszik számos immunológiai folyamat szabályozásában is. A hisztamin H3 receptor (HRH3) elsősorban az idegi működések szabályozásában fontos, mivel az idegsejtek preszinaptikus membránjában mutatható ki. A legújabban felismert hisztaminreceptort *in silico* genomikai vizsgálatok során azonosították: a H4 receptor (HRH4) az immunsejtek vándorlásában és érésében, valamint a vérképzés folyamatainak szabályozásában tűnik fontosnak. A hisztamin valamennyi receptora G-fehérjékhez kapcsolt fehérje. E receptorok jelátvitelében a HRH1 esetében a foszfolipáz C (PLC), míg a HRH2, HRH3 és HRH4 esetén ciklikus AMP (cAMP) koncentrációváltozásai a meghatározóak [79, 80].

A hisztamin lebontásáért két enzim felelős: a vérben a diamin-oxidáz (DAO), míg szövetekben a hisztamin-N-metiltranszferáz (HNMT) **(2. ábra)** [80].

A hisztamin és a citokinek között kiterjedt, kétirányú kapcsolatrendszer áll fenn. Összességében a hisztamin a Th1-Th2 egyensúlyt Th2 irányba tolja [79].

Számos adat szól a mellett, hogy a hisztamin a daganatképződés folyamatainak szabályozásában is szerepet játszik. Több daganatban írták le a hisztamin fokozott kifejeződését, így melanoma malignum [14], emlő- [15] és vastagbélrák [16] szövetekben. *In vitro* vizsgálatokban melanoma és emlő carcinoma sejtvonalakon a hisztamin koncentrációfüggően serkentette a sejtszaporodást [14, 15]. A melanoma malignum és emlőrák szövetek maguk is termelnek hisztamint, ami autokrin szabályozás lehetőségét veti fel [14, 15].



**2. ábra: A hisztamin hatásában és lebomlásában szereplő fehérjék és főbb folyamatok összefoglalása.** PLC: foszfolipáz C, ADCY: adenilát cikláz, IP3: inozitol triszfoszfát, DAG: diacilglicerol

Bár a mellékvese működésében számos tényező szerepéről rendelkezünk adatokkal, a hisztamin jelentősége a normális mellékvesekéreg működésében kevésbé ismert. A hisztamin és a mellékvesekéreg-daganatok kapcsolatáról vizsgálatunkig nem közöltek adatokat.

### 2.2.1. A hisztamin és a mellékvese

Még az 1920-as években írták le, hogy a hisztamin serkenti a katekolaminok elválasztását a mellékvesevelőből [82]. A hisztamin borjú kromaffin sejtekből a HRH1 receptoron keresztül vált ki katekolamin felszabadulást [83]. Tengerimalac mellékvesevelőben a HRH2 receptor jelenlétét is kimutatták [84], de a HRH3 és HRH4 kifejeződéséről nincsenek adatok [85].

A hisztamin jelenlétét kimutatták a patkány mellékvesevelő egyes noradrenalintermelő kromaffin sejtcsoportjaiban, ugyanakkor az idegrostokban, az adrenalintermelő kromaffin sejtekben és a mellékvesekéreg sejtjeiben nem volt kimutatható [86]. A hisztamin jelenlétét emberi mellékvesevelőben és pheochromocytomákban is igazolták [87].

A hisztamin mellékvesekéregre kifejtett hatását eddig néhány tanulmányban vizsgálták. E vizsgálatok eredményeiben számos eltérés látható, amiben szerepet játszhatnak a vizsgált fajok közötti különbségek is. Yoshida és mtsai izolált borjú mellékvesekéreg

tenyészeteken a hisztamin közvetlen hatásait nem tudták kimutatni, viszont kevert mellékvesekéreg-mellévesevelő tenyészetekhez adva a hisztamin közvetett módon, a katekolamin elválasztás serkentésén keresztül fokozta a kortizoltermelést [88]. Egy másik, humán mellékvesekéreg tenyészetén végzett vizsgálatban azonban a hisztamin gátolta a kortizol és aldoszteron elválasztását, ugyanakkor fokozta a dehidroepiandroszteron szulfát (DHEAS) termelését [89]. ACTH-val (adrenokortikotropin) együtt adva a hisztamin gátolta az ACTH kortizol- és aldoszterontermelést fokozó hatását [90]. Ezekben a hatásokban a HRH1 szerepét tételezték fel.

Vizsgálatainkat megelőzően nem voltak adatok arról, hogy az emberi mellékvesekéregben és a mellékvesekéreg-daganataiban a hisztamin termelésében, hatásában és lebomlásában szereplő gének és fehérjék kifejeződnek-e, valamint lehet-e kóroki szerepük.

### 2.3. Az immun-neuroendokrin kölcsönhatások főbb jellemzői

A neuroendokrin rendszer immunrendszerre kifejtett hatásait már régóta ismerjük. A glükokortikoidokat már az 1950-es évek óta használják immunmediált kórképek kezelésére. Az utóbbi két évtizedben azonban e kölcsönhatások számos új aspektusát ismertük meg. Kiderült, hogy a neuroendokrin rendszer immunrendszeri hatásai mellett, az immunműködések is alapvetően befolyásolják a neuroendokrin rendszer működését. Mindezek alapján nem egy-, hanem **kétirányú kapcsolat áll fenn e két alapvető homeosztatikus rendszer között** [10].

E kölcsönhatások élettani alapja igen összetett, és egyik fő pillérét a két rendszer mediátorainak és ezek receptorainak kölcsönös kifejeződése képezi. Az immunsejteken számos hormon receptora mutatható ki. A legtöbb kísérleti adat a glükokortikoidok és katekolaminok immunológiai hatásairól ismert, de szinte valamennyi hormonról leírtak immunológiai hatásokat különböző kísérleti rendszerekben [91]. A hormonok alapvető immunológiai működési folyamatokat, így az antigénprezentációt, a lymphocyták aktivációját, közlekedését, hormontermelését és a citokinek elválasztását is szabályozzák. Sőt, a hormonok nemcsak befolyásolják az immunműködések, hanem az immunsejtek maguk is termelnek hormonmolekulákat. Mindazonáltal meg kell jegyezni, hogy bár felépítésüket tekintve az endokrin szervek és az immunsejtek által elválasztott hormonok megegyezők, hatásmódjukat tekintve nem azok, mivel az endokrin szervek által elválasztott hormonok szisztémás (endokrin) hatásúak, az immunsejtek által termeltek viszont döntően helyi (parakrin vagy autokrin) úton hatnak. A rendszer bonyolultságát tovább fokozza, hogy az immunrendszeri mediátornak tekinthető citokinek is hatnak a neuroendokrin szövetekre, mivel azok kifejezik ezek receptorait, illetve maguk is termelnek citokineket. Egyes citokinek pl. az interleukin-6 (IL-6) hormonokra jellemző szisztémás koncentrációt is elérhetnek. Mindezek következtében a hormon-citokin megkülönböztetés elmosódni látszik. Az immun-neuroendokrin kölcsönhatások további fontos pillérét képezik a nyirokszervek szimpatikus, paraszimpatikus és peptiderg beidegzése is. Az idegvégződésekből felszabaduló számos különböző mediátor az immunműködések rendkívül finom szabályozását teszi lehetővé [91].

Az immun-neuroendokrin kölcsönhatások legjobban ismert példája a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg rendszer működése. E rendszerben a fertőzések, stresszhatások stb. hatására termelődő proinflammatorikus citokinek (tumor nekrosis faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-

1 $\beta$  és IL-6) a gyulladásos válasz beindításának alapvető mediátorai, de egyúttal a hypothalamus és hypophysis sejtjeire hatva a CRH (kortikotrop releasing hormon) és az ACTH elválasztását is serkentik. Sőt a mellékvesekéreg sejtjeire is vannak közvetlen hatásai. Az ACTH hatására serkentett mellékvesekéreg eredetű glükokortikoidok sokrétű hatásai révén e rendszer a gyulladásos válasz korlátozásában alapvető jelentőségű [11, 12].

A citokinek számos hatását írták le a hypothalamus-hypophysis-gonád rendszerben is elsősorban az agyalapi mirigy gonadotrop sejtjein és a gonádokban [13, 92-94].

### 2.3.1. A hypothalamikus GnRH-neuronok

A hypothalamus GnRH-t (gonadotropine releasing hormone) termelő neuronjai a reproduktív rendszer „karmestereiként” a hypophysis LH (luteinizáló hormon) és FSH (follikulus stimuláló hormon) szekréciójának szabályozása révén irányítják a gonádok (here, petefészek) működését.

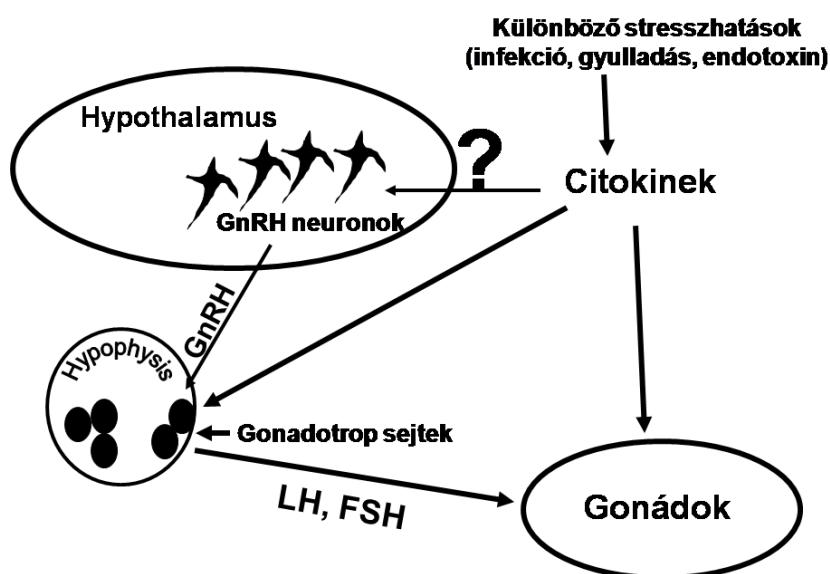
A GnRH-neuronok elszórtan helyezkednek el a hypothalamusban, patkányban számukat körülbelül 1200-1400-ra becsülik [95]. E sejtek az olfaktorikus plakod területéről vándorolnak végső helyükre, a hypothalamusba [96]. Közvetlen vizsgálatukhoz sejtvonalak szükségesek, azonban az immortalizáció következtében a sejtvonalak tulajdonságai az eredeti sejtektől eltérhetnek. A lausanne-i egyetemen kondicionális immortalizációs technikával előállítottak egy olyan GnRH sejtvonalat, ami az alkalmazott Tet-on rendszer következtében csak doxiciklin jelenlétében osztódik, míg annak hiányában a hypothalamikus GnRH-neuronokhoz nagyban hasonló fenotípust vesz fel [97, 98].

A GnRH-neuronok működésére jellemző a pulzatilis hormonelválasztás, de ennek pontos molekuláris mechanizmusai még kevésbé ismertek. A GnRH-neuronok működését számos tényező befolyásolja. Az éhezés hatására csökkenő GnRH elválasztás szabályozásában leptin és neuropeptid Y (NPY) szerepe emelendő ki [99]. Több növekedési faktor, így a transzformáló növekedési faktor  $\alpha$  és  $\beta$  (TGF- $\alpha$  és TGF- $\beta$ ), a fibroblaszt növekedési faktorok közé tartozó b-FGF és az IGF-1 hatásait is leírták a GnRH-neuronokon [95]. A reproduktív rendszer aktivitása fertőzések hatására is lecsökken, és ebben a citokinek szerepe is feltételezhető [92].

Logikusnak tűnik az a feltételezés, hogy a citokinek a GnRH-neuronok működését is befolyásolhatják (**3. ábra**). Több kísérleti adat jelezte, hogy a proinflammatorikus citokinek

centrális hatásaik révén befolyásolhatják a GnRH elválasztását, azonban az eredményekben számos eltérés figyelhető meg, így egységes kép kialakítása nehéz.

Gonadectomizált patkányokban az IL-1 $\beta$ , az IL-6 és a TNF- $\alpha$  intracerebrális adása nyomán csökkent a plazma LH koncentráció, azonban perifériás adásuk hatástalannak bizonyult [100]. Más vizsgálatokban azonban az IL-6 intracerebrális adása patkányokban nem befolyásolta a keringő LH koncentrációt [101, 102], ugyanakkor primer patkány hypothalamus tenyészetekben fokozta a GnRH elválasztását [103]. Nőstény patkányokban az IL-1 $\beta$  intracerebrális adása a keringő LH koncentráció csökkenéséhez és ennek nyomán az ösztrosciklus súlyos zavarához vezetett [104], ugyanakkor *in vitro* rendszerben az IL-1 $\beta$  serkentette a GnRH elválasztását [105]. A citokinek jelentőségének megértéséhez szükséges a hypothalamikus GnRH-neuronok citokin és citokin receptor expressziós mintázatának ismerete, ezért munkámban ennek vizsgálatát tűztük ki célul. **Elsőként vizsgáltuk egyes citokinek közvetlen hatását a hypothalamikus GnRH-neuronokon.**



**3. ábra: A hypothalamus-hypophysis-gonád tengely és a citokinek lehetséges kapcsolatának sematikus ábrázolása**

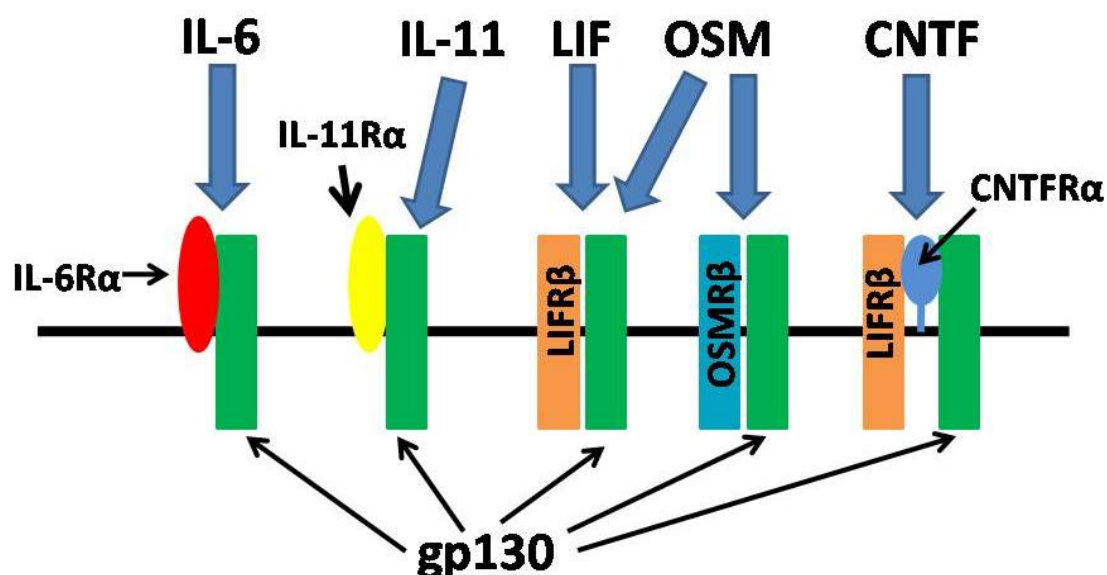
### 2.3.2. Az interleukin-1 (IL-1) és interleukin-6 (IL-6) citokinek családja

A hypothalamikus GnRH-neuronok citokin és citokinreceptor expressziós mintázatának vizsgálata során az IL-1 és IL-6 citokincsalád tagjaira összpontosítottam, mivel számos kísérleti eredmény támasztja alá e citokinek jelentőségét az immun-neuroendokrin kölcsönhatások szabályozásában [10, 91].

Az IL-1-et az 1980-as években írták le, mint számos immunológiai és gyulladásos folyamat szabályozásában szereplő fehérjét. Két formáját, az IL-1 $\alpha$ -t és az IL-1 $\beta$ -t ismerjük, amelyek között az immun-neuroendokrin kölcsönhatásokban az utóbbi a fontosabb. Két receptora ismert: míg az IL-1R1 közvetíti az IL-1 hatásait, az IL-1R2 ligandkötése nem vezet jelátvitelhez, ezért ezt gátló hatású („decoy”) receptornak tartják. Az IL-1R1 jelátviteléhez szükséges egy második alegység, amit IL-1R járulékos fehérjének (IL-1Racp, IL-1R accessory protein) neveznek. Egy természetesen előforduló IL-1 antagonistát is ismerünk (IL-1RN), ami az IL-1 hatásának finom szabályozását jelzi. Az IL-1 receptorcsalád bővülésében nagy szerepe volt a Drosophilában felismert Toll fehérjének, mivel ezek aminosavszekvenciája nagyfokú homológiát mutatott az IL-1R1-gyel. Manapság IL-1R/TLR (Toll like receptor/Toll-szerű receptor) szupercsaládról beszélünk, ami az immunfolyamatok szabályozásában alapvető jelentőségű fehérjét foglalja magába. A természetes immunválaszban a Toll-szerű receptorok rendkívül fontos szerepet töltenek be, a TLR4 például az endotoxin (lipopoliszacharid, LPS) felismerésében játszik szerepet. Az IL-1-hez hasonló citokinek közé tartozik az IL-18 és az újonnan felismert IL-33 is [106, 107].

Az IL-6 citokincsaládba tartozik az IL-6 mellett a leukémia gátló faktor (LIF: leukemia inhibiting factor), a ciliáris neurotrofikus faktor (CNTF), oncostatin M (OSM), az interleukin-11, cardiotrophin-1 (CT-1) és a cardiotrophin-szerű citokin (cardiotrophin-like cytokine, CLC) [108]. Immunfolyamatokat szabályozó hatásaik mellett, az IL-6 és a LIF fontos szerepet játszanak az immun-neuroendokrin kölcsönhatásokban is [109]. A LIF és CNTF az idegrendszer működésében is fontos szerepet játszik [110]. Transzgénikus egérmodellben a LIF túlzott kifejeződése a hypophysisben Cushing-szindrómát okozott [111]. E citokincsalád legújabb felismert tagja a CLF-1 (cytokine-like factor 1, citokinszerű faktor 1), amely a CLC-vel képez heterodimert és elsősorban az idegi működések szabályozásában vesz részt. A CLF-1 mutációit a rendkívül ritka, hideg-indukálta izzadás (cold-induced sweating) szindróma kialakulásával hozták összefüggésbe [112].

E citokinek közös jellemzője, hogy receptoraik több alegységből állnak, amelyek között mind ligandkötő, mind jelátvitelért felelős alegységek megtalálhatóak. A gp130 közös jelátviteli alegység valamennyi receptor felépítésében szerepel. Az IL-6, IL-11 és CNTF ligandkötő alegységeinek nincs jelátviteli funkciója, ugyanakkor a LIF és OSM ligandkötő alegysége egyben a jelátviteli folyamatokban is részt vesz. Emberben az OSM receptor két formája ismert, mivel az OSM a LIF receptorhoz is képes kötődni a ligandspecifikus OSMR $\beta$  mellett (**4. ábra**). A CLF-1/CLC heterodimernek nincs saját receptora, ez a CNTFR $\alpha$ , LIFR $\alpha$  és gp130 trimerhez kötődik [112]. E citokinek jelátviteli folyamataiban fontos szerepet játszik a JAK-STAT és a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) rendszer, de ezek mellett számos egyéb út is kimutatható [108].



**4. ábra:** Az interleukin-6 citokincsalád receptorainak sematikus felépítése. A gp130 közös jelátviteli alegység mellett ligandkötő alegységek építik fel a receptorokat. A ligandkötő alegységek között az IL-6 (IL-6R $\alpha$ ), IL-11 (IL-11R $\alpha$ ) és CNTF (CNTFR $\alpha$ ) receptora nem szerepel a jelátvitelben, ugyanakkor a LIF (LIFR $\beta$ ) és az OSM (OSMR $\beta$ ) ligandkötő alegysége a jelátvitelben is részt vesz.

## 2.4. A mikroRNS-ek (miRNS, miR)

Munkáim alapvető részét képezi a mikroRNS expresszió vizsgálata a mellékvese daganataiban. A mellékvesekéreg-daganatokban a világon elsőként, a phaeochromocytomákban az elsők között közöltünk mikroRNS expressziós adatokat.

**A mikroRNS-ek rövid, 20-24 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló, egyszálú ribonukleinsav (RNS) molekulák, amelyek az RNS-interferencia endogén mediátorai.** Az RNS-interferencia jelenségét először kívülről bejuttatott (exogén) kétszálú RNS-ek hatására jelentkező RNS-lebomlásként írták le [113]. Az exogén RNS-ekből ún. rövid interferáló (short interfering) RNS-ek (siRNS) képződnek, amelyek komplementer szekvenciájú cél mRNS-eikhez kötődnek, és azokat rendkívül fajlagosan képesek gátolni. Az RNS interferencia a génexpresszió poszttranszkripció szabályozásának egyik alapvető mechanizmusa. A későbbi vizsgálatok során megfigyelték, hogy az RNS-interferencia jelensége nemcsak exogén RNS-ek útján, hanem a genomban, külön gének által kódolt endogén mikroRNS-ek révén is létrejön [6].

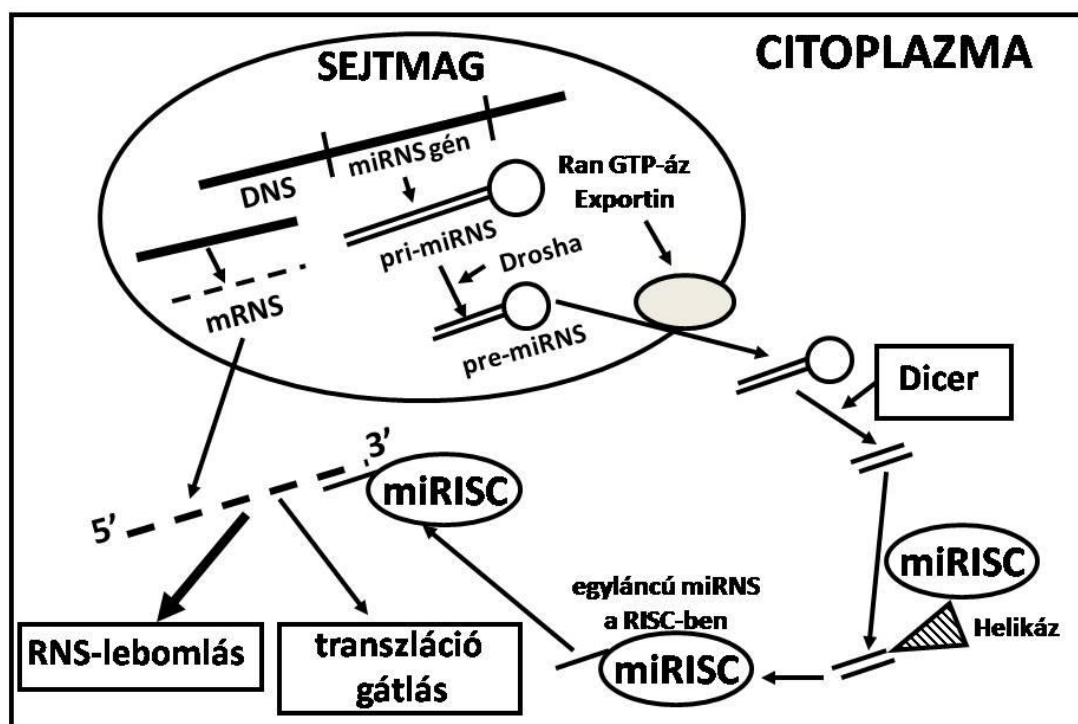
A mikroRNS-ek kifejeződése sejt- illetve szövetspecifikus [114]. Szabályozó hatásuk az ún. epigenetikai szabályozások körébe tartozik, mivel a gének kifejeződését a DNS megváltozása nélkül befolyásolják [6]. (Az epigenetikai szabályozás másik nagy területe a metilációs szabályozás [115]).

### 2.4.1. A mikroRNS-ek génjei és képződésük folyamata

MikroRNS-eket kódoló géneket számos faj, így az ember genomjában is azonosítottak. Emberben a 2011. áprilisi adatok alapján eddig összesen 1424 különböző érett mikroRNS létezését igazolták kísérletes úton (miRBase Release 17, [www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)). A mikroRNS gének jelentékeny része fehérjét kódoló gének intronjaiban valamint a genom eddig ismeretlen funkciójú, korábban részben szemét („junk”) DNS-nek tartott részében helyezkedik el [116, 117].

A mikroRNS-ek szekvenciája különböző fajok között nagyfokú konzerváltságot mutat és bioszintézisük fő lépései általánosnak tűnnek [116]. A mikroRNS-ek és a rövid interferáló RNS-ek érési folyamata számos pontot átfed egymással. Mindezek alapján a mikroRNS-ek és az RNS interferencia jelensége ősi molekuláris szabályozó mechanizmusnak tűnik. Az alábbiakban röviden ismertetem a mikroRNS-ek érési folyamatát.

A mikroRNS génekről először egy pri-mikroRNS molekula íródik át, amelyből a sejtmagban a Drosha komplex egy körülbelül 60-70 nukleotid hosszúságú, "hajtúkanyar" szerkezetű pre-mikroRNS molekulát szabadít fel [116, 118]. A pre-mikroRNS molekulák a sejtmagból aktív transzporttal jutnak a citoplazmába, ahol a Dicer enzim hasítja őket és kivágja belőlük a terminális hurkot. Az így keletkező mikroRNS duplex a mikroRNS indukálta csendesítő komplexbe (miRISC – miRNA induced silencing complex) épül be, ahol helikáz aktivitású enzimek hatására szétválik. Általában az 5'-3' irányú vezérszál stabilizálódik, míg a vele komplementer 3'-5' irányú szál (miRNS\*) lebomlik. Az így megjelenő, **miRISC-ben stabilizálódó, 20-24 nukleotid hosszúságú RNS molekulát nevezzük érett mikroRNS-nek** [116, 119] (5. ábra).



**5. ábra: A mikroRNS-ek képződésének sematikus ábrázolása**

*miRISC: miRNS indukálta csendesítő komplex; mRNA: hírvivő RNS; 3' UTR: 3' nem transzlálódó régió.*

### 2.4.2. A mikroRNS-ek nevezéktana

Az érett mikroRNS-eket a "miR-" előtag után feltüntetett sorszámmal különítjük el egymástól. A miR előtt feltüntetett hsa- előtag a mikroRNS humán eredetére utal. Előfordulhat, hogy ugyanazon mikroRNS-t egy fajon belül a genom különböző lókuszain elhelyezkedő több gén is kódol, és ezeket a mikroRNS sorszáma után kötőjellel feltüntetett újabb számmal különítik el (pl. miR-6-1, miR-6-2). Az egy-két nukleotidban különböző mikroRNS variánsokat betűjellel különítik el (pl.: miR-181a, miR-181b). Az is előfordul, hogy egyes mikroRNS prekursorok mindkét száláról érett mikroRNS képződik. Amennyiben az egyik karról szintetizált mikroRNS túlsúlyban van, a kisebb mennyiségben képződő mikroRNS-t csillaggal jelölik. A prekursor 5' száláról kihasítódó mikroRNS-t a mikroRNS sorszáma utáni -5p, míg a 3' szálról képződő mikroRNS esetén a -3p megjelölést alkalmazzák (pl.: miR-485-5p, miR-485-3p) [120].

### 2.4.3. A mikroRNS-ek hatásmódja

A mikroRNS-ek hatásmódját nem ismerjük minden részletében. A mikroRNS-eket kötő kötőhelyek a cél mRNS molekulák 3' UTR (nem transzlálódó – untranslated region) régiójában találhatók és egy mRNS-en általában több, akár több különböző mikroRNS kötésére is képes kötőhely fordul elő. [118]. A miRISC-ben kötött mikroRNS-ek e kötőhelyeket ismerik fel teljes vagy részleges komplementaritás fennállása esetén.

Míg növényekben a mikroRNS-ek és cél mRNS-eik között általában teljes a komplementaritás, addig állatokban ez döntően csak részleges [118]. Bioinformatikai elemzések alapján a hírvivő RNS-ek kb. 30 %-át szabályozhatják mikroRNS-ek. E rendszer bonyolultságát jelzi, hogy egy mikroRNS molekula több száz komplementer cél mRNS-t is szabályozhat, ugyanakkor egy mRNS is számos mikroRNS célpontja lehet [121, 122].

Míg a mikroRNS-ek hatása növényekben elsősorban a cél mRNS lebomlásán keresztül valósul meg, addig állatokban és emberben mind a cél mRNS lebomlása, mind a transzláció gátlása előfordul. Korábbi vizsgálatok arra utaltak, hogy teljes komplementaritás esetén elsősorban a lebomlás, míg részleges komplementaritás esetén inkább a transzláció gátlása a jellemző hatásmód [6]. Az utóbbi években a transzkriptomot és proteomot párhuzamosan vizsgáló tanulmányok [123-125] eredményei alapján ez a felfogás revízióra szorul. Az mRNS-ek és fehérjék kifejeződésének párhuzamos változásai alapján úgy tűnik, hogy a mikroRNS-ek

hatásában emlősökben is az mRNS-ek lebomlása az elsődleges, míg a transzláció gátlása csak másodlagos jelentőségű [124-126]. **Ez a felismerés szolgált alapjául annak a módszernek, amit a mikroRNS-ek mRNS célpontjainak szövetspecifikus predikciójára dolgoztunk ki.**

#### 2.4.4. A mikroRNS-ek élettani és kórélettani jelentősége

Számos alapvető élettani folyamatban igazolták a mikroRNS-ek szerepét, így az egyedfejlődés, differenciálódás, programozott sejthalál, sejtosztódás, vérképzés szabályozásában, immunológiai és endokrin folyamatokban [127, 128]. Az egyedfejlődés folyamatainak vizsgálata vezetett arra a felismerésre, hogy mikroRNS-ek kifejeződése mind időben, mind térben változik, sőt szövetspecifikus eltéréseket is mutat. Hatásuk is szövetspecifikus, amelynek keretében ugyanaz a mikroRNS egyes szövetekben proapoptotikus, míg másokban antiapoptotikus hatást fejthet ki [129, 130].

A mikroRNS-ek endokrin működésben játszott szerepét jelzi a *miR-375* hatása az inzulinszekréció szabályozásában. A *miR-375* ugyanis a *myotrophin (MTPN)* gén mRNS-ének gátlása révén a glükóz indukálta inzulin exocitózist befolyásolja [131]. A *miR-375* jelenlétét az agyalapi mirigyben is kimutatták, így felmerül annak lehetősége, hogy más peptidhormonok szekréciójának szabályozásában is szerepet játszhat [128, 132]. Egyes mikroRNS gének a vírusok genomjában is megtalálhatók, ami közrejátszhat a fertőzött sejtek ill. az immunológiai védekező mechanizmusok gátlásában [133].

A mikroRNS-ek megváltozott kifejeződését számos betegségben leírták, többek között érelmeszesedés [134], diabetes mellitus [135], autoimmun betegségek [136, 137], és neurodegeneratív kórképek [138] esetében. A legtöbb kísérletes eredményt azonban a mikroRNS-ek daganatos betegségekben betöltött szerepéről közölték.

#### 2.4.5. A mikroRNS-ek daganatokban játszott szerepe

Mivel a mikroRNS-ek célpontjai között számos tumorsuppresszor és protoonkogén funkciójú mRNS is szerepel, nem meglepő, hogy a mikroRNS-ek megváltozott kifejeződése a sejtosztódás és apoptózis egyensúlyának zavarához vezethet. A mikroRNS-eket kódoló gének körülbelül fele olyan sérülékeny kromoszómális régiókban helyezkedik el, amelyek eltéréseit (transzlokáció, delécio, amplifikáció) számos daganatban leírták [139].

A mikroRNS-ek expressziós mintázatainak eltéréseit az utóbbi években számos szolid és vérképzőrendszeri daganatban vizsgálták. Több különböző leukémia és lymphoma esetén írtak le jellegzetes mintázatbeli eltéréseket, a diagnózist megkönnyítő és akár prognosztikai jelentőségű markereket [140, 141]. A szolid daganatok között a legtöbb tanulmányban tüdő, gyomor, vastagbél, máj, emlő, prosztata és központi idegrendszeri daganatok mikroRNS mintázatát vizsgálták [7, 140, 142]. Több endokrin szervből kiinduló daganat jellegzetes mikroRNS mintázatát is közölték már (agyalapi mirigy, pajzsmirigy, mellékpajzsmirigy, endokrin pancreas, petefészek) [143-148].

A daganatban megváltozott kifejeződést mutató mikroRNS-ek a tumorsuppresszor-protoonkogén dichotómia alapján osztályozhatók. A fokozott kifejeződést mutató mikroRNS-eket onkogén („onkomir”), míg a csökkent expressziójú mikroRNS-eket tumorsuppresszor hatásúnak tartják [114]. Fontos ismét jelezni, hogy a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatásának következtében **ugyanaz a mikroRNS egyik szövetben daganatképződést elősegítő onkogén, míg másokban tumorsuppresszor hatású is lehet** [114]. A mikroRNS-ek utóbbi jellegzetessége a mikroRNS-ek befolyásolásán alapuló esetleges jövőbeli terápiás próbálkozásokat jelentősen nehezítheti.

A mikroRNS-ek kifejeződésnek vizsgálata daganatokban nemcsak a patogenezis megismerése szempontjából fontos, hanem közvetlen gyakorlati lehetősége is lehet. A **mikroRNS mintázat vizsgálatával olyan biomarkereket találhatunk, amelyek a jó- és rosszindulatú daganatok elkülönítésére alkalmasak lehetnek**. Különösen olyan szervek daganatai esetében leheez ez nagy jelentőségű, ahol a jó- vagy rosszindulatúság megállapítása szövettani vizsgálattal nehéz. A pajzsmirigy follicularis adenomája és carcinomája például citologiai vizsgálattal nehezen különíthető el, ezért bizonytalan esetben a rosszindulatú daganat lehetősége miatt sokszor thyreoidectomiát végeznek [149]. Weber és mtsai (2006) négy olyan mikroRNS-t azonosítottak, amelyek felhasználásával ezek egymástól megbízhatóan elkülöníthetőek [145]. Papilláris pajzsmirigyrákra jellemző mikroRNS markereket is találtak, és ezek között érdemes megemlíteni, hogy a miR-221 fokozott kifejeződése nemcsak a daganatban, hanem az azt övező, szövettanilag épnek tűnő szövetben is kimutatható volt. Ez a megfigyelés arra utalhat, hogy a mikroRNS-ek megváltozott kifejeződése a daganatképződés korai eseménye lehet, ill. vizsgálatuk a daganatok felismerését már korai stádiumban lehetővé teheti [144]. Egyes daganatokban,

például tüdőrákban és krónikus lymphocytás leukémiában a mikroRNS-ek prognosztikus markerként történő felhasználása is szóbajön [150, 151].

A mikroRNS-ek kifejeződésének mintázata a daganatok osztályozásában is segíthet. Mivel a mikroRNS-ekből jóval kevesebb van, mint mRNS-ekből és egy mikroRNS több mRNS-t is szabályozhat, a mikroRNS-ek segítségével kevesebb, jobban elkülönülő csoport felállítása lehetséges, mint az mRNS kifejeződésen alapuló transzkriptomikai vizsgálatok alapján [152].

A mikroRNS-ek patogenetikai szerepének felismerése új terápiás célpontok azonosítását is lehetővé teheti.

## 2.5. Rövid módszertani kitekintő: a bioinformatikai vizsgálatok

Az utóbbi évtized legjelentősebb előrelépései közé tartozik a nagy áteresztőképességű, bioinformatikai vizsgálatok mind szélesebb körű felhasználása. E vizsgálatok révén lehetségessé vált a **teljes genom génexpressziós vizsgálata, megállapítható, hogy mely gének és milyen mértékben fejeződnek ki egy adott szövetben (transzkriptomika, funkcionális genomika)**. A génexpressziós vizsgálatok módszertani hátterét a microarray (chip) metodika képezi. Ennek során szilárd hordozóra (általában üveglemezre) visznek fel, ill. egyes eljárások során eleve azokon szintetizálják a vizsgálandó génekre specifikus próbákat, és a szövetmintákból izolált mRNS-ekből készített, fluoreszcens festékkel jelölt cDNS, vagy cRNS izolátumot a lemezhez hibridizáltatva vizsgálják a gének szöveti kifejeződését. A korszerű technikákkal az összes ismert mRNS-re sőt azok variánsaira specifikus próbákat hordozó lemezek is elérhetőek. A microarray vizsgálatok kvantitatív eredményt adnak a génexpressziós mintázatra vonatkozóan [17, 153].

Lehetséges a kromoszómaeltérések bioinformatikai vizsgálata (komparatív genom hibridizáció (CGH)) ill. fehérjék (proteomika) és a kis molekulásúlyú metabolitok (metabolomika) tanulmányozása is. A génexpressziós és a kromoszómális eltérések közötti összefüggések vizsgálata is lehetséges. Mind az élettani, mind a kórélettani folyamatok tanulmányozhatók segítségükkel, ami olyan mennyiségű adat megismerését teszi lehetővé, ami e vizsgálatok bevezetése előtt elképzelhetetlen volt. Az eredmények értékeléséhez speciális számítástechnikai módszerek kifejlesztése volt szükséges [17, 154].

A génexpressziós microarray vizsgálatok egyik leghatékonyabb alkalmazási területe a daganatok kutatása [155]. Adott szerv jó- és rosszindulatú daganatainak, rosszindulatú daganatok különböző stádiumainak összehasonlításával azonosíthatók a patogenetikai mechanizmusok, a daganatok elkülönítését lehetővé tévő 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 hátterében 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, a különböző adathalmazokban közös patogenetikai utak azonosítása válhat lehetségessé.

### 2.5.1. A szabadon elérhető microarray adatbázisok

A génexpressziós vizsgálatok értékelhetőségét, a különböző tanulmányok eredményeinek összehasonlítását nagyban elősegítik azon adatbázisok, ahol a különböző munkacsoportok génexpressziós vizsgálatainak eredményeit szabadon elérhető formában tárolják. Az adatok felhasználásában fontos az egységes megjelenés, amit az ún. MIAME kritériumok (microarray vizsgálatokról minimálisan közzendő információ, Minimal Information About a Microarray Experiment) betartása fémjelez [156]). A MIAME kritériumokban fontos adatok közé tartoznak az eredeti nyers intenzitási („raw”) adatok, a nyers adatokból nyert végleges (normalizált) adatok, a minták típusára vonatkozó alapvető adatok (szöveti adatok, ismert mutációk, kezelések időtartama, körülményei stb.), a microarray metodika megnevezése, a génlisták és a módszerek leírása [156, 157]. Vizsgálatainkban a két leginkább elterjedt, MIAME követelményeknek megfelelő adatbázist használtuk: a National Center for Biotechnology Information (NCBI) által üzemeltetett Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) és a European Bioinformatics Institute (EBI) által működtetett ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk>) adatbázisokat.

### 2.5.2. Az mRNS microarray adatok statisztikai elemzése

A génexpressziós microarray vizsgálatok eredményeinek statisztikai elemzése kritikus jelentőségű. Ennek segítségével határozhatók meg azon gének listái, amelyek kifejeződésében a vizsgált csoportok között szignifikáns különbségek mutathatók ki.

Mivel a microarray vizsgálatokban több tízezer gén kifejeződésének egyidejű vizsgálata is lehetséges, ennek elemzése a klasszikus statisztikai módszerekkel nem kivitelezhető a hamisan pozitív eredmények nagy száma miatt. Szükséges szűrési feltételek bevezetése, amelyek révén a vizsgálatba vont génexpressziós változások száma csökkenthető. A szűrésre leginkább a kifejeződés mértékét használják („fold change filter”), amelynek során a legalább 1,5-2-szeres expressziós változásokat mutató géneket szokás kiválasztani.

A vizsgálati csoportok közötti szignifikáns génexpressziós vizsgálatokra két csoport vizsgálata esetén t-próbát, több csoport esetén egyutas varianciaanalízist (ANOVA) alkalmazunk. Amennyiben a csoportok több tulajdonság szerint osztályozhatók, kétutas ANOVA használata is lehetséges. A varianciaanalízis alkalmazása után, a csoportok közötti különbségek kimutatására *post hoc* teszt végzendő, amelyek közül a microarray vizsgálatok során elsősorban a Tukey-féle post hoc tesztet használjuk. Nagyszámú vizsgált tulajdonság esetén azonban szükség van szigorú korrekcióra az álpozitív esetek csökkentésére. A microarray vizsgálatok során erre az ún hamis felismerési arány (False Discovery Rate, FDR) meghatározása szükséges a Benjamini-Hochberg-féle többszörös összehasonlítási korrekció (multiple testing correction) módszerrel [154, 158].

### **2.5.3. Speciális bioinformatikai módszerek a microarray adatok további elemzésére**

A génexpressziós adatok fent bemutatott statisztikai elemzése mellett microarray vizsgálataink során további bioinformatikai módszereket is alkalmaztunk, így a hálózat- és útvonalelemzést, valamint a Géncsoport Dúsulási vizsgálatot (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA). E módszerek nem egy-egy gén patogenetikai szerepét vizsgálják, hanem a génlisták globális rendszerbiológiai szemléletű elemzését teszik lehetővé.

#### **2.5.3.1. Hálózat- és útvonalelemzés (Ingenuity Pathway Analysis (IPA))**

A hálózat- és útvonalelemzés során a vizsgáló által bevitt génlistákat egy adatbázisra vetítik és ez alapján számítástechnikai megközelítéssel választhatók ki azon molekuláris hálózatok és útvonalak, amelyek az adott génlista eredményei alapján a szövetben megváltoztak, és így patogenetikai jelentőségűek lehetnek.

A vizsgálatainkban alkalmazott IPA adatbázisában (Ingenuity Pathway Analysis Knowledge Base, Ingenuity Systems, [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com), Redwood City, USA) a génekről, fehérjékről elérhető szakirodalmi adatok lehető legteljesebb integrációjára törekednek, amelyek így alkalmasak lehetnek az informatikai elemzésre. Különösen a fehérje-fehérje kölcsönhatások, szinergista és antagonisták hatások, génexpresszió szintű szabályozások bevonására helyezik a hangsúlyt. Az adatbázis egy hatalmas molekuláris hálózatot képez,

amiben gráfelméleti analógia alapján a hálózat csúcspontjait a fehérjék, a köztük lévő éleket pedig a kölcsönhatások jelentik.

A biológiai rendszerekre az ún. skálafüggetlen hálózatok előfordulása jellemző. A skálafüggetlenség azt jelenti, hogy a hálózat csúcsaihoz kapcsolódó élek számának (fokszámának) eloszlása egy hatványfüggvénnyel írható le. Minél több kapcsolat (él) jellemmez egy adott csúcspontot, az annál fontosabb és elvesztése annál súlyosabb következménnyel jár a hálózat stabilitására nézve [159].

A molekuláris útvonalak olyan hálózatok, amelyekben az egyes gének és fehérjék közötti kapcsolatokat kísérletesen igazolták, így azok működési egységet képeznek. Ezen útvonalak közé tartoznak például az alapvető metabolikus folyamatok (glikolízis, glükoneogenezis, aminosavak képződése, koleszterin bioszintézis), jelátviteli útvonalak, a sejtciklus G1/S és G2/M átmenete és egyes betegségekre jellemző útvonalak is (pl. Alzheimer-kór).

Az útvonalelemzés során az IPA algoritmus azt vizsgálja, hogy a felhasználó által megadott génlista milyen mértékben fed át az adatbázisban szereplő útvonalakkal. A második lépésben a szignifikancia meghatározásának megállapítása céljából annak lehetőségét elemzi, hogy az átfedés véletlenszerű kialakulásának mekkora az esélye. Szignifikáns ( $p < 0,05$ ) átfedés esetén állítható, hogy a megadott génlista méretének függvényében az átfedés kialakulásának véletlenszerű megjelenése elhanyagolható.

E módszerek révén úgy választhatók ki a biológiai jelentőségű útvonalak, hogy azokat a vizsgáló előfeltevései (prekonceptiói) nem befolyásolják. Így olyan útvonal is felismerésre kerülhet, ami szokatlan, akár korábbi ismereteink alapján valószínűtlennek tűnik. A valószínűtlennek tűnő útvonalak között lehetnek éppenséggel azok, amelyek tudományos áttörés lehetőségét foglalhatják magukba.

Fontos azonban hangsúlyozni, hogy **a génexpressziós eredmények vizsgálata nem egyenértékű a patogenezis vizsgálatával, hiszen lényegében egy génexpressziós pillanatképet elemzünk, és nem lehetünk biztosak abban, hogy tényleg az okokat és nem a következményeket vizsgáljuk.**

Az IPA módszer hátránya, hogy a génexpresszió mennyiségi változásait nem veszi figyelembe. Mivel génlisták közötti átfedéseket vizsgál, az expressziós változások iránya és mértéke csak az ábrázolás során kerül feltüntetésre. A bevitt génlisták ez által nagymértékben befolyásolják az elemzés kimenetelét. Ezen probléma kiküszöbölésére képes

a Géncsoport Dúsulás Vizsgálata (GSEA), amely segítségével a génexpressziós változások és génlisták közötti kapcsolatok közvetlen vizsgálata is lehetséges.

### **2.5.3.2. A Géncsoport Dúsulás Vizsgálata (Gene Set Enrichment Analysis (GSEA))**

A Géncsoport Dúsulás Vizsgálata (GSEA) során a készítőik által megadott, illetve a felhasználó által összeállított génlistákat hasonlíthatjuk össze az eredeti, nyers microarray adatokkal. A vizsgált génlisták lehetnek irodalmi adatok alapján közös működési egységet alkotó gének, transzkripció faktorok által szabályozott gének, vagy egy kromoszómarégióban csoportosuló gének is.

A GSEA módszerét eredetileg a génexpressziós változások finom elemzésére fejlesztették ki. A 1,5-2-szeres génexpressziós változásokra alapuló szűrők alkalmazásával ugyanis elvesznek a kismértékű eltérések, amelyek azonban a biológiai szabályozásban szintén fontosak lehetnek.

A GSEA első lépésében az algoritmus a géneket a szerint rangsorolja, hogy az eredeti microarray adatok alapján a két vizsgált csoport között milyen fokú expressziós változás mutatható ki. 1-es sorszámmal a legnagyobb expressziós növekedést, míg legnagyobb sorszámmal a legnagyobb expressziós csökkenést mutató gént jelöli. Második lépésében azt vizsgálja, hogy az adott génlistában a fokozott vagy csökkent expressziót mutató gének dúsulnak-e fel nagyobb számban [160].

**Vizsgálatainkban a GSEA-t két megközelítésben is használtuk:** 1. a mikroRNS-ek szövetspecifikus cél mRNS (target) predikciója során a mikroRNS-ek expressziójával ellentétes irányban változó cél mRNS-ek kiválasztására (lásd. a következő szakasz); 2. a mellékvesekéreg-daganatok bioinformatikai metaanalízise során a GSEA génlistái közül a kromoszómális elhelyezkedés szerinti listákat használtuk a génexpressziós és kromoszómális változások korrelációja céljából. Amennyiben az adott génlistában a felül-, illetve alulexpresszált gének dúsulnak fel, akkor feltételezhető, hogy az adott kromoszómarégió kódolt gének egyirányú expressziós változásainak hátterében citogenetikai okok állhatnak. A kromoszómarégió veszteség az expressziós csökkenést mutató gének dúsulása, míg a kromoszómarégió nyereség az expressziós növekedést mutató gének halmozódása jellemzi [160]. Az eredmények még pontosabbá tehetők, ha nem irodalmi adatokat, hanem

ugyanazon mintákban végzett citogenetikai és génexpressziós vizsgálatok eredményeit elemezzük.

#### 2.5.4. A mikroRNS-ek potenciális célmolekuláinak azonosítása bioinformatikai módszerekkel

A mikroRNS-ekkel foglalkozó vizsgálatok egyik legnagyobb kihívását a mikroRNS-ek biológiai hatásának felderítése, a potenciális mRNS célpontok azonosítása jelenti. Ezek meggyőző igazolása csak kísérletes úton lehetséges, amire egy vagy néhány mikroRNS-mRNS kapcsolat igazolására elsősorban a luciferáz aktivitás mérésén alapuló preMir transzfekciós módszerek [161, 162], míg nagyszámú kapcsolatra az újonnan kifejlesztett izotópjelzésen alapuló SILAC ("stable isotope labeling with amino acids in cell culture") ill. pSILAC (pulzatilis SILAC) módszerek alkalmasak [124, 125]. E kísérletes módszerek azonban bonyolultak, kifejezetten költség- és időigényesek, ami alapján nem meglepő, hogy jelenleg csak az óriási számú feltételezett mikroRNS-mRNS kapcsolatoknak csak a töredékét igazolták kísérletes úton (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/>) [163].

**Az cél mRNS-ek (targetek) azonosítására elsősorban „in silico” módszereket alkalmaznak**, ami információt nyújthat a mikroRNS-ek biológiai jelentőségéről, azonban ezeket biológiailag relevánsnak csak kísérletes validálásuk után fogadhatjuk el.

A mikroRNS-mRNS kapcsolatok felderítésére különböző matematikai algoritmusokat fejlesztettek ki, amelyek segítségével teljes vagy részleges komplementaritást mutató, evolúciós szempontból különböző konzerváltsági fokú miRNS-kötő helyeket keresnek a teljes genomban. Az algoritmusok alapvető elemét képezi az mRNS-mikroRNS fizikai kapcsolataért elsősorban felelős „mag” (seed) régió vizsgálata [116].

Három algoritmust használnak leggyakrabban ezekben a vizsgálatokban: a **TargetScan** ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) [121, 122, 164], a **PicTart** ([www.pictar.org](http://www.pictar.org)) [165, 166] és a korábban **miRBase** ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)), jelenleg **MicroCosm** néven ismert algoritmust (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/>) [167-168]. Jelenleg nincs egyértelmű állásfoglalás arról, hogy ezen algoritmusok közül melyik a legjobb, vagyis melyik eredményei állnak legközelebb a biológiai valósághoz.

A különböző módszerek eredményei egy adott mikroRNS-re vagy mRNS-re az adatbázisok és algoritmusok eltérései következtében jelentősen különbözhetnek. Mivel

eltérő mikroRNS készletet használnak, előfordulhat, hogy egy adott mikroRNS szekvenciát nem minden algoritmus vizsgál. Szintén különbözőek a vizsgált mRNS 3' UTR adatbázisok és az ezek jelzésére használt azonosítók is. Az azonosítók különbözősége nagymértékben nehezíti a cél mRNS listák összehasonlítását.

E predikciós algoritmusok eredményei csak bioinformatikailag valószínűsített célmolekuláknak tekinthetők, melyek biológiai relevanciája nem egyértelmű. Több kísérleti eredmény szól arról, hogy a legvalószínűbbnek kiadott kapcsolatokat nem sikerül igazolni, sőt olyan is ismert, hogy pont olyat igazoltak, amit a predikciós algoritmusok nem mutattak ki [169]. Komoly probléma az is, hogy az algoritmusok egy adott mikroRNS-re több száz, sokszor több ezer potenciális mRNS célpontot adnak ki, amelyek közül a biológiailag releváns mRNS-ek kiválasztása nehéz.

### 2.5.5. Szekvenciavariánsok *in silico* azonosítása

Napjainkra a nyilvánosan elérhető adatbázisokban óriási mennyiségű szekvenálási eredmény vált elérhetővé. Ebben a Humán Genom Projekt eredményessége is szerepet játszik és a nagy áteresztőképességű szekvenálási módszerek elterjedésével a szekvenciaadatok további számottevő bővülése várható.

A genom variabilitásának meghatározó elemeit alkotják az egyetlen nukleotidot érintő polimorfizmusok (SNP: single nucleotide polymorphism), amelyek minden 1000., sőt újabb adatok szerint akár minden 200-300. bázispárt is érinthetik [155, 170]. A 3,2 milliárd bázispárból felépülő humán DNS-ben ez elképesztő variabilitást eredményezhet, és e polimorfizmusokat összefüggésbe hozták számos betegségre vonatkozó hajlammal és a gyógyszerek hatásában megfigyelhető egyének közötti különbségekkel [171, 172].

A számos közölt szekvencia *in silico* vizsgálatával szekvenciavariánsok azonosítása is lehetségessé vált. Mivel a polimorfizmus definíciójában annak populációs gyakorisága meghatározó jelentőségű (polimorfizmusról 1% feletti populációs gyakoriság esetén beszélhetünk [173]) és az *in silico* vizsgálatok során e gyakorisági adatok nem állnak rendelkezésre, célszerűnek tartom az *in silico* azonosított szekvenciaeltérések megjelölésére a szekvenciavariáns megjelölést.

Korábbi munkáimban *in silico* megközelítéssel vizsgáltam a multiplex endokrin neoplázia 1-es és 2-es típusáért felelős gének (MEN1 gén és RET), a hisztamin bioszintézis,

hatás és lebomlásért felelős fehérjék, a glükokortikoidreceptorok és a szteroidhormon bioszintézis és metabolizmus enzimeit kódoló gének szekvenciavariánsait. Ennek során a gének ismert, vad típusú szekvenciáit a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)) program segítségével vettem össze nyilvános adatbázisban elérhető szekvenciákkal [174].

E módszer révén számos már leírásra került, és ezek mellett több ismeretlen szekvenciavariáns is sikerült azonosítani. E megközelítés komoly hátránya, hogy a molekuláris biológiai módszerek hibái (pl. polimeráz láncreakció során keletkező nukleotid párosodás zavarok, szekvenálási hibák) szekvenciavariánsként tűnnek fel és így lehetséges, hogy az *in silico* azonosított variánsok egy része nem valós, csak műterméket jelez [175]. Az *in silico* szekvenciavariáns keresés során azonosított variánsok kísérletes és populációgenetikai megerősítése szükséges. Az *in silico* szekvenciavariáns keresés jelentősége napjainkra már csökkent, mivel rendelkezésre állnak a nagy áteresztőképességű SNP azonosításra alkalmas molekuláris biológiai/bioinformatikai módszerek, amelyek segítségével az SNP-k nagy számban közvetlenül vizsgálhatók a biológiai mintákban. A genom nehezen vizsgálható (leginkább kópiaszám változásokat tartalmazó) részeiben létjogosultsága azonban máig megtartott.

### 3. CÉLKITŰZÉSEK

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 phaeochromocytomára hajlamosító öröklődő daganatszindrómák közül a multiplex endokrin neoplasia 2-es típus (MEN2) háttérében álló mutációk vizsgálata. A MEN2-re hajlamosító *RET* protoonkogén két mutációjával társuló egyedi klinikai fenotípusok jellemzése.

## 4. BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

### 4.1. Betegek és szövetminták

A vizsgált mellékvesekéreg szövetminták (n=58) közül 15 ép mellékvesekéregből, 18 hormonálisan inaktív adenomából (IA), 8 kortizoltermelő adenomából (CPA), 9 aldosterontermelő adenomából (APA) és 8 mellékvesekéreg-carcinomából (ACC) származott (a mellékvese-daganat mintákat döntően a SE ÁOK I. Sebészeti Klinikán, kisebb részben a SE ÁOK Transzplantációs és Sebészeti Klinikán végzett műtétek során szereztük be, ETT-TUKEB engedély: 230-15/2006-1018EKU). A mellékvesekéreg-daganatban szenvedő betegek adatait az **1. táblázat A részében** mutatom be. Valamennyi mellékvesekéreg-carcinoma kortizoltermelő daganat volt. Egészséges mellékvesekéreg szövetet rosszindulatú vesedaganat miatt történt műtét során eltávolított ép mellékvesékből nyertünk (SE ÁOK Urológiai Klinika, ETT-TUKEB engedély: 84-60/2008-1018EKU). A szövetmintákat folyékony nitrogénben tároltuk.

A phaeochromocytomák között (n=33) 9 sporadikus benignus, 8 MEN2, 6 VHL, 5 NF1 és 5 sporadikus recidiváló daganatot vizsgáltunk (primer daganatok) (**1. táblázat B**). Valamennyi vizsgálatba bevont betegünkénél genetikai vizsgálat történt a *MEN2*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC* és *SDHD* gének direkt szekvenálásával (lásd. később). Az NF1 diagnózist klinikai kritériumok alapján állítottuk fel. *SDH* gén mutációt a vizsgálatba bevont betegeink között nem találtunk. Az öröklődő phaeochromocytomában szenvedő betegek – legjobb tudomásunk szerint - nem álltak egymással rokoni kapcsolatban. A sporadikus phaeochromocytomák csoportjába a fenti gének csírasejtes mutációinak és az NF1 fennállásának klinikai kizárása esetén soroltunk be az eseteket. Mivel az eltávolított phaeochromocytoma szövettani vizsgálatával annak rosszindulatúsága nem állapítható meg, csak áttétek jelenlétében, a phaeochromocytomában szenvedő betegek hosszas követése szükséges. A vizsgálatunkba bevont esetekben, a daganat eltávolítása után még átlagosan 5-7 éves nyomonkövetés történt. Azokban az esetekben, amikor csak rövidebb követési idő volt lehetséges, a daganatot akkor minősítettük jóiindulatúnak, ha átmérője 5 cm-nél kisebb volt, a műtét előtt vagy azt követően végzett képalkotó vizsgálat áttétet nem jelzett, nem alakult ki a műtétet követően recidíva, és a Ki-67 immunhisztokémia nem utalt rosszindulatúságra (<1%) [4]. A recidiváló phaeochromocytoma csoportban olyan eseteket

vizsgáltunk, ahol a primer pheochromocytoma eltávolítását követően az azonos oldali mellékvesében a daganat kiújult. Munkánk során a primer daganatokat vizsgáltuk.

| A.                                       | Normális  | IA       | APA        | CPA      | ACC         |
|------------------------------------------|-----------|----------|------------|----------|-------------|
| Betegek száma                            | 15        | 18       | 9          | 8        | 8           |
| Nemek aránya<br>(nő/férfi)               | 11/4      | 18/0     | 6/3        | 7/1      | 6/2         |
| Átlagéletkor a műtét<br>idején (év ± SD) | 44,1±12,9 | 49,7±8,4 | 45,9± 18,0 | 38,3±9,6 | 55,9 ± 16,4 |

| B.                                       | SB        | SR        | MEN2      | VHL       | NF1       |
|------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Betegek száma                            | 9         | 5         | 8         | 6         | 5         |
| Nemek aránya<br>(nő/férfi)               | 6/3       | 2/3       | 6/2       | 3/3       | 4/1       |
| Átlagéletkor a műtét<br>idején (év ± SD) | 44,8±18,1 | 46,0±15,3 | 38,8±10,2 | 44,8±20,8 | 38,7±16,6 |

**1. táblázat: A mellékvese daganatos betegek fontosabb jellemzői. A: mellékvesekéreg-daganatok, B: pheochromocytoma**

IA: hormonálisan inaktív adenoma, APA: aldosterontermelő adenoma, CPA: kortizoltermelő (Cushing) adenoma, ACC: mellékvesekéreg-carcinoma, SB: sporadikus benignus pheochromocytoma; SR: sporadikus recidíváló pheochromocytoma; MEN2: multiplex endokrin neoplasia 2-es típusához társuló pheochromocytoma; VHL: von Hippel-Lindau szindrómához társuló pheochromocytoma; NF1: 1-es típusú neurofibromatosisban előforduló pheochromocytoma; SD: standard deviáció

Szemben a mellékvesekéreg-daganatokon végzett vizsgálatainkkal, a pheochromocytomák vizsgálatához nem állt rendelkezésre megfelelő számú fagyasztott szövetminta. A pheochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatát paraffinba ágyazott szövetblokkok (FFPE: formalin fixált paraffinba ágyazott/formalin-fixed paraffin-embedded) vizsgálata révén tanulmányoztuk. Az FFPE blokkokat a Semmelweis Egyetem ÁOK I. és II. Patológiai Intézetével történt együttműködés keretében szereztük be (ETT-TUKEB engedély: 8-258/2009-1018EKU). A felhasznált blokkok életkora 0,2-14,6 év között mozgott. Három

phaeochromocytoma (1 sporadikus benignus, 1 sporadikus recidíváló, 1 MEN2) esetében mind FFPE, mind fagyasztott minta elérhető volt.

A MEN2 fenotípus sajátosságait egy a Cys609Ser ill. egy a Cys611Tyr mutációt hordozó család több tagjának vizsgálatával elemeztük.

## 4.2. Sejtenyészetek és *in vitro* kezelések

A hypothalamikus GnRH-neuronok citokin és citokinreceptor expresszióját és a citokinek hatásait e sejtekre GnV-4 patkány hypothalamus sejtvonalon vizsgáltuk. A GnV-4 sejtvonalat felnőtt patkány hypothalamikus sejtenyészetek kondicionális immortalizálásával állították elő. A sejtek az előállításuk során alkalmazott módosított Tet-On rendszer következtében doxiciklin jelenlétében osztódnak, míg annak hiányában osztódásuk megáll, differenciálódnak [176] és az érett GnRH-neuronoknak megfelelő morfológiát vesznek fel [97, 98]. A sejtvonalat Neurobasal A tápoldatban tartottuk fenn B27 és borjúsérum hozzáadásával (Invitrogen), amit a sejtek differenciálódása érdekében három napig doxiciklin mentes DMEM tápoldatra cseréltünk. A kezeléseket 4,5 g/l glükózt tartalmazó sérumentes DMEM tápoldatban végeztük 12 órás séruméheztetést követően. A GnV-4 sejtvonalat oncostatin M (OSM), IL-6 és NMDA (N-metil -D-aszpartát) kezelésnek vetettük alá több kezelési időben.

A korai gének (*c-fos*, *c-jun*, *Egr-1* (early growth response-1), *MKP-1* (mitogén aktiválta kináz foszfatáz 1), *Myd118* és *GADD45 $\gamma$*  mRNS expressziójának vizsgálatához a GnV-4 sejteket 30 percig kezeltük rekombináns egér OSM-mel (R&D Systems) 10–250 ng/ml koncentrációban. Az OSM kezeléseket a MAPK jelátviteli utat gátló PD98059-el (50  $\mu$ M, Sigma) történt 1 órás előkezelést követően is megismételtük. Az OSM és IL-6 (Peprotech) jelátvitelének (MAPK útvonal) tanulmányozására 2-60 perc közötti kezelési időket és 100 ng/ml kezelési koncentrációt használtunk. Az OSM GnRH expresszióra kifejtett hatását 6 órás kezelésekből, 2-től 100 ng/ml-ig terjedő koncentrációk mellett vizsgáltuk 50  $\mu$ M NMDA mellett vagy a nélkül. Az OSM degradáció gátló hatásának kizárása céljából a kezeléseket proteáz inhibitor aprotinin (Trasyolol) jelenlétében is megismételtük.

Az OSM GnRH expresszióra kifejtett hatását primer patkány hypothalamus tenyészeteken is vizsgáltuk, amelyeket dekapitációval leölt 10-12 hetes nőstény Wistar patkányokból állítottunk elő [177] (az állatkísérletekhez a svájci Állategészségügyi Hatóság

engedélyével rendelkezünk). A kimetszett hypothalamust 0,06 % glükózt és 100 IU/100 µg/ml penicillin/streptomycint tartalmazó PBS-pufferben diszpergáltuk Pasteur-pipettán történő többszörös átfújással. A centrifugálás során nyert üledéket 5 ml Neurobasal tápoldatban (Gibco) reszuszpendáltuk, ami 0,04 % B27 adalékot, 500 µM glutamint és 25 µM glutamátot (Sigma) tartalmazott. A sejteket 400.000 élő sejt/lyuk sűrűségben hatlyukú lemezekre ültettük, amelyeket előzetesen 5 µg/ml poli-D-lizinnel (Sigma) vontunk be. A sejteket 500 µM glutamint és 25 µM glutamátot (Sigma) tartalmazó Neurobasal A (Invitrogen) tápoldatban tenyésztettük a tenyésztőfolyadék felének negyednaponta történő cseréjével. A sejtek az izolálás után 3-4 héttel váltak kezelésre alkalmassá. Az OSM kezelés ugyanúgy zajlott, mint a GnV-4 sejtek esetében.

### 4.3. Molekuláris genetikai és molekuláris biológiai vizsgálatok

Az alábbi részben röviden bemutatom a mikroRNS, mRNS és fehérje szintű vizsgálatok során alkalmazott módszereinket. Tekintettel arra, hogy vizsgálataink során több különböző statisztikai módszer alkalmazása volt szükséges, ezeket az adott részekben külön-külön mutatom be.

#### 4.3.1. A mikroRNS-ek kifejeződésének vizsgálata

A mikroRNS vizsgálatokhoz teljes RNS-t izoláltunk: fagyasztott mellékvesekéreg szövetekből Trizol reagensen alapuló módszerrel (TriReagent, Molecular Research Center Inc.), a paraffinos szövetblokkok 5x15 µm vastagságú szeleteiből 100%-os xilénnel végzett deparaffinálás után Ambion RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Applied Biosystems/Ambion) felhasználásával. Az RNS koncentrációjának mérését NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific), míg az RNS integritásának meghatározását Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Tech. Inc.) segítségével végeztük. A fagyasztott mintákat csak abban az esetben használtuk, ha az RNS integritás száma (RIN: RNA Integrity Number) meghaladta a 7,0-et, DNS kontaminációtól mentesek voltak, és az A260/280 valamint az A260/230 arányuk elérte az 1,8-at. A paraffinos mintákból izolált RNS-ek integritása vizsgálati kritériumként nem volt használható.

A mikroRNS profil vizsgálata a mellékvesekéreg szövetmintákon polimeráz láncreakción (PCR) alapuló Taqman TLDA kártyák (Taqman Low Density Array Human

MicroRNA Panel v1.0; Applied Biosystems) felhasználásával, míg **phaeochromocytomák esetében** Agilent platformon **microarray vizsgálattal** (Agilent Human miRNA Microarray Rel12.0) történt. A két eltérő megközelítésnek technikai okai voltak, ugyanis az elsőként, mellékvesekéreg-daganatokon végzett vizsgálataink idején a Semmelweis Egyetem Microarray Core Facility-ben a mikroRNS microarray metodika még nem került beállításra.

**A TLDA panelen 16 mellékvesekéreg mintát vizsgáltunk** (4 ép mellékvesekéreg, 4 hormonálisan inaktív, 4 kortizoltermelő és 4 malignus). 100 ng teljes RNS-t cDNS-sé írtunk át. A reverz transzkripcióhoz (RT) Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kitet és reverz transzkripció primer keveréket tartalmazó Multiplex RT for Taqman MicroRNA Assays (Applied Biosystems) kiteket alkalmaztunk a gyártó protokolljának megfelelően. A cDNS-eket ezt követően TLDA Human MicroRNA Panel v1.0 platformon vizsgáltuk, amely 365 humán mikroRNS egyidejű vizsgálatát tette lehetővé. A polimeráz láncreakciót 7900 HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) készüléken a gyártó instrukcióinak megfelelően végeztük. A polimeráz láncreakcióra jellemző amplifikációs görbék elemzéséhez és a nyers ciklus küszöbérték (CT, cycle threshold) értékek meghatározásához az SDS Programot (Applied Biosystems) használtuk. E vizsgálatokban „housekeeping” kontroll (referencia) génnek a CT értékek mintánkénti szórás vizsgálata alapján az *RNU48*-at választottuk. Az expresszió mértékét a normalizált értékeket összehasonlító CT (dCT) módszerrel [178] határoztuk meg.

A vizsgálati csoportok között szignifikánsan eltérő expressziót mutató mikroRNS-ek azonosításához egyutas varianciaanalízist végeztünk, majd Scheffé és Tukey HSD post hoc tesztek következtek többszörös összehasonlítás céljából. A statisztikai elemzést SPSS 15.0 for Windows (SPSS Inc.) programmal végeztük.

A 16 vizsgált minta miRNS expresziós mintázaton alapuló hierarchikus klaszter (cluster) analízisét a BRB Array Tools (Version 3.6.0 Stable Release, fejlesztette Dr. Richard Simon és Amy Peng Lam) programmal végeztük.

**A phaeochromocytomák mikroRNS expresszió mintázatát 21 paraffinos** (6 sporadikus benignus, 5 sporadikus recidíváló, 5 MEN2, 5 VHL) **mintán vizsgáltuk**. Mivel az FFPE minták mikroRNS mintázat meghatározásra történő alkalmazhatóságára vizsgálatainkat megelőzően nem voltak adatok, három minta esetében fagyasztott-FFPE mintapárok (1 sporadikus benignus, 1 sporadikus recidíváló, 1 MEN2) vizsgálatával ellenőriztük ennek kivitelezhetőségét. A felhasznált 8x15k Agilent Human miRNA Microarray Rel 12.0 (Agilent

Tech. Inc.) lemezek összesen 955 mikroRNS expressziójának párhuzamos vizsgálatát tették lehetővé. A mikroRNS microarray során egyszínű, fluoreszcens festékkel (Cyanine 3, Cy 3) jelölt célmolekulákat alkalmaztunk.

100 ng teljes RNS defoszforilálását és denaturálását követően az RNS mintákat fluoreszcens festékkel jelöltük a miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent Tech. Inc.) felhasználásával. A jelölt minták tisztítása ezt követően Micro Bio-Spin P-6 Column (Bio-Rad Laboratories) oszlopokon történt, majd hibridizációs mixet készítettünk. A minták microarray lemezekhez történő hibridizációjához az inkubáció 20 órán keresztül 55°C-on történt. Ezt követően Triton X-102-t tartalmazó pufferrel mosás következett, majd az eredményeket az Agilent DNA Microarray Scanner (Agilent Tech. Inc.) segítségével olvastuk le. Az eredményeket a Feature Extraction 9.5.3 (Agilent Tech. Inc.) szoftverrel elemeztük. A mérési eredmények értékelése során az intenzitási adatok mellett a Feature Extraction szoftver egy háromfokozatú skálán értékeli a mért adatok minőségét: A („absent”) jelzést kapnak az alsó méréshatár alatti, P („present”) jelölést a jól mérhető és M („marginal”) kódot a felső méréshatár feletti intenzitás értékek. Ezt követően a gyártó ajánlásának megfelelően a GeneSpring Software 10.1 (Agilent Tech. Inc.) alkalmazásával a "Teljes Gén Szignál" (TGS, "Total Gene Signal") értékeket a „nyers” ("raw") értékek 75. percentilisére normalizáltuk, és az alapvonalat ("baseline") az egyes array-k mediánjára transzformáltuk. Szűrési feltételeinket az alábbiakban határoztuk meg: 1.) A szignifikáns expressziós eltérést mutató mikroRNS-ek azonosítását megelőzően az általánosan elfogadott szűrési kritériumokat alkalmaztuk: 1. a vizsgált próba legalább egy vizsgált csoport összes mintájában jól, illetve a felső méréshatár felett legyen kimutatható és az expressziós változás mértéke ("fold change") >2; 2.) A normalizált microarray adatokat a referenciaként használt referencia („housekeeping”) mikroRNS kiválasztására is felhasználtuk, amihez szigorú szűrési kritériumot alkalmaztunk (a próbának minden mintában jól, illetve a felső méréshatár felett kimutathatónak kellett lennie) 3.) Az FFPE minták használhatóságára irányuló három fagyasztott-paraffinos mintapáron végzendő vizsgálatunkhoz Zhang és munkatársainak ajánlása nyomán az array-vizsgálatok között (interarray) normalizálást és szűrést nem végeztünk [179].

A párosított FFPE és fagyasztott minták mikroRNS mintázatának összehasonlítása céljából a nyers TGS értékek korreláció vizsgálata során a Spearman és Kendall tau non-

parametrikus korrelációs koefficienseket a 3-3 párosított minta esetén egyenként, valamint az FFPE és fagyasztott csoport átlagok között is meghatároztuk.

A mikroRNS-ek normalizált jelintenzitás értékeit szűrést követően GeneSpring Software 10.1 (Agilent Tech. Inc.) segítségével hierarchikus klaszter analízisnek vetettük alá. A statisztikai elemzést a GeneSpring Software 10.1 (Agilent Inc.) és STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc.) programok segítségével végeztük el. Egyutas varianciaanalízist és Tukey HSD post hoc tesztet használtunk a szignifikánsan eltérő expressziót mutató mikroRNS-ek azonosítására. A microarray vizsgálatot követő valós idejű qRT-PCR validáláshoz szükséges referencia ("housekeeping") génként alkalmazható mikroRNS géneket a minták között legalacsonyabb szórást (SD) mutató mikroRNS-ek közül a Microsoft Office Excel 2003 program segítségével határoztuk meg.

A mintaszámok növelését és a szignifikáns expressziós eltérések validálását mind a mellékvesekéreg-daganat, mind pheochromocytoma mintákon Taqman próbákkal, kvantatív valós idejű (real time) reverz-transzkripció polimeráz láncreakció (qRT-PCR) módszerrel végeztük.

#### **4.3.2. A mikroRNS expressziós eredmények validálása qRT-PCR módszerrel**

A mellékvesekéreg-daganatok vizsgálata során 14 szignifikánsan eltérő expressziót ( $p < 0.05$ ) mutató mikroRNS-t választottunk ki további validálás és esetszám növelés céljából. Ezek közé tartozott a statisztikailag legerősebb 10 mikroRNS ( $p < 0.01$ ), valamint négy olyan további mikroRNS ( $p < 0.05$ ), amelyek esetén az expressziós különbségek (fold change) legalább háromszorosak voltak. A validálást összesen 36 ép és daganatos mellékvesekéreg szöveten (10 ép mellékvese, 10 inaktív adenoma, 9 Cushing-adenoma, 7 carcinoma) végeztük el. Az egyedi mikroRNS-ekre specifikus RT és real-time PCR primereket tartalmazó Taqman MicroRNA Assay-k a következők voltak (zárójelben a specifikus Taqman MicroRNA Assay-k számai): *hsa-miR-181b* (4373116), *hsa-miR-181d* (4373180), *hsa-miR-184* (4373113), *hsa-miR-196b* (4395326), *hsa-miR-210* (4373089), *hsa-miR-214* (4395417), *hsa-miR-215* (4373084), *hsa-miR-222* (4395387), *hsa-miR-375* (4373027), *hsa-miR-424* (4373201), *hsa-miR-503* (4373228), *hsa-miR-506* (4373231), *hsa-miR-511* (4373236) és *hsa-miR-615* (4380991) (Applied Biosystems). Referencia ("housekeeping") génnek az *RNU48*-at (4373383) használtuk (Applied Biosystems).

A phaeochromocytoma minták vizsgálata során a statisztikailag legerősebb szignifikanciát, valamint a kísérleti csoportok között legnagyobb mértékű expressziós eltérést (fold change) mutató öt mikroRNS-t választottuk ki (zárójelben a specifikus Taqman MicroRNA Assay-k számai): *hsa-miR-139-3p* (002313), *hsa-miR-541* (002201), *hsa-miR-765* (002643), *hsa-miR-885-5p* (002296) és *hsa-miR-1225-3p* (002766) (Applied Biosystems). Belső kontrollként a microarray eredményeinek elemzése alapján legkisebb szórást mutató *hsa-miR-324-3p* (002161) és a *hsa-miR-320b* (002844) mikroRNS-eket használtuk. A validálást ebben az esetben is a csoportonkénti elemszám növelésével végeztük (9 sporadikus benignus, 5 sporadikus recidíváló, 8 MEN2, 6 VHL), illetve a valós idejű PCR vizsgálatok során a vizsgálatba az NF1 csoportot is bevontuk (n=5).

Mindkét mintacsoport esetében a qRT-PCR validálás során első lépésében 10 ng teljes RNS-ből MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) segítségével 15 µl végtérfogatban cDNS-t szintetizáltunk. Ezt követően a qRT-PCR reakciót TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) felhasználásával, 20 µl végtérfogatban állítottuk össze és a mintákat 96-lyukú lemezen, 7500 Fast Real-Time PCR System készüléken amplifikáltuk három párhuzamos méréssel. Az amplifikációs görbék elemzéséhez az SDS Programot (Applied Biosystems), és az egyes csoportok közötti eltérések kimutatásához az összehasonlító ddCT módszert használtuk [178].

A szignifikánsan eltérő expressziót mutató mikroRNS-ek azonosításához egyutas varianciánálízist végeztünk, amelyet posthoc tesztek (Scheffé, Fisher) követtek.

#### 4.3.3. MikroRNS biomarkerek azonosítása

Munkáinkban olyan mikroRNS biomarkereket kerestünk, amelyek segítségével a mellékvesekéreg-daganatok rosszindulatúságát vagy phaeochromocytomák recidivakészségét jelezni lehet. A potenciális biomarkerek azonosítására és hatékonyságának vizsgálatára SPSS 15 for Windows program felhasználásával hatásfokmérő karakterisztikát (Receiver Operating Characteristics, ROC analízis) alkalmaztunk.

#### 4.3.4. Teljes genom génexpressziós vizsgálatok

Mellékvesekéreg-daganatokban a mikroRNS mintázat TLDA kártyákon történő vizsgálatával párhuzamosan ugyanezekben a mintákban teljes genom génexpressziós microarray vizsgálatot is végeztünk (4 ép mellékvesekéreg, 4 hormonálisan inaktív adenoma, 4 kortizoltermelő adenoma, 4 ACC) Agilent 4x44K microarray platformon kettős jelöléssel. A kettős jelölés során az egyes minták intenzitását egységes háttér referenciához hasonlítottuk, amit a vizsgált 16 mintából létrehozott RNS keverék („pool”) képezett.

E vizsgálatokhoz is teljes RNS-t izoláltunk RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen GmbH) felhasználásával. Az RNS koncentráció mérése, minőségének vizsgálata és a felhasznált RNS-ek minőségi kritériumai megegyeztek a fagyasztott mintákból történt mikroRNS vizsgálatok részben részletezettekkel (4.3.1. rész).

A reverz transzkripcióhoz mind az egyes RNS minták, mind pedig a referencia minta esetében 1 µg teljes RNS-t használtunk, amelyet RNA Spike-In Kittel (Agilent Tech. Inc.) kevertünk össze. A cDNS-ekből *in vitro* transzkripció reakció során fluoreszcens cyanine 5 (Cy 5)-, a referencia minta cDNS-éből pedig cyanine 3 (Cy 3)-CTP-vel (Perkin Elmer) jelölt cRNS-t készítettünk a Low RNA Input Fluorescent Linear Amplification Kit (Agilent Tech. Inc.) felhasználásával. A cRNS mintákat Qiagen RNeasy Mini Spin Column (Qiagen GmbH) oszlopokon tisztítottuk. 825 ng cyanine 5-tel jelölt cRNS mintát és azonos mennyiségű cyanine 3-mal jelölt referencia mintát kevertünk össze az Agilent Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Tech. Inc.) hibridizációs reakcióhoz szükséges komponenseivel, majd a mintákat a gyártó utasításainak megfelelően a microarray lemezekhez hibridizáltattuk. A microarray lemezek leolvasása mosást követően Agilent DNA Microarray Scanner (Agilent Tech. Inc.) segítségével történt, majd az eredmények normalizálásához a Feature Extraction szoftver 8.5-ös verzióját (Agilent Tech. Inc.) használtuk.

A microarray eredmények statisztikai elemzése GeneSpring GX 9.0 szoftver (Agilent Tech. Inc.) felhasználásával történt. A szignifikáns expressziós eltérést mutató gének (fold change > 2) azonosításához egyutas ANOVA módszert használtunk, majd az elsőfajú hiba csökkentése céljából Benjamini-Hochberg többszörös hipotézis korrekciót végeztünk. A Tukey-féle HSD tesztet használtuk post hoc tesztként.

#### 4.3.5. Komparatív genom hibridizáció (CGH)

Mellékvesekéreg-daganatokban a kromoszómaeltérések és génexpressziós változások párhuzamos kimutatása céljából CGH vizsgálatot is végeztünk Agilent platformon genomikus DNS felhasználásával. Összesen 4 hormonálisan inaktív és 3 kortizoltermelő adenoma, valamint 4 hormontermelő carcinoma szövetet vizsgáltunk. A fagyasztott szövetek feldolgozása, a DNS- izolálás, a hibridizáció és az adatok elemzése az Agilent Technologies 105K Array 2.0 protokollja szerint történt. A vizsgálandó és referencia (G1521 női DNS, Promega) minták CGH105A oligo microarray chipekre történt hibridizációját követően az egyes intenzitás értékek leolvasását és normalizálását Agilent Microarray Scanner és a Feature Extraction Software (8.5 verzió) programok felhasználásával végeztük (Agilent Tech. Inc.). Az adatok kiértékeléséhez a DNA Analytics Software-t (Agilent Tech. Inc.) használtuk.

#### 4.3.6. Egyes génekre vonatkozó génexpressziós (qRT-PCR) vizsgálatok

##### 4.3.6.1. Mellékvesekéreg-daganatok

A hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebomlásában résztvevő fehérjéket kódoló gének expresszióját Taqman qRT-PCR-rel vizsgáltuk (Applied Biosystems) a *GAPDH* (glicerinaldehid-3 foszfát dehidrogenáz (Hs02758991\_g1)) referencia génhez viszonyítva. A reverz transzkripciót 1 µg RNS-ből kiindulva végeztük a high capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel (Applied Biosystems). A valós idejű PCR méréshez TaqMan Fast Universal Master Mix-et alkalmaztunk (7200 Fast Real-Time PCR, Applied Biosystems). A fenti vizsgálatainkhoz hasonlóan a *GAPDH*-hoz viszonyított relatív expresszió meghatározására itt is az összehasonlító ddCT módszert használtuk [178]. A mérésekhez az alábbi, génekre specifikus TaqMan Assay-ket használtuk: *HDC* (Hs00157914\_m1), *HRH1* (Hs00911670\_s1), *HRH2* (Hs00254569\_s1), *HRH3* (Hs00200610), *HRH4* (Hs0222094\_m1), *DAO* (Hs00266481\_m1, Applied Biosystems, Foster City, USA). A teljes genom génexpressziós microarray vizsgálatok validálása céljából is végeztünk valós idejű RT-PCR vizsgálatokat, ennek keretében a *TOP2A* (Hs00172214\_m1), *IGF-2* (Hs01005963\_m1) és a Toll like receptor 4 (*TLR4*, Hs00152939\_m1) meghatározására került sor a *GAPDH*-hoz, mint referencia génhez viszonyítva.

#### 4.3.6.2. Hypothalamikus GnRH-neuronok

A GnV-4 sejtvonalon a citokinek és receptorainak jelenlétét a génekre specifikus primerek felhasználásával kvalitatív RT-PCR-rel mutattuk ki Perkin-Elmer Gene Amp PCR System 9700 készüléken. A specifikus primereket az exon-intron határookra terveztük. A PCR reakciók körülményeit génenként külön-külön állítottuk be (**2. táblázat**).

Az OSM hatására bekövetkező korai gén indukció (*c-fos*, *Egr-1*, *MKP1*, *Myd118*, *GADD45*) vizsgálata szemikvantatív RT-PCR-rel történt az *S12* riboszomális fehérje mRNS-éhez viszonyítva. A PCR-termékeket 2 %-os etídium bromid tartalmú agaróz géleken megfuttattuk, majd a képek denzitometriás analízisével kvantifikáltuk az eredményeket. A GnV-4 és a primer foetalis hypothalamikus kultúrák GnRH expressziójának meghatározása qRT-PCR-rel történt (Roche Light Cycler) a  $\beta$ 2-mikroglobulin referencia génhez viszonyítva [180]. Valamennyi mérést háromszor ismételtük.

#### 4.3.7. DNS-szekvenálás és mutációanalízis

A phaeochromocytomára hajlamosító öröklődő daganatszindrómák mutációanalíziséhez genomikus DNS-t izoláltunk teljes vérből, emlős vérre kifejlesztett DNS-izoláló kit segítségével (Roche). A mutációk azonosítása az exon-intron határookra tervezett, szakirodalomban közölt specifikus primerekkel végzett polimeráz láncreakció (PCR) során amplifikált DNS-szakaszok direkt szekvenálásával történt. A VHL gén mindhárom exonját rutinszerűen vizsgáltuk [181], 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 [182]. Az SDHB, SDHC és SDHD gének valamennyi exonját (8, 6 ill. 4 exon) és az exon-intron határokat is vizsgáltuk. (SDH mutációt hordozókat a vizsgálatainkba bevont phaeochromocytomás betegek között nem találtunk.)

A MEN2 szindróma genetikai vizsgálatában kutatásaink kezdetén még nem direkt szekvenálást, hanem a *RET* protoonkogén mutációinak szűrésére az exonokra specifikus PCR reakciót követően SSCP (egyláncú DNS konformációs polimorfizmus – single strand conformational polymorphism) vizsgálatot, a mutációk igazolására pedig restrikciós enzimemésztést alkalmaztunk Dr. Wolfgang Höppner (Institut für Hormon und Fertilitätsforschung, Hamburg) módszere alapján [183].

**2. Táblázat.** A hypothalamikus GnRH-neuronok PCR vizsgálata során alkalmazott primerek szekvenciái és főbb jellemzőik. bp: bázispár,  $T_{\text{anneal.}}$ : annealing hőmérséklet, CNTFR: ciliáris neurotrofikus faktor receptor, IL: interleukin, OSM: oncostatin M, LIFR: leukémia gátló faktor receptor, IL-1Rap: IL-1 receptor járulékos (accessory) protein, IL-1RN: IL-1 receptor antagonist,  $\beta 2m$ :  $\beta 2$  mikroglobulin

| Gén                              | Szenz primer (5'-3')      | Antiszenz primer (5'-3')  | Termék (bp) | $T_{\text{anneal.}}$ (°C) |
|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|
| <b>Gp130</b>                     | TCAACTTGTGGAACCATGTGG     | TCCAACGACACAGCATGTTC      | 375         | 53                        |
| <b>IL-6R<math>\alpha</math></b>  | TCACAGAGCAGAGAATGGACT     | GTATGGCTGATACCACAAGGT     | 481         | 53                        |
| <b>LIFR<math>\alpha</math></b>   | GCCTCCTGGACTGGATAAAGGTTC  | ACAAACATGCTCTTCTCTGGGCC   | 472         | 53                        |
| <b>CNTFR<math>\alpha</math></b>  | CGATCCTCCAGAAAATGTGG      | TCAGGAGATTGTTGGCTGTG      | 503         | 54                        |
| <b>IL-11R<math>\alpha</math></b> | TCGGACGCTGGATGGTGTATTG    | GGTTCACCTCAGTCACATTGATCCG | 317         | 45                        |
| <b>OSMR<math>\beta</math></b>    | ATCCAACACCATCTGGGTGG      | TAAAGTCTCGGGTTTCACAGGA    | 518         | 55                        |
| <b>IL-1R1</b>                    | CCTGTGATTATGAGCCACG       | CGTGTGCAGTCTCCAGAATATG    | 298         | 55                        |
| <b>IL-1R2</b>                    | AGATGAGCCAAGGATGTGGG      | ATCAATAGGCGTGTGGGTCT      | 339         | 62                        |
| <b>IL-1Rap</b>                   | GTGTCAAACCATCGGTCACTTG    | TCCATCAATGGTCCACCAGATC    | 350         | 53                        |
| <b>IL-2R<math>\alpha</math></b>  | GTCCCAATGCCACGTTCAAAG     | TCCCACACACTGTCTTGACAGATG  | 417         | 57                        |
| <b>IL-2R<math>\beta</math></b>   | TACAACTTGGGTGTCTGCAGCAGTG | TGTGCAGGACTTGTAGGGAATGAGG | 371         | 57                        |
| <b>IL-2R<math>\gamma</math></b>  | AGGTCCTCATGTCCAGTGGGAATG  | AGATTCTCTGGAGCCCATGGGATC  | 343         | 57                        |
| <b>IL-10R<math>\alpha</math></b> | TCCGCTGGATGTCTATCCAAAC    | AACCCTGTAAATACGGTGGTGCG   | 386         | 53                        |
| <b>IL-1<math>\alpha</math></b>   | GACCATCTGTCTCTGAATCAGA    | ATTCTGGAAGCTGTGAGGTGCT    | 291         | 53                        |
| <b>IL-1<math>\beta</math></b>    | TCTCGACAAGAGCTTCAGGAAG    | AAGTCATGGAGAATACCACT      | 321         | 53                        |
| <b>IL-1RN</b>                    | TTTCGTTTCAGAGTCAGCTGGCC   | GCAAGTGATTCTGAAGCTGGTGG   | 365         | 55                        |
| <b>IL-6</b>                      | ATGATGGATGCTTCCAACTGG     | GCCGAGTAGACCTCATAGTGACCT  | 342         | 53                        |
| <b>OSM</b>                       | CTGAGCACTGTGCACGCCAC      | CACCAGGGACCTGAGCATGG      | 432         | 55                        |
| <b>c-fos</b>                     | CTGTCAACACACAGGACTTTTGCG  | CTTCGGATTCTCCGTTTCTCTTCC  | 304         | 54                        |
| <b>c-jun</b>                     | GCCAAGAAGCTCGACCTTC       | TCGGCGAAGCCCTCCTGC        | 173         | 53                        |
| <b>Egr-1</b>                     | TACGAGCACCTGACCACAG       | CTAGGCTGAAAAGGGGTTC       | 184         | 54                        |
| <b>MKP-1</b>                     | AGCTCCTGGTTCAACGAGG       | GTCAAGGACAGCCATGGC        | 291         | 54                        |
| <b>Myd118</b>                    | ACAACGCGGTTTCAAGATG       | CCTTGGCTTTTCCAGGAATC      | 325         | 54                        |
| <b>GADD45G</b>                   | GGATACAGTTCCGGAAGCACAGC   | CAAACGAGCTTCTCCAAGGCAGG   | 394         | 54                        |
| <b>GnRH</b>                      | GGAAACGATCCCCAACTGATG     | TCTTCTTCTGCCAGCTTCTCCTC   | 272         | 55                        |
| <b>S12</b>                       | ACGTCAACACTGCTCTACA       | CTTTGCCATAGTCCTTAAC       | 312         | 54                        |
| <b>GAPDH</b>                     | ACCACAGTCCATGCCATCAC      | TCCACCACCCTGTTGCTGTA      | 452         | 55                        |
| <b><math>\beta 2m</math></b>     | GAGCCCAAAACCGTCACC        | GAAGATGGTGTGCTCATTG       | 149         | 54                        |

#### 4.3.8. Fehérjeexpressziós vizsgálatok és a hisztamintartalom mérése

A hisztidin dekarboxiláz, hisztaminreceptorok, hisztamin N-metil transzferáz fehérjeszintű kifejeződését immunhisztokémiával majd Western-blottal vizsgáltuk.

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a fixált és formalinba ágyazott szövetblokkokból készített metszeteket SuperFrost tárgylemezekre helyeztük. Deparaffinálás után mintánként 1-1 metszetet hematoxin-eozinnal, illetve toluidinkékkel festettünk. A vizsgálatokat Ventana ES automata jelölő rendszerrel (Ventana Medical Systems Inc.) végeztük el a gyártó protokollja szerint. A jelöléshez 1:100-hoz hígításban nyúl poliklonális anti-humán H1RH (HRH12-A), HRH2 (HRH21-A), HRH3 (HRH32-A), HRH4 (HRH41-A, Alpha Diagnostics International), HDC (ab37291), HNMT (ab63147, Abcam plc. és DAO (WH0001610M1, Sigma-Aldrich Corp.) antitesteket és iWIEW DAB Detection Kit-et (Ventana Medical Systems Inc.) alkalmaztunk. A szövettani elemzést és a fényképfelvételeket Nikon Eclipse i80 mikroszkóppal (Nikon Spot Advanced Program) végeztük. Pozitív kontrollként emberi vastagbél és gyomorfal metszeteket használtunk.

A hisztaminnal kapcsolatos fehérjék Western-blotja során a szövetmintákat lízis pufferben emésztettük, majd 15 µg hődenaturált és β-merkaptóetanollal kezelt fehérjemintát töltöttünk 10% ready gel Tris-HCL gélbe, amelyet a futtatást követően PVDF membránra (Bio-Rad Lab.) blottoltunk. Elsődleges antitestekként az immunhisztokémiai vizsgálatokban is használt ellenanyagokat használtuk 1 µg/ml koncentrációban, kontrollként nyúl anti-β-aktin antitestet (A5060, Sigma-Aldrich Corp.) használtunk. Peroxidáz konjugált kecske poliklonális anti-nyúl IgG antitestet (Sigma-Aldrich Corp., USA) alkalmaztunk másodlagos antitestként 0.1 µg/ml-es koncentrációban. A vizsgálatainkban használt antitestek specificitását korábbi vizsgálatokban, blokkoló peptidek felhasználásával bizonyították [16]. A fehérjék relatív mennyiségének meghatározásához a röntgen filmen mért denzitás értékeket az azonos mintában mért β-aktin denzitáshoz viszonyítottuk. A felvételek kiértékeléséhez a Fluorchem 8000 képelemző rendszert és a Chemimager 5500 képelemző software-t használtuk (Alpha Innotech Corp.).

A GnV-4 sejtvonalon mitogén aktiválta protein kináz (MAPK/Erk) jelátviteli út citokinek hatására bekövetkező aktiválódását a foszforilált és teljes Erk1/2-re specifikus monoklonális ellenanyagok (Cell Signaling Technology) segítségével Western-blottal

mutattuk ki. Mintánként azonos mennyiségű fehérjét vittünk fel, 10 %-os SDS-PAGE gélekre, majd polivinilidén-difluorid membránra (Hybond-P) vittük át és ECL reagenssel (Amersham) vizualizáltuk. A blottok denzitometriája Typhoon rendszerrel történt a foszforilált fehérjék denzitásának teljes fehérjék denzitásához viszonyításával (Amersham).

A mellékvesekéreg-daganat minták hisztamin tartalmának meghatározása ELISA módszerrel történt. A méréshez 100 mg mintát homogenizáltunk 0,2 M perklórsav és 1 M kálium-borát felhasználásával. A szöveti hisztamin koncentráció méréséhez EIA Histamine Kit-et (Beckman Coulter Inc.) alkalmaztunk. A fényelnyelés vizsgálatát 405 nm-en microplate olvasó felhasználásával végeztük (Multiskan MS Labsystems).

#### **4.3.9. Bioinformatikai vizsgálatok**

##### **4.3.9.1. A mikroRNS-ek célpontjainak, biológiai jelentőségének vizsgálata**

###### **4.3.9.1.1 A szignifikáns expressziós eltérést mutató mikroRNS-ek potenciális cél mRNS-einek azonosítása bioinformatikai módszerekkel mellékvesekéreg-daganatokban**

A mellékvesekéreg-daganatok valamint a különböző típusú pheochromocytomák között szignifikánsan eltérő expressziót mutató mikroRNS-ek szóbagyűjtő cél mRNS molekuláit különböző *in silico* target predikciós algoritmusok segítségével vizsgáltuk. Mivel jelenleg nincsen egyértelmű állásfoglalás az egyes target predikciós adatbázisok alkalmazását illetően, ezért munkáink során a leginkább elterjedt algoritmusok eredményeit együttesen vettük figyelembe.

A mellékvesekéreg-daganatok esetében a mikroRNS-ek potenciális célpontjainak azonosítására a TargetScan 4.2 ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)), Pictar ([www.pictar.org](http://www.pictar.org)) és miRBase Targets Version 5 ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) algoritmusokat használtuk, míg a pheochromocytomák vizsgálata során a TargetScan újabb verzióját (Release 5.1) és a korábban miRBase néven ismert MicroCosm Targets Version 5 ([www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm](http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm)) adatbázisokat használtuk. Mivel a PicTar algoritmus a pheochromocytomák között szignifikánsan eltérő mikroRNS-eket nem vizsgálja, így pheochromocytomák esetén csak a TargetScan és MicroCosm Targets alkalmazására nyílt lehetőségünk.

A fenti algoritmusok eredményeinek összevetésére Microsoft Visual FoxPro 9.0 segítségével egy új adatbáziskezelő programalkalmazást hoztunk létre. A programalkalmazással lehetséges egy adott mikroRNS fenti algoritmusok által meghatározott összes potenciális célmolekuláját azonosítani, és hozzá tudjuk rendelni az mRNS célpontokhoz a különböző algoritmusok által számított valószínűségi pontszámokat („score”), sőt arra is alkalmas, hogy az adatbázisok között átfedő célpontokat kijelölje.

#### **4.3.9.1.2. A biológiailag releváns cél mRNS-ek bioinformatikai módszerekkel történő azonosítása mellékvesekéreg-daganatokban – SZÖVETSPECIFIKUS TARGET PREDIKCIÓ**

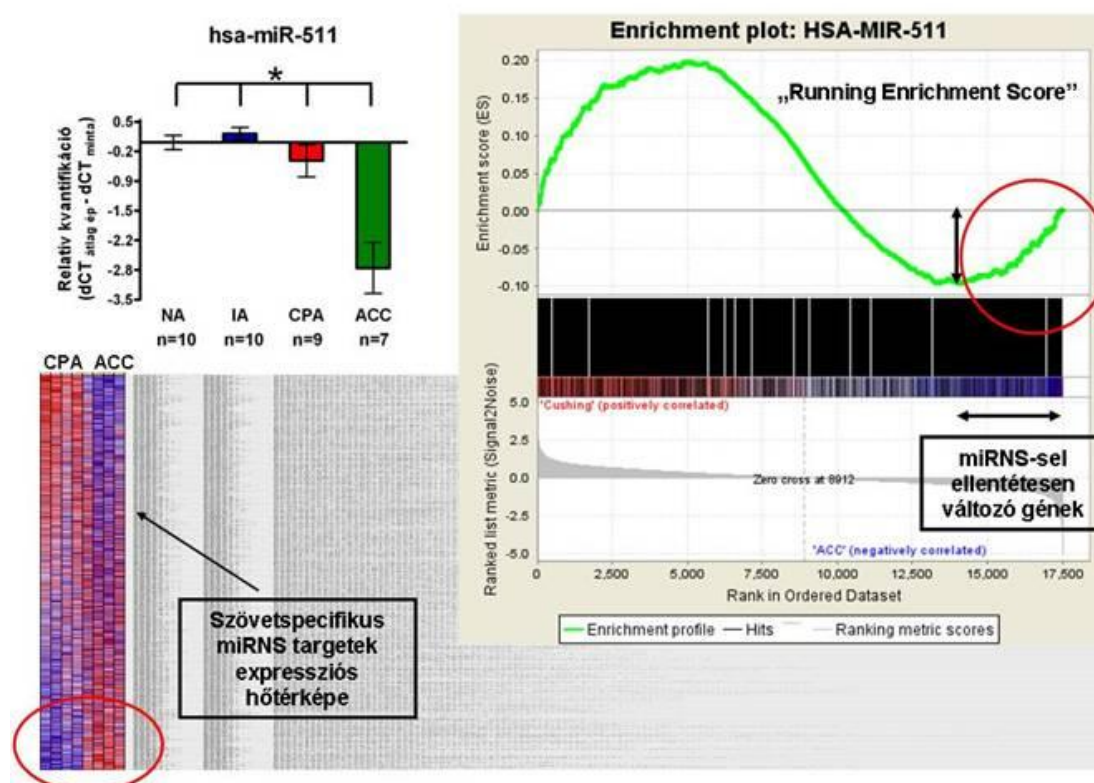
Az *in silico* target predikciós algoritmusok által meghatározott potenciális cél mRNS-ek biológiai relevanciájának jobb megközelítése érdekében **szövetspecifikus módszert dolgoztunk ki a párhuzamosan végzett teljes genom mRNS expressziós eredmények felhasználásával, amelyhez kétlépcsős bioinformatikai elemzést alkalmaztunk.**

Ennek első lépéseként kiszűrtük azon mRNS-eket a potenciális mRNS-ek listájából, amelyek a vizsgált szövetekben nem fejeződnek ki, mivel ezek nem állhatnak mikroRNS szabályozás alatt. A szűrés elvégzéséhez a fent említett, általunk kifejlesztett adatbáziskezelő alkalmazást használtuk. Az mRNS expresszió hiányának meghatározásához az alábbi szubjektív szűrési kritériumokat használtuk: 1.) A négy mintát magában foglaló vizsgálati csoportban egynél több mintában a nyers jelintenzitás értéke az alsó méréshatár alatti volt. 2.) Az adott gén nyers jelintenzitás értéke a csoporton belül kevesebb, mint három minta esetében haladta meg az 50-es percentilist. A 16 vizsgált minta esetében számított 50-es percentilisek átlaga jelentősen meghaladta a háttér intenzitást.

Második lépésben a mikroRNS-ekkel ellentétes irányban változó mRNS-eket kerestünk. Ennek elméleti alapját az irodalmi áttekintésben részletezett megfigyelések jelentik, amelyek szerint a mikroRNS-ek hatása emlősekben is elsősorban a cél mRNS-ek lebomlása nyomán jön létre, így a biológiailag releváns mRNS célpontok azonosítását a párhuzamosan elvégzett nagy áteresztőképességű mikroRNS és mRNS expressziós vizsgálatok segíthetik. Ezek alapján a vizsgált szövetben fokozottabban kifejezett mikroRNS-ek cél mRNS-ei csökkent, míg a csökkent expressziójú mikroRNS-ek célpontjai nagyobb mértékben fejeződnek ki. A mikroRNS-ek biológiailag releváns, szövetspecifikus

célmolekuláinak azonosítása érdekében, az adott mikroRNS-sel ellentétes irányban változó expressziójú cél mRNS-ek azonosítására törekedtünk. Ehhez a Géncsoport Dúsulási vizsgálatot (GSEA, Gene Set Enrichment Analysis) használtuk ([www.broad.mit.edu](http://www.broad.mit.edu)) [160].

A GSEA-t a kísérleti csoportok összes lehetséges párosítása esetén elvégeztük. Ezek során génlistákat hoztunk létre, amelyek az adott két kísérleti csoport között szignifikáns expressziós eltérést mutató mikroRNS-ek szövetspecifikusan szűrt, potenciális célpontjait tartalmazták. Az ép mellékvese vs. carcinoma összehasonlításban 5, az inaktív adenoma vs. carcinoma valamint a kortizoltermelő adenoma vs. carcinoma párosításban 4-4, az ép mellékvese vs. kortizoltermelő adenoma összehasonlításban pedig egy génlistát hoztunk létre. A GSEA szoftver felhasználása során a fokozott expressziót mutató mikroRNS ellentétesen változó, csökkent expressziójú cél mRNS-eit a rangsorolt lista alján kerestük (alulexpresszált gének) a „Futó Dúsulási Érték” ("Running Enrichment Score") 0-tól való maximális negatív eltérésénél húzva meg a határértéket (6. ábra).



**6. ábra: A szignifikánsan fokozott kifejeződésű mikroRNS-sel ellentétes irányban változó mRNS célpontok azonosítása a GSEA algoritmus segítségével**

A kortizoltermelő adenoma csoportban a carcinomákhoz viszonyítva szignifikánsan fokozott expressziós eltérést mutató hsa-miR-511-rel ellentétes irányban változó cél mRNS-ek kiválasztása. CPA: kortizoltermelő mellékvesekéreg-adenoma; ACC: mellékvesekéreg-carcinoma; NA: ép mellékvese; IA: hormonálisan inaktív mellékvesekéreg-adenoma.

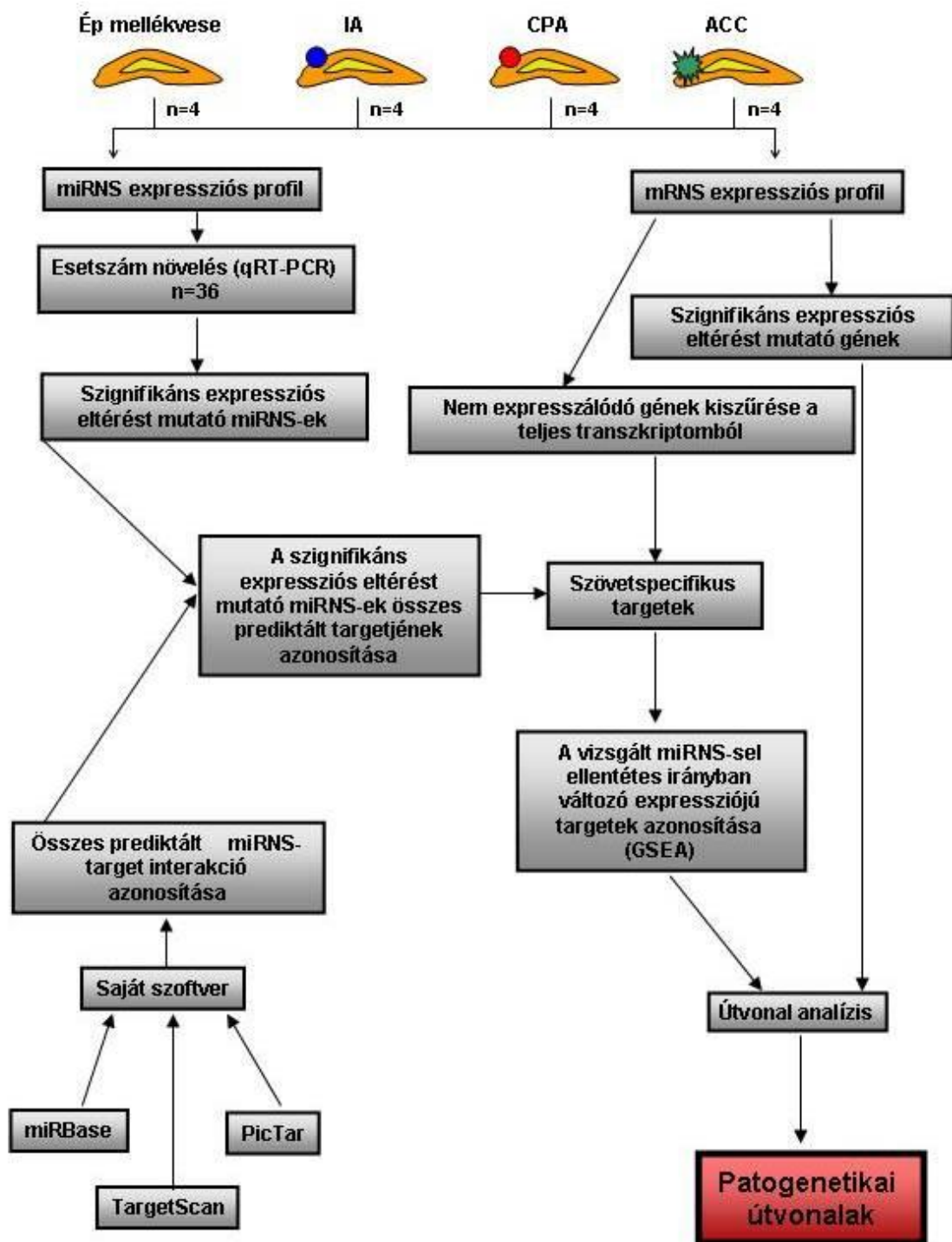
Alulexpresszált mikroRNS-ek esetén pedig fordítva, a „Futó Dúsulási Érték” 0-tól való legnagyobb mértékű pozitív eltérésénél húztuk meg a határt, aminek következtében a rangsorolt lista tetején elhelyezkedő, fokozott expressziójú géneket tudtuk azonosítani.

### 4.3.9.1.3. Útvonalelemzés

A szignifikáns expressziós eltérést mutató mikroRNS-ek mellékvese-daganatok patogenezisében játszott szerepének tisztázására a szövetspecifikus target predikciós módszerünkkel azonosított cél mRNS-ek útvonalelemzését végeztük.

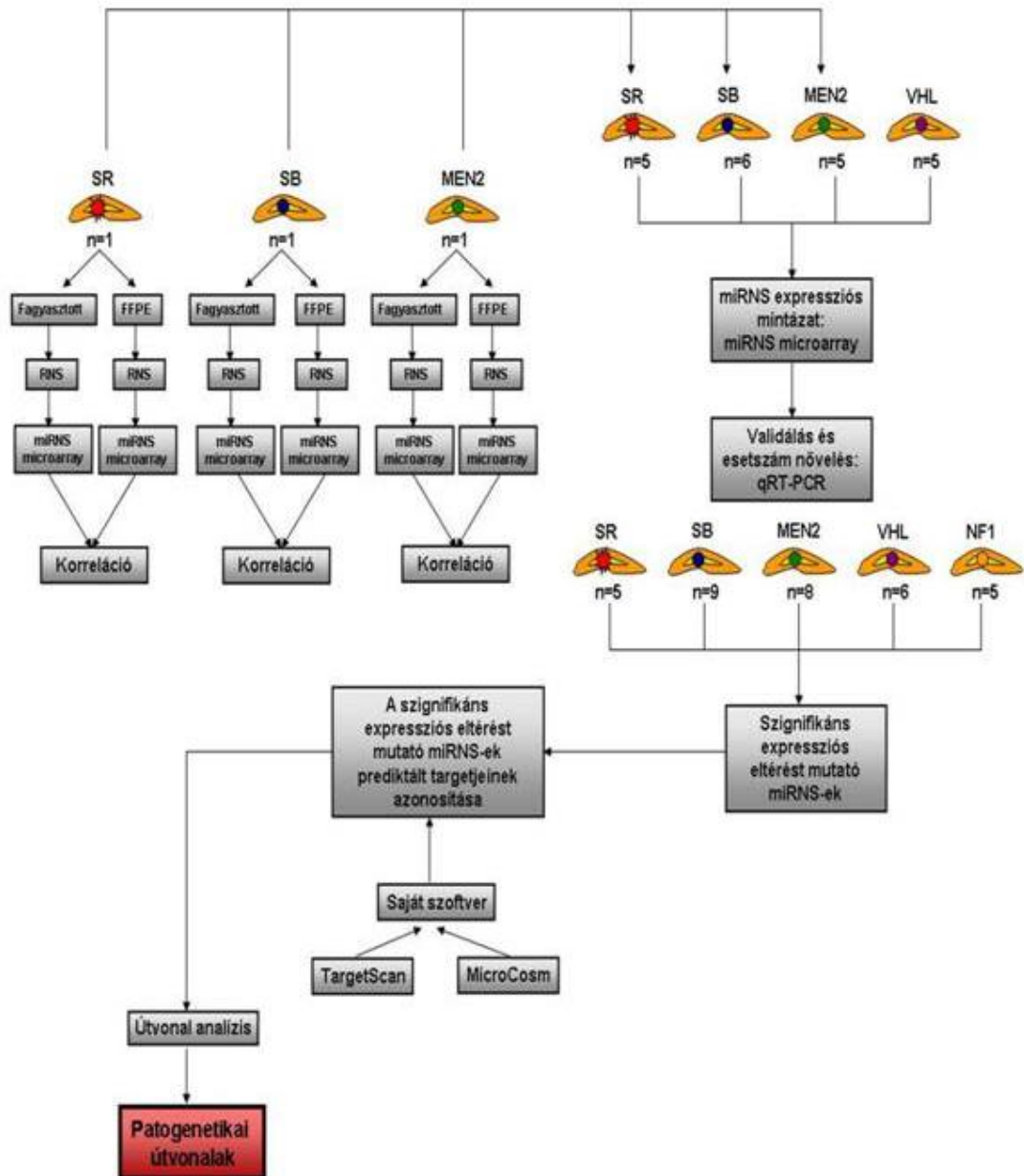
A mellékvesekéreg-daganatok vizsgálata során a vizsgálati csoportok összes lehetséges összehasonlítása során felállított szűrt mikroRNS célpontok listáit elemeztük Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 7.1 szoftver (Ingenuity Systems; [www.ingenuity.com](http://www.ingenuity.com)) segítségével. A phaeochromocytomák esetében a paraffinos blokkok felhasználása miatt párhuzamos mRNS expressziós mintázat meghatározásra nem volt lehetőségünk ezért a szignifikánsan eltérő mikroRNS-ek potenciális mRNS célpontjainak meghatározása tisztán bioinformatikai úton történt a különböző csoportok közötti összehasonlításban (VHL vs. sporadikus benignus, VHL vs. sporadikus recidíváló, VHL vs. NF1, MEN2 vs. VHL, MEN2 vs. sporadikus benignus, MEN2 vs. sporadikus recidíváló, MEN2 vs. NF1, sporadikus recidíváló vs. sporadikus benignus). Ennek során az IPA szoftver újabb, 8.5 verzióját használtuk.

A molekuláris és bioinformatikai vizsgálatok munkafolyamatának főbb lépéseit mellékvesekéreg-daganatok esetén a **7. ábra**, phaeochromocytomák esetén a **8. ábra** mutatja be.



**7. ábra: A mellékvesekéreg-daganatok molekuláris (mikroRNS, mRNS) és bioinformatikai vizsgálatára kidolgozott módszer munkamenetének ábrázolása**

*miRNS: mikroRNS; IA: hormonálisan inaktív adenoma; CPA: kortizoltermelő adenoma; ACC: mellékvesekéreg-carcinoma; GSEA: Gene Set Enrichment Analysis; qRT-PCR: kvantitatív reverz transzkripció-PCR.*

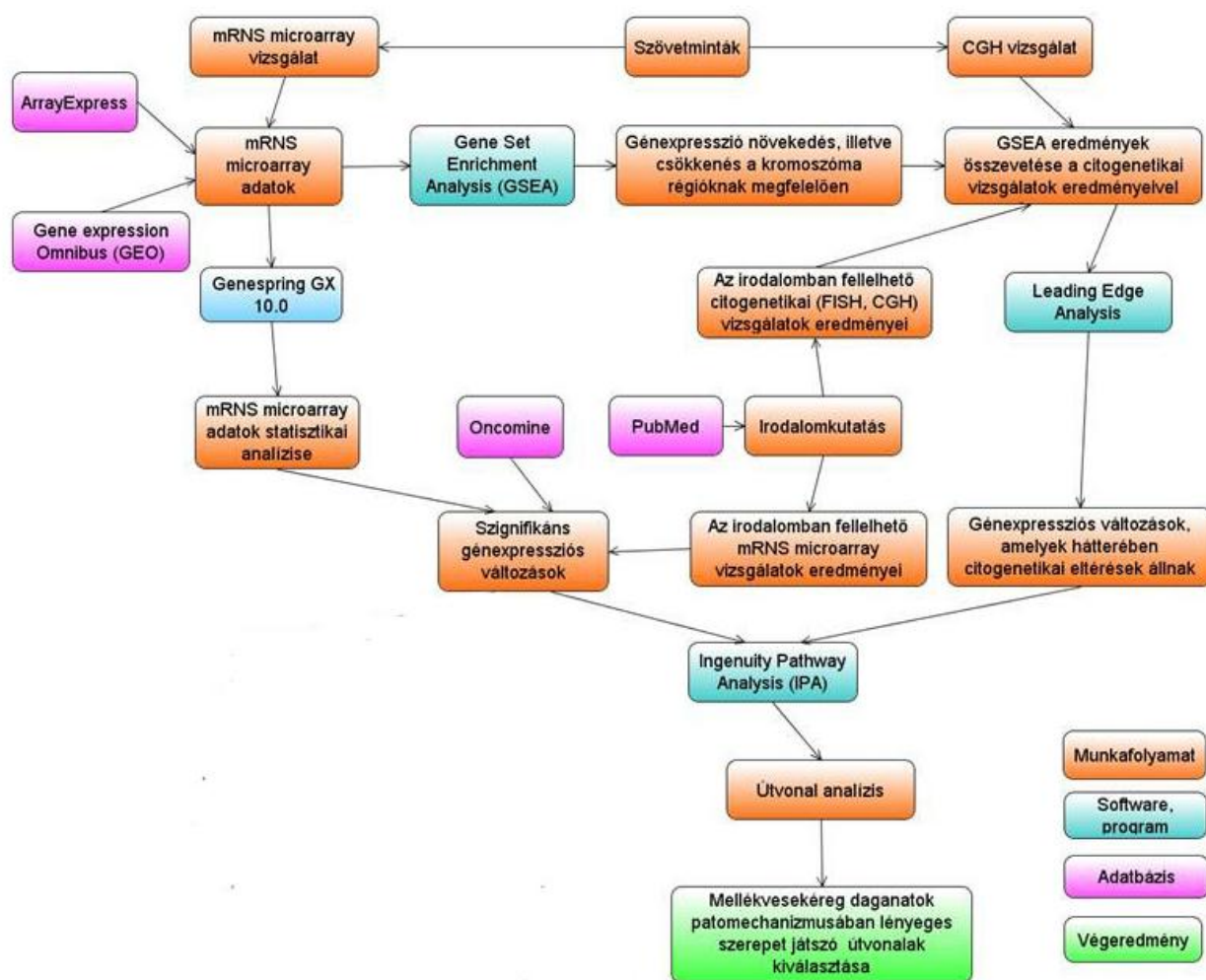


**8. ábra: A pheochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatának és ennek patogenetika jelentőségének vizsgálatára alkalmazott módszerünk munkamenetének ábrázolása**

SR: sporadikus recidíváló; SB: sporadikus benignus; VHL: von Hippel-Lindau-szindrómához társuló; MEN2: multiplex endokrin neoplasia 2-es típusához társuló; NF1: 1-es típusú neurofibromatosisához társuló pheochromocytoma

#### 4.3.9.2. mRNS microarray és citogenetikai adatok funkcionális genomikai metaanalízise mellékvesekéreg-daganatokban

Egy saját fejlesztésű bioinformatikai megközelítést alkalmaztunk a génexpressziós eredmények metaanalíziséhez és ezeknek a citogenetikai adatokkal történő korreláció vizsgálatához. Ennek során több, már korábban is leírt és használt bioinformatikai módszert saját szempontjaink szerint alkalmaztunk az interneten elérhető adatbázisok, valamint saját eredményeink elemzésére. A teljes munkamenetet a **9. ábra** mutatja be.



**9. ábra:** A génexpressziós és citogenetikai vizsgálatok metaanalízise során alkalmazott módszerek folyamatábrája.

##### 4.3.9.2.1. A felhasznált microarray adatok

A génexpressziós (mRNS) microarray vizsgálatok metaanalíziséhez első lépésben két szabadon elérhető internetes microarray adatbázisból (GEO és ArrayExpress)

összegejtöttük az eredeti, nyers expressziós adatokat, majd ezek újracsoportosítása után saját szempontjaink szerint végeztünk statisztikai elemzést. A nyers génexpressziós adatok négy tanulmányban [43, 44, 184 és saját vizsgálatunkban] voltak elérhetőek, és ezekben összesen 164 daganatmintát (97 adenoma és 67 carcinoma) és 18 normális mellékvesét vizsgáltak. Saját mintáinkon a génexpressziós változások citogenetikai eltérésekkel történő közvetlen korrelációja céljából a génexpressziós microarray mellett citogenetikai (CGH) vizsgálatokat is végeztünk (**3. táblázat**).

| Publikáció                       | Elérés szám<br>(Accession N°) | Microarray platform                         | Minták<br>hormonális<br>profilja | Daganatok |
|----------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------|-----------|
| <b>Ye és mtsai. [184]</b>        | GEO: GDS2860                  | Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array | 5 normális mellékvese            |           |
|                                  |                               |                                             | 10 APA                           | 10 ACA    |
| <b>de Reyniès és mtsai. [44]</b> | ArrayExpress: E-TABM-311      | Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array | Nem ismert                       | 58 ACA    |
|                                  |                               |                                             |                                  | 34 ACC    |
| <b>Giordano és mtsai. [43]</b>   | GEO: GSE10927                 | Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array | 9 normális mellékvese            |           |
|                                  |                               |                                             | 9 IA                             | 21 ACA    |
|                                  |                               |                                             | 5 CPA                            |           |
|                                  |                               |                                             | 7 APA                            |           |
|                                  |                               |                                             | 17 hormonálisan inaktív ACC      | 29 ACC    |
|                                  |                               |                                             | 12 hormon-termelő ACC            |           |
| <b>Saját vizsgálatunk</b>        | GEO: GSE14922                 | Agilent Whole Human Genome 4x 44K Array     | 4 normális mellékvese            |           |
|                                  |                               |                                             | 4 IA                             | 8 ACA     |
|                                  |                               |                                             | 4 CPA                            |           |
|                                  |                               |                                             | 4 hormon-termelő ACC             | 4 ACC     |

**3. táblázat: A metaanalízisben felhasznált szabadon elérhető microarray vizsgálatok jellemzői.** Rövidítések: ACA: mellékvesekéreg-adenoma, ACC: mellékvesekéreg-carcinoma, IA: hormonálisan inaktív adenoma, CPA: kortizoltermelő adenoma, GEO: Gene Expression Omnibus

Irodalomkutatás (PubMed, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) során további tanulmányokat is találtunk, azonban ezekben az eredeti microarray adatok nem voltak szabadon elérhetők, ezért ezekből a közleményekben szereplő génlistákat gyűjtöttük össze. E tanulmányok esetében nem volt lehetséges sem a minták újracsoportosítása, sem új statisztikai elemzés végzése. A génlisták tanulmányozásával további 30 normális mellékvese, 182 adenoma és 91 carcinoma eredményeit tudtuk metaanalízisünkbe bevonni (**4. táblázat**). A génlistákon Ingenuity Pathway Analysis segítségével útvonalelemzést készítettünk.

A kromoszomális változásokra vonatkozó adatokat 10 tanulmányból [185-194] gyűjtöttük össze. Ezekben fluoreszcens in situ hibridizációval (FISH) és CGH-val mutattak ki kromoszómaeltéréseket összesen 87 adenoma és 124 carcinoma szövetben.

Összesen 22 tanulmány felhasználásával 42 normális mellékvese, 350 adenoma és 270 carcinoma mRNS expressziós, illetve citogenetikai eredményeit vontuk be metaanalízisünkbe.

#### **4.3.9.2.2. A génexpressziós adatok statisztikai elemzése és a Géncsoport Dúsulási Vizsgálat (GSEA)**

A Genespring GX 10.0 programot (Agilent Tech. Inc., Santa Clara, CA, USA) használtuk a szignifikáns expressziós változást mutató gének kiválasztásához. A statisztikai elemzés során a vizsgálatok felépítése alapján egy- és kétutas ANOVA-t, Tukey-féle post hoc tesztet, ill. t-próbát használtunk. A statisztikai elemzést megelőzően, a vizsgált gének számának csökkentése érdekében kiszűrtük azon géneket, amelyek változásának mértéke a vizsgált csoportok között kétszeresnél kisebb volt. Az álpozitív esetek számának csökkentéséhez Benjamini-Hochberg többszörös korrekciót ( $FDR < 0.25$ ) használtunk. A vizsgálati csoportok között szignifikáns expressziós változást mutató gének listáit ezt követően útvonalelemzésnek vetettük alá, valamint a kromoszomális eltérésekkel történő korreláció céljából Géncsoport Dúsulási Vizsgálatot (GSEA, GSEA Software v2.0 ([www.broadinstitute.org/gsea](http://www.broadinstitute.org/gsea))) is végeztünk.

**4. táblázat: A metaanalízisünkben felhasznált azon microarray vizsgálatok legfőbb adatai, ahol az eredeti microarray adatok nem voltak elérhetőek.** Ezekben az esetekben a vizsgálandó génlistákat a táblázatban bemutatott szempontok szerint a szerzők által közölt eredményekből választottuk ki. Rövidítések: ACA: mellékvesekéreg-adenoma, ACC: mellékvesekéreg-carcinoma, APA: aldoszterontermelő adenoma, CPA: kortizoltermelő adenoma, IA: hormonálisan inaktív adenoma.

| Publikáció                         | Minták megoszlása                      | Génlisták leírása                                                                                                                                                | Gének száma |
|------------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| Giordano és mtsai. [36]            | 3 normális mellékvese, 4 ACA, 11 ACC   | Szignifikáns génexpressziós változások a nem-ACC (normális mellékvesék és ACA) és ACC csoportok között ( <a href="http://oncomine.org">http://oncomine.org</a> ) | 192         |
| Velázquez-Fernández és mtsai. [49] | 13 ACA, 7 ACC                          | Az ACA és ACC szövetek között legnagyobb expressziós növekedést, illetve csökkenést mutató 15-15 gén                                                             | 30          |
| Slater és mtsai. [50]              | 10 normális mellékvese, 10 ACA, 10 ACC | Szignifikáns génexpressziós változások a normális mellékvese és ACA szövetek                                                                                     | 42          |
|                                    |                                        | Szignifikáns génexpressziós változások a normális mellékvese és ACC szövetek                                                                                     | 148         |
|                                    |                                        | Szignifikáns génexpressziós változások a ACA és ACC szövetek között                                                                                              | 74          |
|                                    |                                        | Szignifikáns génexpressziós változások a gyermekkori ACA és ACC szövetek között                                                                                  | 52          |
| Fernandez-Ranvier és mtsai. [45]   | 74 ACA, 11 ACC                         | QRT-PCR-rel ellenőrzött szignifikáns génexpressziós változások az ACA és ACC szövetek között                                                                     | 19          |
| Fernandez-Ranvier és mtsai. [46]   | 43 ACA, 11 ACC                         | A 11q13 kromoszómaregió szignifikáns expressziós változás mutató génjei az ACA és ACC szövetek között                                                            | 25          |
| West és mtsai. [195]               | 7 normális mellékvese, 5 ACA, 18 ACC   | Szignifikáns génexpressziós változások a gyermekkori mellékvesekéreg tumorok (ACA és ACC) és a normális mellékvesék között                                       | 1019        |
| Laurell és mtsai. [196]            | 4 normális mellékvese, 17 ACA, 11 ACC  | Szignifikáns génexpressziós változások a nem-ACC (normális mellékvesék és ACA) és ACC csoportok között                                                           | 262         |
|                                    |                                        | Szignifikáns génexpressziós változások az IA és APA szövetek között                                                                                              | 378         |
|                                    |                                        | Szignifikáns génexpressziós változások az CPA és APA szövetek között                                                                                             | 377         |
| Soon és mtsai. [39]                | 6 normális mellékvese, 16 ACA, 12 ACC  | Szignifikáns génexpressziós változások a nem-ACC (normális mellékvesék és ACA) és ACC csoportok között                                                           |             |

A GSEA során a „c1: positional gene sets” génlistákat használtuk. Az elérhető 386 génlista minden olyan kromoszómarégiót tartalmaz, amely jelen ismerteink szerint legalább egy gént kódol. A statisztikai elemzéshez a szignifikancia szintet  $p < 0,05$  és a FDR-t  $< 0,25$ -re állítottuk be [197].

### **4.3.9.2.3. A szabadon elérhető génexpressziós (mRNS) microarray adatok és az irodalomban közölt citogenetikai eltérések korrelációja**

A következő lépésben megkíséreltük azon géneket azonosítani, amelyek expressziós változásainak hátterében kromoszomális eltérések állnak. Ennek során a GSEA eredményeiből kiválasztottuk azon kromoszómarégiókat, amelyeken a felül-, illetve alulexpresszált gének szignifikánsan dúsultak és az adott kromoszómarégió eltéréseit az irodalmi adatok is alátámasztották.

Ezt követően a GSEA Software v2.0 Leading Edge Analysis (LEA) moduljának segítségével kiválasztottuk a kromoszómarégiók azon génjeit, amelyek a vizsgált csoportok között a legnagyobb expressziós különbséget mutatták. A vezetőélbe („Leading Edge”) tartozó gének a szignifikáns expressziós dúsulás fő alkotóelemeit jelentik, amelyek a legnagyobb expressziós változásoknak felelnek meg az adott kromoszómarégióon [160, 197]. E módszer révén azonosíthattuk azon géneket, melyek expressziós változásainak hátterében kromoszomális okok állnak, és e génlistákat útvonalelemzésnek vetettük alá.

### **4.3.9.2.4. Az azonos mintákon, párhuzamosan végzett génexpressziós (mRNS) microarray és CGH vizsgálatok eredményeinek korrelációja**

Mivel a korábbi vizsgálatokban a génexpressziós és citogenetikai vizsgálatokat nem ugyanazon mellékvesekéreg mintákon végezték, a génexpressziós és citogenetikai változások korrelációja csak közvetetten volt lehetséges. A közvetlen korreláció lehetővé tétele érdekében saját mintáinkon párhuzamos mRNS microarray és CGH vizsgálatot végeztünk, amelynek módszere a fentieknek megfelelően zajlott. Ennek során a GSEA-t saját microarray adatainkon végeztük el, majd a szignifikáns dúsulást mutató kromoszómarégiók génlistái közül azokat vontuk „vezetőél elemzés” (Leading Edge Analysis) alá, amelyek esetén az adott kromoszómarégió eltérése a párhuzamos CGH vizsgálatokkal is kimutatható volt. E

megközelítéssel ki tudtuk választani azon géneket, amelyek expressziós változásainak hátterében az adott mintákban egyidejűleg kimutatható kromoszómaaberrációk állnak. E génlistákon is útvonalelemzést végeztünk.

### **4.3.9.3. Szekvenciavariánsok *in silico* keresése**

Az *in silico* genomikai vizsgálatok során a multiplex endokrin neoplasia 1-es és 2-es típusáért felelős gének (*MEN1* gén és *RET* protoonkogén), a glükokortikoidreceptor, a szteroidhormon bioszintézisben és lebontásban szereplő fehérjék génjeinek és a hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebontásában szerepet játszó fehérjék génjeinek szekvencia variánsait a BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) program segítségével a publikus szekvenciák vizsgálatával kerestük. A kódoló szekvenciák vizsgálatához az nr (nem redundáns GenBank + EMBL + DDBJ + PDB szekvenciák) és a htgs (high throughput genomic sequences) adatbázisokat használtuk, míg a nem kódoló szekvenciák analíziséhez a Human Genome adatbázist. A glükokortikoidreceptorban azonosított szekvenciavariánsok potenciális funkcionális következményeit háromdimenziós molekuláris modellezéssel vizsgáltuk. Az ábrákat a Swiss-Pdb Viewer és POV-Ray programok segítségével állítottuk elő [198].

## 5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

### 5.1. Mellékvesekéreg-daganatok mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálata

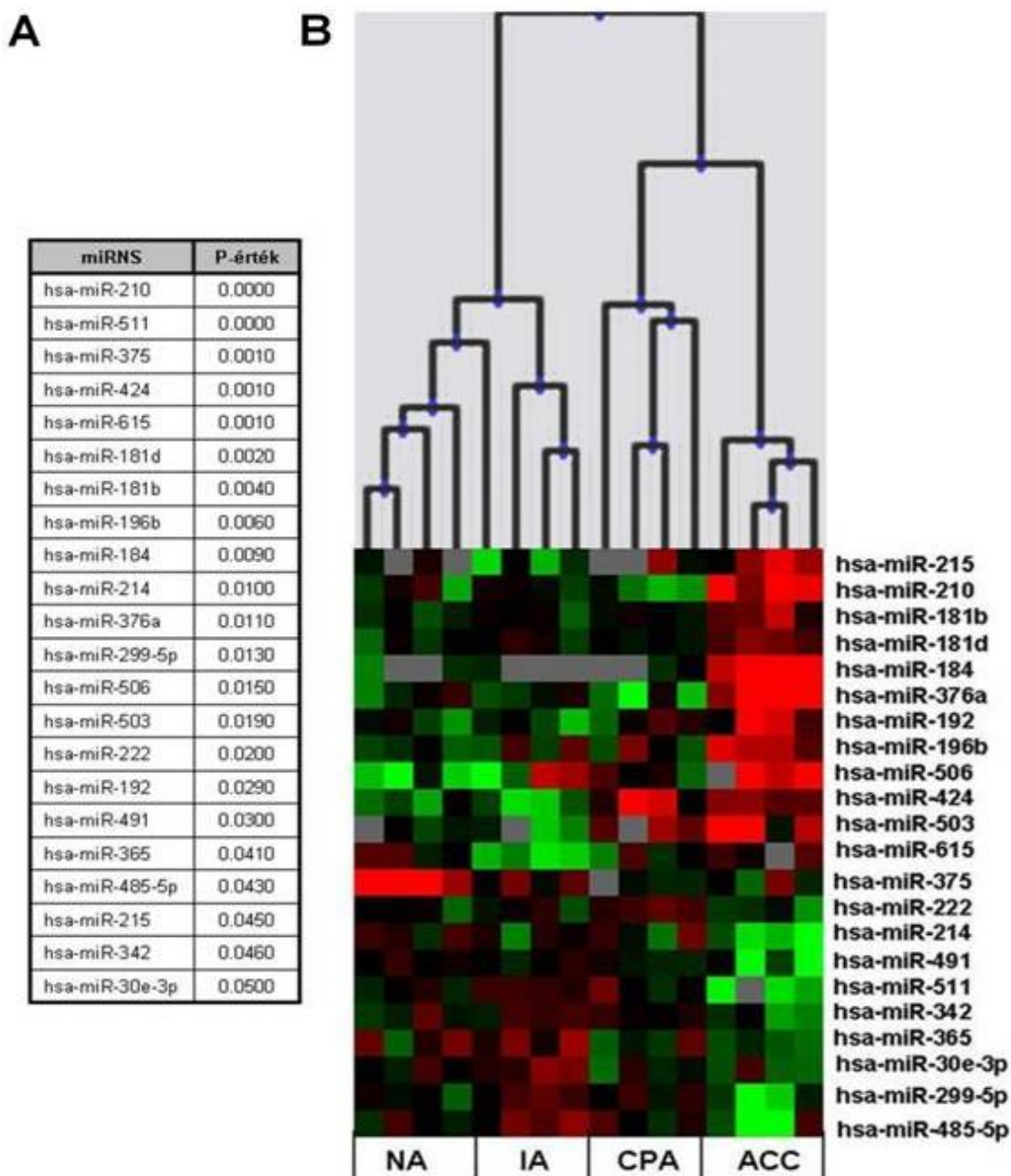
A mellékvesekéreg-daganatok mikroRNS expressziós mintázatát TLDA kártyákon vizsgáltuk 4 vizsgálati csoportban, csoportonként 4 mintán (n=16): ép mellékvesekéreg, hormonálisan inaktív adenomák, kortizoltermelő adenomák és kortizoltermelő rosszindulatú mellékvesekéreg-carcinoma (ACC) csoportokban. A TLDA kártyák 365 humán mikroRNS és két referencia gén (*RNU44* és *RNU48*) vizsgálatát tették lehetővé.

A ciklus küszöbértékek (CT) szórásának vizsgálata alapján a legkisebb szórást mutató *RNU48* kis molekulású RNS-t választottuk referencia (housekeeping) génnek. Összesen 22 szignifikánsan változó mikroRNS-t találtunk (ANOVA,  $p < 0.05$ ). A 22 szignifikáns expressziós eltérést mutató mikroRNS-t és a vizsgált 16 mintát a normalizált mikroRNS expressziós eredmények alapján hierarchikus klaszter (cluster) elemzésnek vetettük alá, amelynek során az azonos csoportba tartozó minták együtt csoportosultak. A **10. ábrán** látható mikroRNS expressziós hőkép ("heat map") a klaszter elemzés eredményét mutatja be.

A 22 szignifikánsan eltérő mikroRNS közül 14 mikroRNS (*hsa-miR-181b*, *hsa-miR-181d*, *hsa-miR-184*, *hsa-miR-196b*, *hsa-miR-210*, *hsa-miR-214*, *hsa-miR-215*, *hsa-miR-222*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-424*, *hsa-miR-503*, *hsa-miR-506*, *hsa-miR-511*, *hsa-miR-615*) validálását végeztük el valós idejű qRT-PCR-rel és ennek során a vizsgálati minták számát is megnöveltük (n=36: 10 ép mellékvesekéreg szövet, 10 hormonálisan inaktív és 9 kortizoltermelő adenoma, valamint 7 kortizoltermelő ACC).

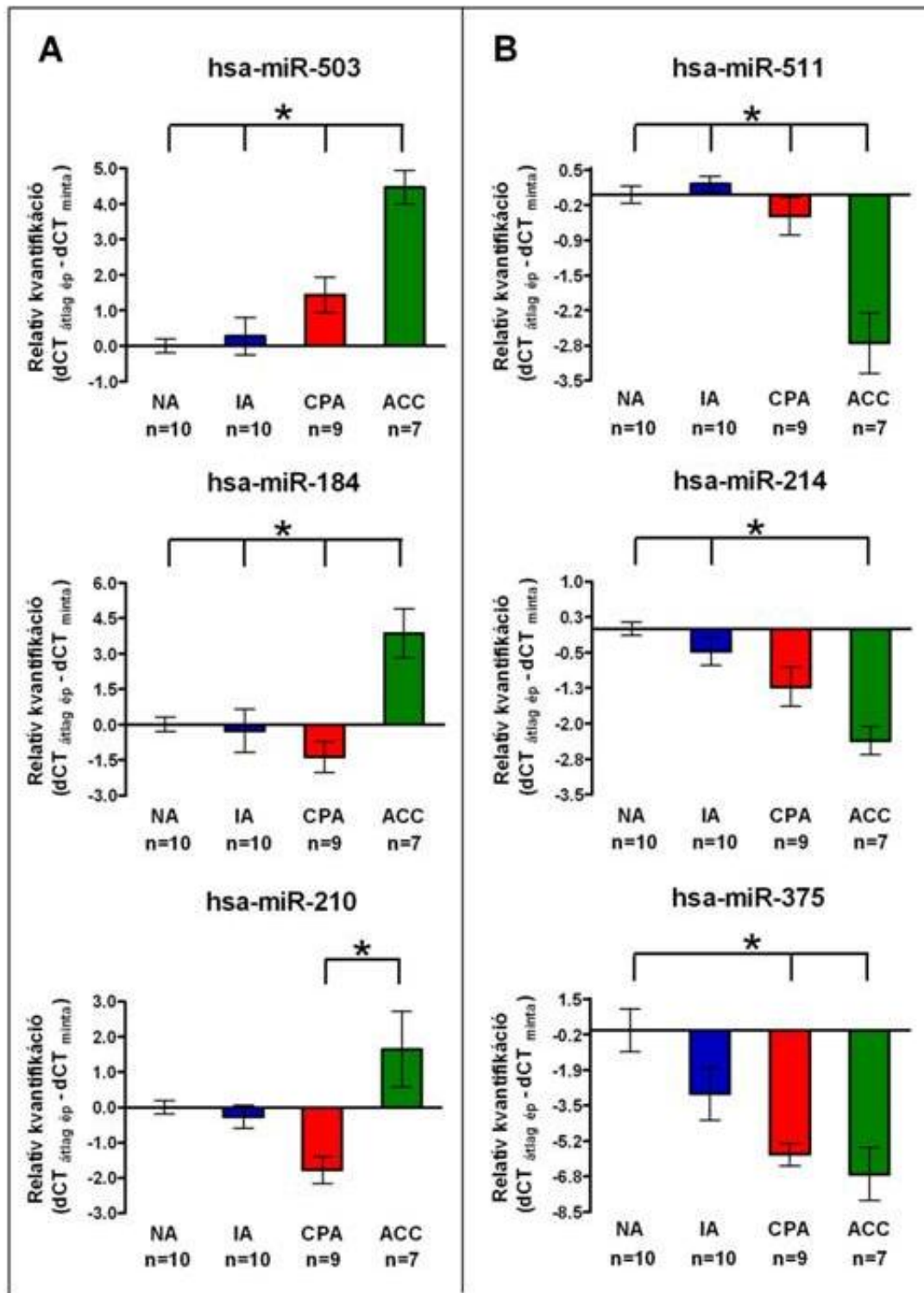
A 14 mikroRNS közül hat validálása sikerült (*hsa-miR-184*, *hsa-miR-210*, *hsa-miR-214*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-503* és *hsa-miR-511*) (**11. ábra**).

Ez a sikerességi arány hasonló ahhoz, amit más munkacsoportok is elértek az 1-es verziójú TLDA kártya eredményeinek validálása során [199]. E gyenge validálási hatékonyság hátterében tapasztalataink szerint elsősorban technikai problémák állhatnak. Ezek közé tartozik a minták betöltésének pontatlansága és a centrifugálás egyenetlensége, valamint a kártyán belüli technikai párhuzamosok hiánya.



**10. ábra: A mellékvesekéreg-daganatokban szignifikánsan eltérő kifejeződést mutató mikroRNS-ek listája (A) és hő térképe (B).** Rövidítések: NA: ép mellékvese; IA: inaktív adenoma; CPA: kortizoltermelő adenoma; ACC: kortizoltermelő mellékvesekéreg-carcinoma. A piros szín az expresszió fokozódását, a zöld az expresszió csökkenését, a szürke pedig a nem kimutatható miRNS-eket jelöli.

Az utóbbi problémát kiküszöbölhetnénk a minták ismételt lemérésével, de költséghatékonysági okokból inkább a szignifikánsan változó mikroRNS-ek expressziójának „gold standard” módszerét, a valós idejű qRT-PCR-rel történő validálását választottuk a minták számának egyidejű növelésével [200, 201].



**11. ábra: A mellékvesekéreg-daganatok között szignifikánsan eltérő, 6 validált mikroRNS expressziós változásai.**

Az ábrán az ép mellékvese szövetekhez viszonyított relatív mikroRNS expressziós változásokat (ddCT) tüntettük fel az egyes csoportokban (átlag $\pm$ SEM). NA: ép mellékvese; IA: inaktív adenoma; CPA: kortizoltermelő adenoma; ACC: mellékvesekéreg-carcinoma. \*: egyutas ANOVA,  $p < 0.05$ , post hoc teszt: Scheffé.

**(A)** ACC-ban fokozott **(B)** ACC-ban csökkent expressziójú miRNS-ek.

Eredményeinket összesítve a *hsa-miR-184* és *hsa-miR-503* kifejeződése szignifikánsan nagyobb mértékű volt a rosszindulatú daganatokban az ép mellékvesekéreg szövethez és benignus adenomákhoz viszonyítva, míg a *hsa-miR-210* kifejeződése a kortizoltermelő carcinomákban szignifikánsan magasabb volt a kortizoltermelő adenomákhoz képest. A *hsa-miR-184* kizárólag rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokban fejeződött ki. A *hsa-miR-214* és *hsa-miR-511* expressziója szignifikánsan csökkent volt a többi csoporthoz képest a rosszindulatú daganatokban. A *hsa-miR-375* expressziója ugyanakkor az ép szövetekben volt szignifikánsan magasabb a kortizoltermelő adenomákhoz és a carcinomákhoz viszonyítva. Az onkogén-tumorsuppresszor kettősség fogalmát a mikroRNS-ekre is alkalmazva [114], a ***hsa-miR-184*, *hsa-miR-503* és *hsa-miR-210* onkogén, míg a *hsa-miR-214*, *hsa-miR-511* és *hsa-miR-375* tumorsuppresszor funkciójú mikroRNS-nek tartható mellékvesekéreg-daganatokban.**

E hat szignifikánsan eltérő kifejeződést mutató mikroRNS élettani és daganatbiológiai jelentőségéről több adat ismert. A *hsa-miR-375* szerepet játszik az emberi hasnyálmirigy fejlődésében [202], és az az inzulin bioszintézis és a glükóz által stimulált inzulin szekréció szabályozásában is részt vesz [131]. A *hsa-miR-375* fokozott kifejeződése egérben a pancreas  $\beta$ -sejtek számának csökkenése nyomán diabetes mellitusra vezethet, ami antiproliferatív hatását jelzi [203]. Sejtproliferációt gátló, tumorsuppresszor jellegű hatását több daganat mikroRNS expressziós vizsgálata támogathatja, mivel hasnyálmirigy ductális adenocarcinomában [204], gyomor carcinomában [205] és squamosus nyelőcső-carcinomában is csökkent expresszióját írták le [206]. Vizsgálatainkban is csökkent kifejeződését észleltük a kortizoltermelő mellékvesekéreg-daganatokban. Ezzel szemben a *hsa-miR-375* kifejeződését prosztatákban fokozottnak találták [207], ami a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatásának példaként szolgálhat, ugyanis egy adott mikroRNS egyik szövetben tumorsuppresszor, másokban onkogén hatású is lehet. Érdeemes megemlíteni azt a megfigyelést is, hogy a *hsa-miR-375* kifejeződését szignifikánsan alacsonyabbnak találták a  $\beta$ -*katénin* mutáció talaján kialakuló jó- és rosszindulatú hepatocelluláris carcinomákban a vad típusú daganatokhoz viszonyítva. A  $\beta$ -*katénin* és a *hsa-miR-375* között közvetlen kölcsönhatás is lehetséges [208], ami különösen érdekes lehet arra tekintettel, hogy a *Wnt*- $\beta$ -*katénin* útvonal a mellékvesekéreg-daganatok patogenezisében is nagy fontosságú [5].

A mellékvesekéreg-carcinomákban eredményeink szerint csökkent kifejeződésű *hsa-miR-511* expresszió csökkenését a petefészek serosus carcinomáiban és endometroid carcinomákban is kimutatták [209]. A vizsgálataink szerint mellékvesekéreg-carcinomákban tumorszuppresszornak minősíthető *hsa-miR-214* csökkent expresszióját cervix-carcinomában is igazolták [210]. Szemben a mellékvesekéreg- és cervix-carcinomákban észlelt csökkent kifejeződésével, a *hsa-miR-214* számos más daganatban fokozott kifejeződést mutat, így onkogén hatású lehet (pancreas-, szájüregi squamosus, petefészek-, gyomor-carcinoma [211-214], ami ismét a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatását támasztja alá.

A fokozott kifejeződést mutató, mellékvesekéreg-daganatokban onkogénnek minősíthető *hsa-miR-503* biológiai jelentőségét több *in vitro* vizsgálatban tanulmányozták. Az *in vitro* megfigyelések elsősorban a *hsa-miR-503* sejtszaporodást gátló, differenciálódást elősegítő hatását jelzik: 1. colon carcinoma és osteosarcoma sejtvonalakon a *hsa-miR-503* a G1/S ellenőrzőponton a *ciklin-dependens kináz 2 (CDK2)* ativálásához szükséges *CDC25A* foszfatáz poszttranszkripció gátlásával a sejtciklus blokkját eredményezte [215]; 2. egér myoblast sejtek és a THP-1 humán leukaemia sejtvonal differenciálódását indukálta [216]. A *hsa-miR-503* és a *ciklin D1 (CCND1)* között közvetlen kapcsolatot is kimutattak [216]. Mindezen megfigyelések a *hsa-miR-503* tumorszuppresszor funkciójára utalnak, ugyanakkor saját eredményeink mellett más daganatok vizsgálata során tett megfigyelések is onkogén hatását jelzik. Retinoblastoma szövetekben a *hsa-miR-503* kifejeződése több mint négyszeres emelkedettséget mutatott az ép retina szövetekhez képest [217]. Mellékpajzsmirigy carcinomákban is fokozott kifejeződését írták le [146].

Mellékvesekéreg-carcinomákon tett megfigyeléseinkhez hasonlóan a *hsa-miR-184* fokozott kifejeződést mutatott a nyelv squamosus sejtes carcinomájában [218] és prosztatata carcinomában [219], ugyanakkor egy másik vizsgálatban az utóbbi daganatban csökkent expresszióját találták [220]. Csökkent expresszióját igazolták világossejtes veserákban [221], és neuroblastomában [222, 223] is.

Eredményeink szerint a *hsa-miR-210* szignifikánsan magasabb expressziót mutatott a kortizoltermelő mellékvesekéreg-carcinomákban a kortizoltermelő adenomákhoz képest. A *hsa-miR-210* szoros kapcsolatban áll a különböző hypoxiás állapotokkal, ami a mellékvesekéreg-carcinomák sajátossága is [224]. A *hsa-miR-210* szerepét számos folyamat szabályozásában vetették fel, így az angiogenezis, sejtciklus és az energiametabolizmus folyamataiban is. Mellékvesekéreg-carcinomában az érújdonképződés szabályozásában

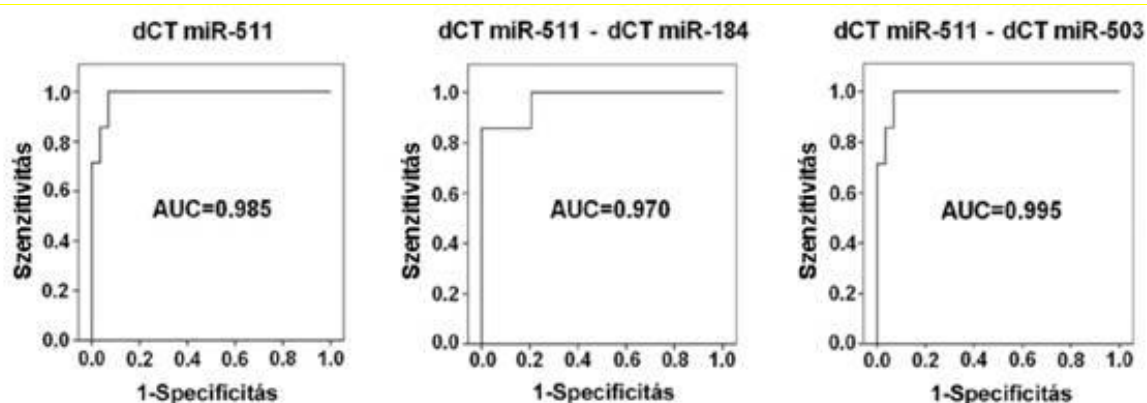
alapvető fontosságú vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (*VEGF*) kifejeződése fokozott mértékű [225]. Emlődaganatokban a *hsa-miR-210* kifejeződését a *VEGF* expresszióval, a hypoxia és az angiogenezis mértékével hozták összefüggésbe [226]. A *hsa-miR-210* fokozott kifejeződését számos más daganatban, így glioblastomában, melanomában, világossejtes veserákban és tüdőrákban is leírták [226]. Fontos kérdésként merül fel, hogy a *hsa-miR-210* fokozott kifejeződése a hypoxia következtében kialakuló másodlagos eltérés, vagy a daganatok kialakulásában alapvető onkogén tényező. A helyzetet tovább bonyolítják azon megfigyelések is, hogy e mikroRNS fokozott expressziója humán pancreas és fej-nyak carcinoma sejtvonalon a tumorsejtek növekedésének gátlását eredményezte [226], így egyes szövetekben tumorszuppresszor hatású is lehet. Érdekes következtetésekre adhat alapot az a megfigyelés is, hogy a *hsa-miR-210* génje a 11p15.5-ös lókuszon található, ugyanott, ahol a mellékvesekéreg-carcinoma patogenezisében alapvető jelentőségűnek tartott *IGF-2* géncsoport is elhelyezkedik [5]. Nem zárható ki annak lehetősége, hogy a *hsa-miR-210* és az *IGF-2* expressziójának mellékvesekéreg-carcinomára jellemző növekedése között kapcsolat lehetséges.

Mint az előzőekből látható, számos megfigyelés támasztja alá a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatását, ami megmagyarázza azt a jelenséget, hogy egy adott mikroRNS az egyik szövetben tumorszuppresszor, míg a másikon onkogén hatású is lehet. Mindezek alapján célszerűnek tűnik, hogy a mikroRNS-ek hatásának felderítéséhez a cél mRNS-ek azonosítását szövetspecifikus módszerrel kíséreljük meg.

### **5.1.1. A mellékvesekéreg rosszindulatúságát jelző mikroRNS biomarkerek azonosítása**

A mikroRNS-ek több daganat osztályozásában és rosszindulatú viselkedésének megállapításában bizonyultak hasznosnak. Egyes esetekben mikroRNS markerek segítségével olyan daganatok jó- és rosszindulatú formái is elkülöníthetők, amelyek esetében a szövettani vizsgálat nehézségekbe ütközik (pl. pajzsmirigy follicularis adenoma és carcinoma) [145]. Mivel a mellékvesekéreg-daganatok esetében is gyakran nehéz a szövettani vizsgálat alapján a rosszindulatúság kérdésének eldöntése, megvizsgáltuk a mellékvesekéreg-carcinómák és egyéb mellékvesekéreg szövetek között legnagyobb ciklusküszöb különbséget (deltaCT (cycle threshold)) mutató három mikroRNS (*hsa-miR-184*, *hsa-miR-503*, *hsa-miR-511*) és ezek

kombinációinak biomarkerként történő alkalmazási lehetőségét hatásfokmérő karakterisztikával (ROC analízis). A görbe alatti területek (Area Under the Curve=AUC) meghatározása során a  $dCT_{hsa-miR-511}$  (AUC=0.985), a  $dCT_{hsa-miR-511}-dCT_{hsa-miR-503}$  (AUC=0.995) valamint a  $dCT_{hsa-miR-511}-dCT_{hsa-miR-184}$  (AUC=0.970) bizonyult a rosszindulatúság eldöntésére alkalmas biomarkernek (**12. ábra**). A jó- és rosszindulatú daganatok elkülönítésére legalkalmasabb markernek a *hsa-miR-511* és a *hsa-miR-503* expressziós különbsége bizonyult: a diagnosztikai döntési szintet (cut-off-ot) 1,4-re beállítva (mellékvesekéreg-carcinoma a diagnózis, ha az adott mintában a  $dCT_{hsa-miR-511}-dCT_{hsa-miR-503} \geq 1.4$ ) **100%-os érzékenységgel és 97%-os fajlagossággal jelzi a rosszindulatúságot**. Ez az eredmény gyakorlati szempontból is nagy jelentőségű lehet. Mivel vizsgálatunkban összesen csak 7 rosszindulatú mellékvesekéreg-daganat vizsgálatára volt módunk, e biomarker gyakorlati alkalmazásához további nagyobb elemszámú, független mintacsoporton végzett megerősítő vizsgálatok szükségesek.



**12. ábra: A mellékvesekéreg-carcinomák elkülönítésére legalkalmasabb mikroRNS biomarkerek hatásfokmérő karakterisztika (ROC) görbéi.**

*dCT: ciklusküszöb különbség (delta cycle threshold, RNU48-ra normalizált CT érték); AUC: ROC görbe alatti terület (Area Under the Curve).*

### 5.1.2. Összevetés más munkacsoportok eredményeivel

Eredményeink közlését követően további négy a mellékvesekéreg-daganatok mikroRNS expresszióját vizsgáló tanulmány látott napvilágot [227-230]. Ezek közül három felnőttkori, egy pedig gyermekkorban manifesztálódó daganatokat vizsgált.

Soon és mtsai. microarray technikával 27 sporadikus mellékvesekéreg-adenoma, 22 sporadikus carcinoma és 6 ép mellékvesekéreg szövet mikroRNS expressziós profilját vizsgálták [227]. 23 mikroRNS szignifikáns expressziós eltérését igazolták a jó- és rosszindulatú daganatok között. Bár a szignifikánsan eltérő mikroRNS-ek száma e tanulmányban és vizsgálatunkban igen hasonló (23 ill. 22), mindössze két mikroRNS volt a két listában közös (a carcinomákban fokozott kifejeződést mutató *hsa-miR-503* és *hsa-miR-181b*). Soon és mtsai. tanulmányában a mellékvesekéreg-daganatok ép mintákkal történő összehasonlítása során csupán két mikroRNS expressziója különbözött szignifikánsan: a *hsa-miR-7* és a *hsa-miR-129-3p* egyaránt csökkent mértékben fejeződött ki a daganatokban az ép szövetekhez képest. Négy szignifikánsan változó mikroRNS (*hsa-miR-335*, *hsa-miR-483-5p*, *hsa-miR-195*, *hsa-miR-7*) validálását végezték el qRT-PCR-rel, amelynek során belső kontrollnak saját munkánkhoz hasonlóan az *RNU48*-at alkalmazták. A *hsa-miR-195* csökkent, míg a *hsa-miR-483-5p* fokozott expresszióját a mellékvesekéreg-carcinoma kedvezőtlen kimenetelével hozták összefüggésbe [227].

Soon és mtsai, valamint saját eredményeink közötti különbségek hátterében több tényező állhat. Bár Soon és mtsai. nagyobb mintaszámú csoportokat vizsgáltak, az egyes daganatok hormontermelő képességét nem vették figyelembe. Ezzel szemben saját vizsgálatainkban a mellékvesekéreg-adenomákon belül hormonálisan inaktív és kortizoltermelő daganatokat különböztettünk meg és valamennyi mellékvesekéreg-carcinoma mintánk kortizoltermelő daganatból származott. Ismert, hogy mind a jó-, mind a rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokban kimutattak glükokortikoidreceptorokat, amelyek fokozott kifejeződését mutatták ki mellékvesekéreg-carcinomákban [231]. Munkacsoportunk eredményei szerint a glükokortikoidok befolyásolhatják a mikroRNS expressziós mintázatot mellékvesekéreg sejtvonalon [Butz H és Patócs A, személyes közlés]. Véleményünk szerint, a hormontermelést a daganatok mikroRNS expressziós vizsgálata során célszerű ezért figyelembe venni. A másik fontos különbség a két vizsgálat között, hogy vizsgálatunkban a kontrollként használt ép mellékvese minták rosszindulatú vesedaganat

miatt operált betegektől származtak, míg Soon és mtsai-tanulmányában a mellékvesekéreg-adenoma melletti épnek minősített mellékvesekéreg szövetet használtak fel. Papilláris pajzsmirigy carcinomák vizsgálata során igazolták, hogy a carcinomával szomszédos, szövettanilag épnek minősített szövetben a *hsa-miR-221* a tumorszövethez hasonlóan fokozott expressziót mutatott [144]. Felmerülhet annak a lehetősége, hogy Soon és mtsai. tanulmányában azért észleltek csekély különbséget az ép és daganatos mellékvesekéreg szövetek mikroRNS expressziós profiljában, mert ez a jelenség mellékvesekéreg-daganatok esetében is előfordulhat.

Patterson és mtsai. vizsgálatában 26 jó- és 10 rosszindulatú mellékvesekéreg-daganat (hormonálisan inaktív és kortizoltermelő) mikroRNS expressziós mintázatát hasonlították össze egészséges donorokból származó ép mellékvesekéreg szövetekkel [229]. Itt is 23 szignifikánsan eltérő expressziót mutató mikroRNS-t azonosítottak, amelyek közül 18 csökkent (köztük a *hsa-miR-214*), 5 pedig fokozott mértékben fejeződött ki mellékvesekéreg-carcinomákban. Valós idejű qRT-PCR-rel validálták a *hsa-miR-483-5p* fokozott, valamint a *hsa-miR-195* csökkent expresszióját. A rosszindulatú daganatok markereként a *hsa-miR-483-5p* expressziójának vizsgálata 100%-os pozitív és 92%-os negatív prediktív értékkel bírt (80%-os érzékenység és 100%-os fajlagosság). Érdekes molekuláris mechanizmus lehetőségét veti fel az a megfigyelés, hogy a *hsa-miR-483-5p* génje az *IGF-2*- gén 2-es intronjában található, ami a két gén közös szabályozásának lehetőségére utalhat [229].

A legújabb közleményben Schmitz és mtsai. [230] 4 ép mellékvese, 9 mellékvesekéreg-adenoma, 4 carcinoma és 3 távoli áttét mikroRNS expressziós mintázatát vizsgálták TaqMan kártya felhasználásával. Vizsgálatukban formalin fixált, paraffinos (FFPE) blokkokat használtak, ami mellékvesekéreg-daganatokban is igazolja ezek alkalmazhatóságát a mikroRNS mintázat vizsgálatában. Egy 38 mikroRNS-ből álló készlet segítségével a mellékvesekéreg-carcinomákat sikeresen tudták elkülöníteni az adenomáktól. E mikroRNS készletben megtalálható a vizsgálatunkban is azonosított *hsa-miR-511*, *hsa-miR-503*, *hsa-miR-214* és *hsa-miR-215*, amelyek expressziója a mi eredményeinkkel azonos módon változott. A három legnagyobb expressziós eltérést mutató mikroRNS valós idejű qRT-PCR validálásával a *hsa-miR-139-3p*, a *hsa-miR-675* és a *hsa-miR-335* csökkent kifejeződését találták rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokban [230].

Érdemes még megemlíteni a negyedik, gyermekkori mellékvesekéreg-daganatok vizsgálatára vonatkozó tanulmányt [228]. E tanulmányban 26 mikroRNS expressziója

mutatott szignifikáns eltérést a mellékvesekéreg-daganatokban (6 fokozott, 20 csökkent kifejeződésű). A *hsa-miR-195* szignifikánsan csökkent, míg a *hsa-miR-483-5p* szignifikánsan fokozott kifejeződést mutatott a rosszindulatú daganatokban [228], ami egyezik Soon és mtsai illetve Patterson és mtsai megfigyelésével [227, 229]. Az általunk vizsgált mellékvesekéreg-carcinomákban észlelt eltérésekhez hasonlóan a *hsa-miR-375* és a *hsa-miR-214* csökkent, a *hsa-miR-503* pedig fokozott kifejeződést mutatott a gyermekkori mellékvesekéreg tumorokban. A *hsa-miR-99a* és *hsa-miR-100* csökkent kifejeződését igazolták, és *in vitro* kísérletekkel kimutatták, hogy ezek az *IGF-1R* - *mTOR* (*mammalian target of rapamycin*) útvonal működését befolyásolhatják. Ezek alapján felmerül ezen útvonal terápiás befolyásolásának lehetősége is [228].

E négy tanulmány és saját vizsgálatunk valós idejű qRT-PCR módszerrel validált eredményeit összehasonlítva viszonylag kevés átfedést találunk. Összesen öt olyan mikroRNS-t (*hsa-miR-483-5p*, *hsa-miR-195*, *hsa-miR-100*, *hsa-miR-125b*, *hsa-miR-214*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-503*) találunk, amelyek szignifikáns expressziós különbségeit legalább két tanulmányban validálták. Ennek hátterében szerepet játszhatnak az eltérő csoportosítási szempontok, az alacsony mintaszám, a metodika és statisztikai módszerek különbségei. Mindezek alapján további, nagy elemszámú, független vizsgálati csoportokon végzendő vizsgálatokra van szükség ahhoz, hogy a mikroRNS-ek expressziós mintázatára és biomarkereként történő alkalmazásukra vonatkozó, a gyakorlatban széleskörűen használható ismeretekre tehesünk szert.

## 5.2. 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, biológiai jelentőségük igazolásához ezek cél mRNS-einek azonosítása szükséges. A számítógépes predikciós algoritmusokkal *in silico* azonosított cél mRNS-ek száma túl nagy és ezek biológiai relevanciája nem ismert. A mellékvesekéreg-daganatokban igazolt hat szignifikáns mikroRNS potenciális cél mRNS-eit három predikciós algoritmussal (Targetscan, Pictar és MiRBase) vizsgáltuk. Mivel jelenleg nincsen egyértelmű állásfoglalás az egyes algoritmusok hatékonyságát illetően, a három algoritmus eredményét integráltuk egy saját fejlesztésű adatbáziskezelő alkalmazás segítségével. Így a hat mikroRNS-re összesen 17868 potenciális mRNS-t került azonosításra, ami az összes mRNS-re vetítve is tekintélyes számot jelent. Mivel egy adott mRNS-t a hat mikroRNS közül több is szabályozhat, ez összesen 13147 különböző cél mRNS-t jelent. A miRBase 7140, a TargetScan 11336, a PicTar pedig 667 szóbjövő cél mRNS-t azonosított a hat szignifikáns mikroRNS-nek megfelelően. A cél mRNS-ek közül 1275 mutatott legalább két algoritmus között átfedést, ami az összes szóbjövő célpont 7%-át teszi ki.

Ahhoz, 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.**

### 5.2.1. Teljes genom génexpressziós vizsgálatok

Ugyanazon a 16 mintán, amelyben a mikroRNS-ek kifejeződésének mintázatát TLDA kártyákkal vizsgáltuk, teljes genom génexpressziós (mRNS) microarray vizsgálatot is végeztünk Agilent 4x44 K kártyákon. A 4 vizsgálati csoportban 614 gén mutatott szignifikáns expressziós eltérést ( $p < 0,05$ ). Ezek között több, már korábban leírt gént találtunk, pl. a mellékvesekéreg-carcinómában fokozott expressziót mutató *IGF-2*-t, a topoizomeráz 2A-t (*TOP2A*) [36], amelyeket valós idejű RT-PCR-rel mi is validálni tudtunk. A sejtciklus szabályozásában kulcsfontosságú szerepet játszó *ciklin B2* (*CCNB2*) kifejeződését mellékvesekéreg-carcinómákban több mint 14-szeresnek találtuk a másik három csoporttal

összehasonlítva. A további sejtciklust szabályozó gének közül a *cell division cycle 2* és *25C* (*CDC2* és *CDC25C*) expresszióját szintén szignifikánsan magasabbnak találtuk mellékvesekéreg-carcinomákban az ép szövethez és benignus adenomákhoz képest. Ezzel szemben a *CDKN1C* szignifikáns expresszió csökkenést mutatott a carcinoma csoportban.

### 5.2.2. A cél mRNS-ek körének szűkítése a teljes genom génexpressziós eredmények felhasználásával

Az mRNS mintázat alapján kiszűrhetők azon mRNS-ek, amelyek nem expresszálódnak, így nem állhatnak mikroRNS-ek általi szabályozás alatt. **A microarray alapján nem expresszáló mRNS-eket a potenciális cél mRNS-ek köréből kiszűrve, a hat szignifikánsan változó mikroRNS szóbjövő cél mRNS-einek számát számottevően tudtuk csökkenteni (5. táblázat).**

Második lépésben a szóbjövő cél mRNS-ek körét úgy csökkentettük tovább, hogy a mikroRNS-ekkel ellentétes változást mutató mRNS molekulákat kerestünk. Újabb eredmények alapján ugyanis, a mikroRNS-ek hatása döntően az mRNS-ek lebomlásán keresztül érvényesül [124, 125], miáltal az mRNS mintázat jól tükrözi a mikroRNS-ek hatását: az adott mikroRNS expressziójának fokozódása a cél mRNS expressziójának csökkenésével jár és fordítva. **GSEA módszerrel kerestük az eltérő változást mutató mRNS-eket.**

| miRNS          | TargetScan | PicTar | miRBase | Összes prediktált célpont | Összes prediktált szövetspecifikus célpont |      |      |      |
|----------------|------------|--------|---------|---------------------------|--------------------------------------------|------|------|------|
|                |            |        |         |                           | NA                                         | IA   | CPA  | ACC  |
| <b>miR-184</b> | 609        | 17     | 1164    | 1683                      | 771                                        | 906  | 905  | 909  |
| <b>miR-503</b> | 1547       | NP     | 1225    | 2617                      | 1359                                       | 1642 | 1635 | 1573 |
| <b>miR-511</b> | 3045       | NP     | 1064    | 3945                      | 2295                                       | 2615 | 2658 | 2536 |
| <b>miR-214</b> | 3874       | 528    | 1427    | 5252                      | 2870                                       | 3463 | 3470 | 3367 |
| <b>miR-375</b> | 1790       | 107    | 1158    | 2871                      | 1537                                       | 1781 | 1804 | 1744 |
| <b>miR-210</b> | 471        | 15     | 1102    | 1500                      | 687                                        | 793  | 807  | 784  |

**5. táblázat: A szignifikáns expressziós eltérést mutató 6 mikroRNS három algoritmus által azonosított célpontjainak valamint a négy vizsgálati csoportban expresszáló, szövetspecifikus cél mRNS-einek száma; NA: ép mellékvese; IA: inaktív adenoma; CPA: kortizoltermelő adenoma; ACC: mellékvesekéreg-carcinoma; NP: nem prediktált (=nem vizsgált).**

A GSEA-t a négy vizsgálati csoport valamennyi olyan összehasonlításában elvégeztük, ahol szignifikáns mikroRNS expressziós eltérést tudtunk kimutatni. Az ép mellékvese vs. mellékvesekéreg-carcinoma összehasonlításban összesen 1306, az inaktív adenoma vs. carcinoma összehasonlításban 647, a kortizoltermelő adenoma vs. carcinoma összehasonlításban 570, míg az ép mellékvese vs. kortizoltermelő adenoma párosítás esetén 451 ellentétes irányban változó, szövetspecifikus targetet tartalmazó listákat kaptunk, **és ezzel a szóbjövő mRNS célpontok halmazát összesen kb. 700-ra sikerült csökkenteni**, ami már egy viszonylag jól kezelhető mennyiség.

A szövetspecifikus predikciós módszerünkhöz hasonló megközelítéseket nemrégiben más munkacsoportok is közöltek. A Gennarino és mtsai. által kifejlesztett HOCTAR (Host Gene Oppositely Correlated Targets) program azt a megfigyelést használja ki, hogy a mikroRNS-eket kódoló gének gyakran a fehérjét kódoló gének intronikus szakaszain helyezkednek el, így ezek a mikroRNS-ek az őket hordozó gének részeként kerülnek átírásra. A HOCTAR alkalmazása során azt tételezik fel, hogy a mikroRNS-t hordozó gének és a mikroRNS cél mRNS-ek expressziója ellentétes irányban változik. A HOCTAR az eddig használt target predikciós algoritmusokkal szemben megbízhatóbbnak bizonyult a már korábban validált mikroRNS-mRNS kölcsönhatások azonosítása terén [232]. Módszerünkkel összevetve e módszer hátránya lehet, hogy az adott szövetben nem közvetlenül vizsgálja a mikroRNS expressziós mintázatot, és csak az intronikus elhelyezkedésű mikroRNS-ek célpontjainak azonosítására nyújt lehetőséget. Egy másik módszer, a GenMiR++ (Generative Model for miRNA Regulation) algoritmus a különböző szövetekben párhuzamosan elvégzett mRNS és mikroRNS expressziós microarray vizsgálatok eredményei alapján ellentétes expressziós eltérést mutató mikroRNS-mRNS kölcsönhatások felderítését célozza [233]. E megközelítés nagyban hasonlít a mi módszerünkhöz, de komoly eltérés, hogy a GenMiR++ csak a TargetScan algoritmus eredményeit használja, míg a mi módszerünkben három különböző "*in silico*" algoritmus eredményeinek vizsgálatára van lehetőség. A mi módszerünkben e mellett nemcsak az ellentétes irányban változó mikroRNS-mRNS expressziós különbségeket tudjuk kimutatni, hanem a nem kifejeződő mRNS-ek kiszűrésével a biológiailag releváns célpontok körét tovább szűkíthetjük.

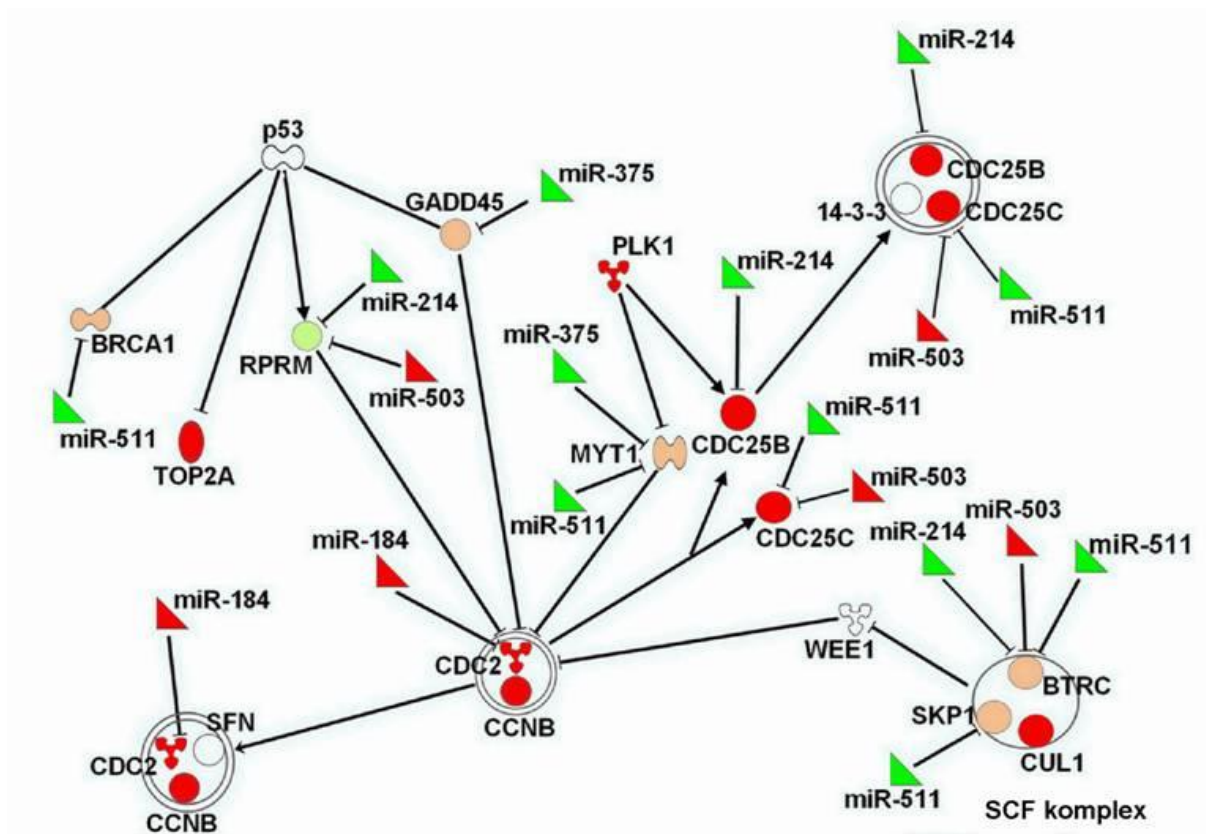
### 5.2.3. Útvonalelemzés a szövetspecifikus target predikció eredményei alapján

A fenti módszerrel azonosított szövetspecifikus potenciális cél mRNS-eket IPA útvonalelemzésnek vetettük alá, ami a mellékvesekéreg-carcinomák ép mellékvese szövetekkel történő összehasonlítása során a **sejtciklus G2-M szabályozó pontjának károsodását jelezte a mellékvesekéreg-carcinomában**, mint a mikroRNS-ek által első helyen befolyásolt patogenetikai utat. Meg kell azonban jegyezni, hogy e potenciális mikroRNS-mediált hatások csak bioinformatikai predikciók, amelyek igazolásához további, kísérleti vizsgálatok szükségesek.

A mikroRNS célpontok útvonalelemzése mellett a teljes genom génexpressziós vizsgálat mRNS eredményeinek útvonalelemzését is elvégeztük, ami hasonló eredményre vezetett.

Mindezek alapján a sejtciklus G2-M szabályozó pontjának károsodása mind az mRNS-ek szintjén, mind pedig a mikroRNS-ek szintjén a mellékvesekéreg-carcinoma patogenezisének alapvető jelentőségű patomechanizmusát jelenti, vagyis az mRNS szinten észlelt eltérések egy részéért a mikroRNS-ek megváltozott expressziója lehet felelős (**13. ábra**).

A sejtciklus G2/M ellenőrzőpontjának károsodása számos daganat patogenezisében alapvető jelentőségű eltérés [234]. Mellékvesekéreg-carcinomában számos génexpressziós eltérést azonosítottak, ami a sejtciklus zavarát jelzi. Sporadikus mellékvesekéreg-carcinomában a G1/S átmenet szabályozásának zavarát, számos ciklin és ciklinekkel kapcsolatos gén expressziós eltérést írtak le (fokozott *CCND1* expresszió, a *CDKN1C*-t kódoló gén funkcióvesztése, fokozott *CCNE* és G1-specifikus ciklin-dependens kináz (*CDK2*, *CDK4*) kifejeződés) [235, 236]. Génexpressziós microarray vizsgálatunk során a mellékvesekéreg-carcinomában több, a G2/M ellenőrzőpont szabályozásában szereplő fehérjét kódoló gén (*ciklin B* (*CCNB1*, *CCNB2*), a *CDC2*, a *CDC25B*, a *CDC25C* és *TOP2A*) fokozott kifejeződését találtuk az ép szövetekhez viszonyítva. Mellékvesekéreg-carcinoma sejtvonalakon (SW-13, H295R) számos kísérleti eredmény támasztja alá a sejtciklus eltéréseinek szerepét [237, 238].



**13. ábra: Az útvonalelemzés eredménye: sejtciklus G2/M ellenőrzőpontjának károsodása mellékvesekéreg-carcinomákban.**

Az egyes fehérjék közötti vonalak és nyilak az ismert molekuláris kölcsönhatásokat jelzik. A háromszögek a mellékvesekéreg-carcinoma és ép mellékvese minták között szignifikáns expressziós eltérést mutató mikroRNS-eket jelölik. Piros: szignifikáns expresszió növekedés; rózsaszín: nem szignifikáns mértékű expresszió fokozódás; sötétzöld: szignifikáns expresszió csökkenés; világoszöld: nem szignifikáns mértékű expresszió csökkenés.

A sejtciklus szabályozásában szereplő SCF (*SKP1/CUL1/F-box protein*) komplex több tagjának fokozott kifejeződését találtuk mellékvesekéreg-carcinomákban. Az SCF komplex aktivitásának fokozódását számos daganat patogenezisével hozták összefüggésbe [239]. A génexpressziós microarray eredményeink szerint a sejtek DNS károsodásra adott válaszában szerepet játszó, *TP53* által szabályozott *Reprimo (RPRM)* a mellékvesekéreg-carcinoma szövetekben szignifikánsan csökkent kifejeződést mutatott. Az *RPRM* fokozott kifejeződése a sejtciklus G2 fázisban kialakuló blokkját eredményezi [240], ami alapján felmerül, hogy kifejeződésének csökkenése a mellékvesekéreg-carcinoma sejtek szaporodásában játszhat szerepet.

E sejtciklus szabályozásában résztvevő gének mikroRNS-ek általi szabályozását nem mellékvesekéreg eredetű sejtvonalakon már igazolták. A *CCND1* mRNS lebomlásában nem-kissejtes tüdő carcinoma sejtvonalon a *hsa-miR-34a* [241], fej-nyak carcinoma és vese epitheliális sejtvonalon pedig a *hsa-miR-503* játszik szerepet [217]. A mellékvesekéreg-carcinomában csökkent kifejeződést mutató *CDKN1C* gátlásában glioblastoma sejtvonalon a *hsa-miR-221* [242], míg a *CDK4* poszttranszkripció szabályozásában a *hsa-miR-124* jelentőségét igazolták [123].

Vizsgálataink alapján **lehetségesnek tűnik, hogy a mellékvesekéregben a sejtciklus G2/M ellenőrzőpontját a mikroRNS-ek is szabályozzák, azonban ezek a mikroRNS-ek nem azonosak a más szöveteken validált mikroRNS-ekkel.** Ez a megfigyelés ismét a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatását támasztja alá. Fontos azonban ismét hangsúlyozni, hogy a vizsgálatainkban kimutatott mikroRNS-mRNS kölcsönhatások csak bioinformatikai módszerekkel azonosított kapcsolatok, így ezek alátámasztásához kísérletes validálásuk szükséges. Mindazonáltal *in silico* módszerünk alkalmazhatóságát jelzi az a tény, hogy az útvonalelemzés eredményei mellékvesekéreg-carcinomákban mind transzkripció, mind poszttranszkripció szinten a G2/M ellenőrzőpont károsodásának jelentőségére utalnak és ezt a későbbiekben ismertetett metanalízisünk eredményei is alátámasztani látszanak.

### 5.3. Phaeochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálata

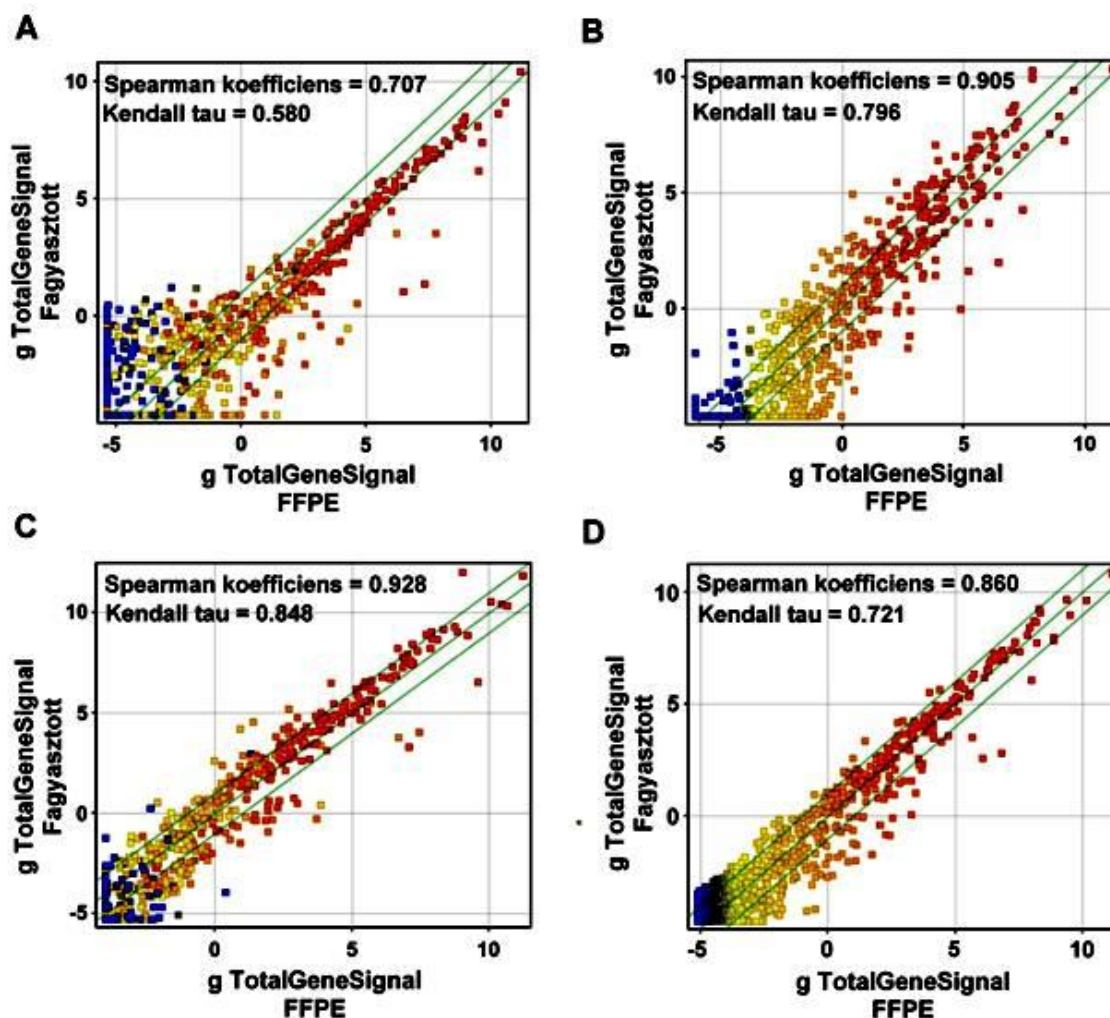
A mikroRNS-ek expressziós mintázatát sporadikus benignus, MEN2 és VHL talaján kialakult benignus, valamint primer recidiváló phaeochromocytomák formalinban fixált, paraffinos szövetblokkjaiból (FFPE) izolált RNS-mintákban vizsgáltuk. A kisméretű mikroRNS-ek stabilabbak és jóval ellenállóbbak, mint az mRNS-ek, így más szöveteken végzett vizsgálatok alapján a mikroRNS-ek kifejeződési mintázatát paraffinos szövetblokkokból izolált mintákból is hatékonyan lehet tanulmányozni [179, 243, 244].

Mint várható volt, a fagyasztott mintákból izolált teljes RNS sokkal jobb minőségű volt (RIN: 7,7-9,0), mint az FFPE mintákból nyert RNS. Az RNS-lebomlás mértéke a phaeochromocytoma FFPE mintákban megegyezett (RIN: 2,0-4,0) más szövetek FFPE mintáin végzett vizsgálatok eredményeivel [179, 245].

Annak érdekében, hogy a phaeochromocytomák esetében is bizonyítsuk az FFPE minták alkalmazhatóságát a mikroRNS mintázat vizsgálatára, korrelációs vizsgálatot végeztünk három phaeochromocytomából származó FFPE és fagyasztott mintapárban. Ennek során magas korrelációs koefficienseket észleltünk (Spearman koefficiens 0.7-0.93, Kendall tau korrelációs koefficiens 0.58-0.85) **(14. ábra)**, aminek alapján megállapítható, hogy a **paraffinos mintákból készített RNS-izolátumok alkalmasak a mikroRNS expresszió vizsgálatára phaeochromocytomákban is**, ami e ritka daganatok vizsgálatát megkönnyítheti.

Miután igazoltuk az FFPE minták alkalmazhatóságát a phaeochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatának vizsgálatára, 21 mintán (6 sporadikus benignus, 5 sporadikus recidiváló, 5 MEN2 és 5 VHL) végeztünk mikroRNS microarray vizsgálatot 8x15K Agilent platformon. A szignifikánsan különböző mértékben kifejeződő mikroRNS-ek validálására és a mintaszám növelésére qRT-PCR-t használtunk. (Rosszindulatú phaeochromocytoma minta sajnos nem állt elegendő számban rendelkezésünkre.)

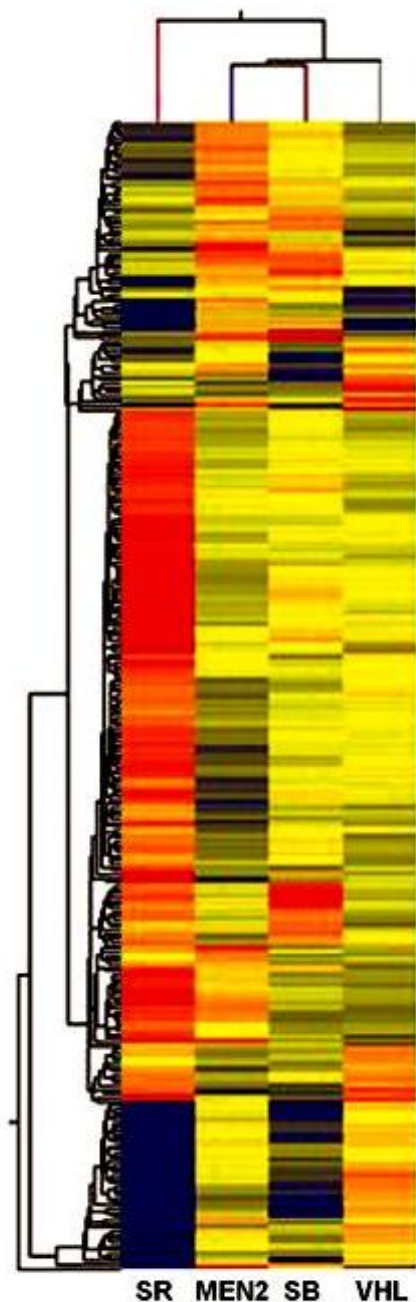
A microarray vizsgálat eredményeinek elemzése során 478 olyan mikroRNS-t találtunk, amelyek legalább az egyik vizsgálati csoportban 100%-ban kimutathatóak voltak. Ezek között 309 olyan mikroRNS-t azonosítottunk, amelyek a vizsgálati csoportok között legalább kétszeres mértékben eltérő expressziót mutatott (fold change > 2).



**14. ábra:** A mikroRNS expresszió korrelációjának vizsgálata azonos betegekből származó FFPE és fagyasztott mintapárjaiban (scatter plot)

**A:** sporadikus benignus, **B:** sporadikus recidíváló, **C:** MEN2-höz társult pheochromocytomák FFPE és fagyasztott mintáinak mikroRNS expressziós adatai, **D:** az FFPE és fagyasztott csoportok (n=3) mikroRNS expressziós átlagai („scatter plot”)

A négy kísérleti csoportot a 309 mikroRNS normalizált intenzitás adatai alapján hierarchikus klaszter analízisnek vetettük alá, amelynek eredményei alapján a sporadikus recidíváló daganatok mintázata tért el legnagyobb mértékben a többi csoporttól (**15. ábra**). A microarray vizsgálat statisztikai elemzését (egyutas ANOVA,  $p < 0.01$ ; majd Tukey HSD post hoc teszt), mind a GeneSpring 10.1, mind a Statistica 8.0 programmal elvégeztük. A GeneSpring 16, míg a Statistica 14 szignifikánsan változó mikroRNS-t talált, amelyek közül 11 volt átfedő (**6. táblázat**).



**15. ábra: A hierarchikus klaszter elemzés eredménye (hő térkép) a különböző típusú pheochromocytomák mikroRNS expressziós mintázata alapján**

SR: sporadikus recidíváló; SB: sporadikus benignus; VHL: von Hippel-Lindau szindrómához társuló; MEN2: multiplex endokrin neoplasia 2-es típusához társuló pheochromocytoma.

piros: fokozott, kék: csökkent expresszió, sárga: változatlan expresszió

A sporadikus benignus vs. VHL pheochromocytoma összehasonlításában 2, a sporadikus benignus vs. sporadikus recidíváló daganatok között 1, a VHL vs. MEN2 összehasonlításban 1, a sporadikus recidíváló vs. VHL daganatok között 11, míg a sporadikus recidíváló-MEN2 összehasonlításban 5 mikroRNS bizonyult szignifikánsan eltérőnek (Statistica). A sporadikus recidíváló daganatokat a többi, nem recidíváló daganattal összehasonlítva 12 mikroRNS kifejeződését találtuk szignifikánsan különbözőnek.

| GeneSpring 10.1 programmal<br>azonosított szignifikáns<br>mikroRNS-ek listája |         | Statistica 8.0 programmal<br>azonosított szignifikáns<br>mikroRNS-ek listája |         |
|-------------------------------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------|---------|
| miRNS                                                                         | P-érték | miRNS                                                                        | P-érték |
| hsa-miR-885-5p                                                                | 0.0014  | hcmv-miR-UL70-3p                                                             | 0.0018  |
| hcmv-miR-UL70-3p                                                              | 0.0015  | hsa-miR-885-5p                                                               | 0.0022  |
| hsa-miR-1225-3p                                                               | 0.0018  | hsa-miR-940                                                                  | 0.0022  |
| hsa-miR-940                                                                   | 0.0028  | hsa-miR-1225-3p                                                              | 0.0029  |
| hsa-let-7b*                                                                   | 0.0033  | hsa-miR-541                                                                  | 0.0044  |
| hsa-miR-663                                                                   | 0.0036  | hsa-miR-663                                                                  | 0.0055  |
| hsa-miR-541                                                                   | 0.0047  | hsa-miR-636                                                                  | 0.0055  |
| hsa-miR-765                                                                   | 0.0065  | hsa-miR-631                                                                  | 0.0059  |
| hsa-miR-1228                                                                  | 0.0071  | hsa-miR-33b*                                                                 | 0.0072  |
| hsa-miR-631                                                                   | 0.0076  | hsa-miR-766                                                                  | 0.0082  |
| hsa-miR-636                                                                   | 0.0079  | hsa-miR-583                                                                  | 0.0084  |
| hsa-miR-33b*                                                                  | 0.0083  | hsa-miR-212                                                                  | 0.009   |
| hsa-miR-132*                                                                  | 0.0085  | hsa-miR-139-3p                                                               | 0.0092  |
| hsv1-miR-H6                                                                   | 0.0089  | hsa-miR-1228                                                                 | 0.0095  |
|                                                                               |         | hsa-miR-1300_v13.0                                                           | 0.0095  |
|                                                                               |         | hsa-miR-765                                                                  | 0.0096  |

**6. táblázat:** A szignifikánsan eltérő mikroRNS-ek listája a microarray vizsgálat alapján a különböző típusú phaeochromocytoma minták között a GeneSpring és Statistica programok felhasználásával.

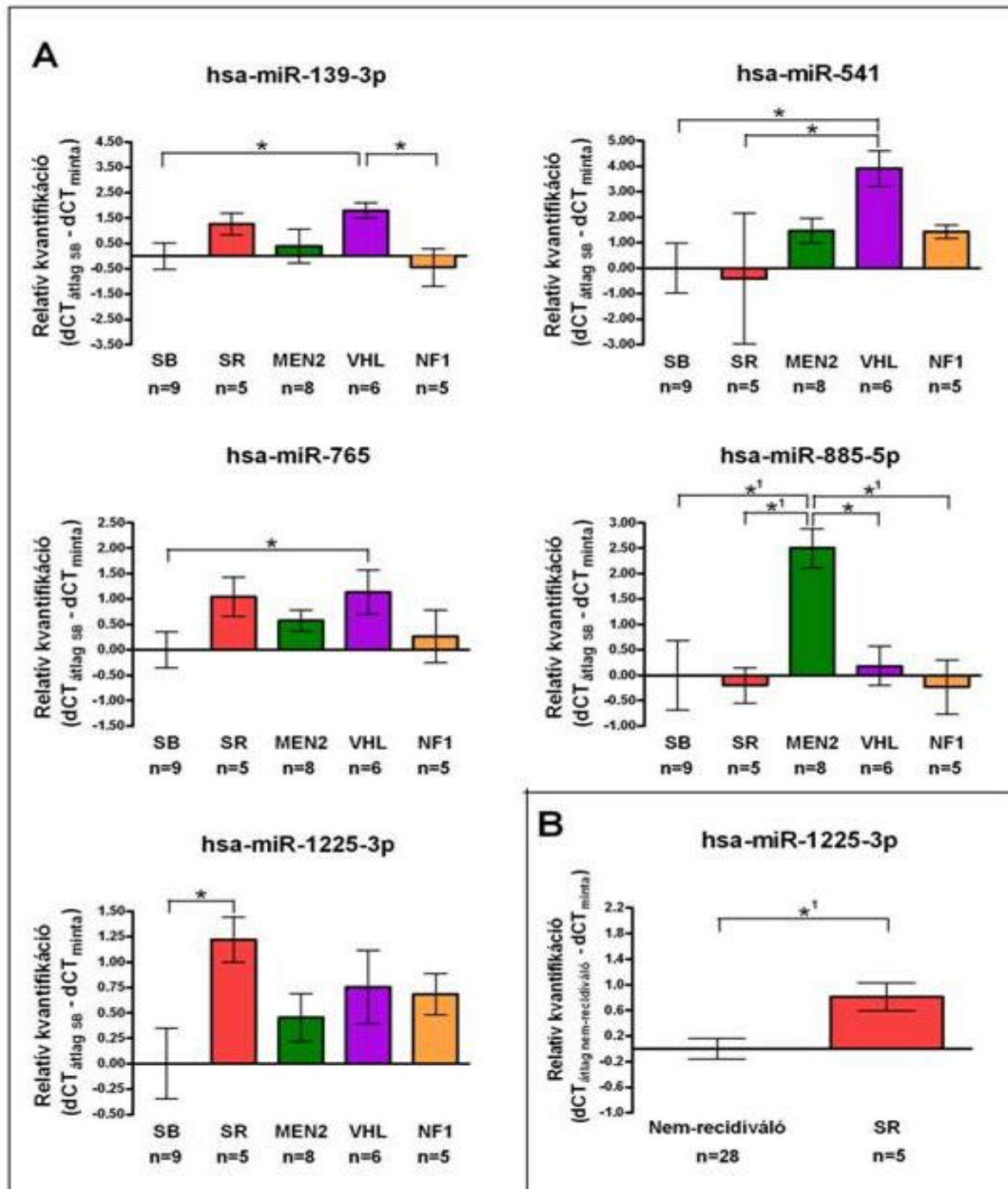
A mikroRNS microarray vizsgálat eredményeit a valós idejű qRT-PCR validálás során alkalmazható referenciaként (housekeeping) alkalmazható mikroRNS-ek azonosítására is felhasználtuk. Erre a célra a minták között legkisebb szórást mutató mikroRNS-eket választottuk ki: a *hsa-miR-324-3p-t* és a *hsa-miR-320b-t*. E mikroRNS-ek referenciagénként történő alkalmazhatóságát már korábban felvetették [246]. Érdekes módon a más mikroRNS expressziós vizsgálatokban (pl. így saját mellékvesekéreg-daganatokon végzett vizsgálatainkban) referencia génként hasznos *RNU48* a phaeochromocytoma minták vizsgálatára alkalmatlannak bizonyult.

A microarray vizsgálatban azonosított mikroRNS-ek közül ötöt választottunk ki valós idejű qRT-PCR validálásra (*hsa-miR-139-3p*, *hsa-miR-541*, *hsa-miR-765*, *hsa-miR-885-5p*, *hsa-miR-1225-3p*) a szignifikancia és az expressziós különbség (fold change) mértéke alapján. A validálás során a csoportok elemszámát növeltük és a vizsgálati csoportokat kiegészítettük NF1 betegekből származó mintákkal (összesen 33 minta: 9 sporadikus benignus, 8 MEN2, 6 VHL, 5 NF1 és 5 sporadikus recidiváló). Mind az öt kiválasztott mikroRNS validálása sikeres volt: **a *hsa-miR-541*, *hsa-miR-139-3p* és *hsa-miR-765* szignifikánsan magasabb mértékben fejeződött ki a VHL daganatokban a sporadikus benignus phaeochromocytomákhoz viszonyítva, míg a *hsa-miR-885-5p* fokozott kifejeződése MEN2-höz társult daganatokra volt jellemző.** A *hsa-miR-139-3p* expressziója szignifikánsan eltért a VHL és NF1 phaeochromocytomák között is. **A *hsa-miR-1225-3p* szignifikánsan nagyobb kifejeződést mutatott a recidiváló daganatokban,** a recidivára nem hajlamos daganatokhoz képest. A *hsa-miR-1225-3p* kimutatása a daganatok recidiva hajlamára utalhat és a betegek szorosabb követését indikálhatja. A sporadikus recidiváló daganatokban a *hsa-miR-541* csökkent mértékben fejeződött ki a VHL-hez társult phaeochromocytomákhoz képest (**16. ábra**).

Tekintettel arra, hogy jelenleg sem a phaeochromocytomák recidivakészségét, sem a rosszindulatúságát jelző biomarker nem ismert, hatásfokmérő karakterisztika (ROC) elemzéssel vizsgáltuk annak lehetőségét, hogy a *hsa-miR-1225-3p* alkalmas biomarker lehet-e a phaeochromocytomák recidivahajlamának jelzésére.

Amennyiben a *hsa-miR-1225-3p* dCT értékének diagnosztikai határértékét 1,16-nál húztuk meg (nem recidiváló phaeochromocytoma a diagnózis, ha a  $dCT_{hsa-miR-1225-3p} \geq 1.16$ ) az adott phaeochromocytoma minta recidiva hajlamát 80%-os fajlagossággal és 61%-os érzékenységgel tudtuk kizárni. Ezek az értékek azonban nem kellően magasak ahhoz, hogy jelen eredményeink alapján a *hsa-miR-1225-3p* gyakorlati diagnosztikába történő bevezetését javasoljuk; ehhez további, nagyobb elemszámú vizsgálatok szükségesek.

E mikroRNS-ek élettani-kórélettani jelentőségéről az utóbbi időben több megfigyelés látott napvilágot. A *hsa-miR-139-3p* fokozott kifejeződését colorectalis carcinomában májajtétek kialakulásával hozták összefüggésbe [247], míg a *hsa-miR-139-3p* szignifikánsan csökkent kifejeződését észlelték mellékvesekéreg-carcinomában [230].



**16. ábra: A pheochromocytomákban szignifikánsan eltérő öt kiválasztott mikroRNS validálása valós idejű qRT-PCR-rel.** Az ábrán a sporadikus benignus (A) valamint a nem-recidiváló (B) pheochromocytomákhoz viszonyított relatív mikroRNS expressziós változásokat (ddCT) mutatjuk be (átlag±SEM). SB: sporadikus benignus; SR: sporadikus recidiváló; MEN2: multiplex endokrin neoplasia 2-es típusához társuló; VHL: von Hippel-Lindau-szindrómához társuló; NF1: 1-es típusú neurofibromatosishoz társuló pheochromocytoma. \*: egyutas ANOVA,  $p < 0.05$  (post hoc teszt: Fisher LSD; <sup>1</sup>: Fisher LSD + Scheffé).

A *hsa-miR-139* (a mikroRNS prekursor 5' száláról szintetizálódó *hsa-miR-139-5p* homológja) csökkent kifejeződését észlelték bronchus- [248], mellékpajzsmirigy- [146] és hepatocelluláris carcinomában is [249]. A *hsa-miR-139* egér hepatocytá sejtekben a *FOXO1* (*forkhead box O1*) transzlációs gátlását eredményezi [250]. A FOXO1 transzkripció faktor több növekedési faktor és hormon jelátvitelének szabályozásában játszik szerepet [250]. A *miR-139-3p* és a *FOXO1* között azonban még nem mutattak ki funkcionális kapcsolatot.

A VHL-hez társuló phaeochromocytomákban a sporadikus daganatokhoz képest fokozott kifejeződést mutató *hsa-miR-541* és a *hsa-miR-765* biológiai jelentőségéről keveset tudunk. Mind a *hsa-miR-541*, mind a *hsa-miR-765* expressziója megváltozik traumás agysérülés következtében [251, 252], ami idegrendszeri jelentőségüket jelzi. Egyes adatok arra utalnak, hogy a *hsa-miR-765* szerepet játszhat a *neurotrophin-3 receptor* (*NTRK3*, *RKC*) rövid izoformája kifejeződésének szabályozásában. A *hsa-miR-765* és az *NTRK3* között HeLa sejteken közvetlen kapcsolatot mutattak ki [253]. A patkány PC12 phaeochromocytoma sejtvonal *neurotrophin-3* (*NTF3*) kezelése a sejtek mérsékelt fokú neurit képzését váltotta ki és neuronális irányba történő differenciálódásukat eredményezte [254]. Nem zárható ki ezek alapján annak lehetősége, hogy a *hsa-miR-765* a *NTRK3* poszttranszkripció gátlása révén szerepet játszhat a phaeochromocytomák patogenezisében. E feltételezés igazolásához mindazonáltal további vizsgálatok szükségesek.

A MEN2-höz társult phaeochromocytomákban a *hsa-miR-885-5p* fokozott kifejeződését észleltük. Hepatocelluláris carcinomában, májcirrhosisban és krónikus hepatitis B fertőzésben szenvedő betegek szérummintáiban a *hsa-miR-885-5p* koncentrációját szignifikánsan emelkedettnek találták. Lehetséges, hogy az intracelluláris *hsa-miR-885-5p* a májsejtek károsodása során jut a szérumba, így alkalmas marker lehet a máj patológiás állapotainak jelzésére [255]. A phaeochromocytomákhoz hasonlóan velőcső eredetű neuroblastomákban a *hsa-miR-885-5p* csökkent kifejeződését találták, ami a mikroRNS-t kódoló 3p25.3 kromoszómarégió elvesztésével társítható. A *hsa-miR-885-5p* transzfekciója neuroblastoma sejtekben a *CDK2* és a *mini-chromosome maintenance protein* (*MCM5*) poszttranszkripció gátlásán keresztül a sejtek szaporodásának csökkenéséhez és a *TP53* útvonal aktiválódásához vezetett [256]. Mindezek alapján a *hsa-miR-885-5p* tumorsuppresszor/protoonkogén funkciója is szövetspecifikusnak tűnik. A neuroblastomákhoz hasonlóan a VHL szindrómához társuló phaeochromocytomákra is jellemző a 3p25.3 kromoszómarégió elvesztése [257], ami a *hsa-miR-885-5p* csökkent

kifejeződését magyarázhatja és ez akár a neuroblastoma és a VHL-pheochromocytoma patogenezisének párhuzamára is utalhat.

A recidiváló pheochromocytomákra jellemző *hsa-miR-1225-3p*-t kódoló gén a 16p13.3 kromoszóma lókuszon helyezkedik el a *hsa-miR-940* kódoló régiójának szomszédságában, amelynek kifejeződését a miRNS microarray vizsgálatok eredménye alapján szintén szignifikánsan magasabbnak találtuk a sporadikus recidiváló tumorokban, azonban utóbbinak a mérését lehetővé tévő Taqman próba nem állt rendelkezésre. A 16p13.3 kromoszómaregió funkciótöbblettel járó eltéréseit korábban leírták malignus pheochromocytomákban [258], ami a recidiva és rosszindulatúság patomechanizmusának párhuzamaira utalhat.

### **5.3.1. A szignifikánsan változó mikroRNS-ek mRNS célpontjainak *in silico* azonosítása**

A valós idejű qRT-PCR-rel validált öt szignifikánsan változó mikroRNS biológiai jelentőségét bioinformatikai megközelítéssel vizsgáltuk. A potenciális cél mRNS-ek azonosításához a TargetScan v5.1 és a MicroCosm Targets Version 5 (korábban miRBase) algoritmusokat használtuk, mivel a mellékvesekéreg-daganatokban kimutatott mikroRNS-ek vizsgálatában harmadikként használt PicTar algoritmus ezeket a mikroRNS-eket nem vizsgálta. A *hsa-miR-1225-3p* cél mRNS-einek meghatározására csak a TargetScan eredményei álltak rendelkezésünkre. A két predikciós algoritmus eredményeit saját fejlesztésű adatbáziskezelő programunk segítségével elemeztük.

A két adatbázis külön vizsgálatával a TargetScan 10511, a MicroCosm pedig 4323 potenciális mRNS célpontot azonosított az öt mikroRNS-hez. A két algoritmus eredményeinek együttes elemzése összesen 13530 különböző mikroRNS-mRNS kölcsönhatást adott, és ezek között 638 mRNS célpontot mutatott ki mindkét algoritmus.

Mivel a paraffinos blokkokból izolált RNS minták teljes genom génexpressziós (mRNS) vizsgálatokat nem végeztünk, a mellékvesekéreg-daganatok esetén alkalmazott szövetspecifikus target predikciós módszerünket itt nem tudtuk alkalmazni.

A bioinformatikai elemzés alapján a MEN2 pheochromocytomákban fokozott kifejeződést mutató *hsa-miR-885-5p* potenciális mRNS célpontjai között megtaláltuk a hypoxia-angiogenesis út vonal több tagját is: laminin alegységet kódoló gének (*LAMB4*,

*LAMA5*, *LAMC2*), kollagén IV (*COL4A5*), prolin-4-hidroxiláz- $\alpha$ -1 prekursor (*P4HA1*), amelyek csökkent kifejeződését már leírták phaeochromocytomákban [72]. Mivel a mikroRNS-ek a cél mRNS-ek kifejeződésének gátlásán keresztül hatnak, felmerülhet, hogy a *hsa-miR-885-5p* e gének poszttranszkripció szabályozásán keresztül szerepet játszhat a phaeochromocytoma sejtek hypoxiára adott válaszában kialakításában, és így a MEN2 és VHL tumorok eltérő patomechanizmusában mikroRNS szintű különbségek is szerepet játszhatnak.

A VHL szindrómához társuló phaeochromocytomákra jellemző, szignifikánsan fokozott kifejeződésű mikroRNS-ek (*hsa-miR-139-3p*, *hsa-miR-541*, *hsa-miR-765*) célpontjainak *in silico* elemzése több olyan potenciális mRNS célpontot jelzett, amelyek a VHL phaeochromocytomákban aktiválódó hypoxia/angiogenezis útvonalhoz kapcsolódnak. Ezek között megtalálható a HIF1 $\alpha$  alegység inhibitor (*HIF1AN*), a *HIF2 $\alpha$*  és a *VEGF* is. Elképzelhető, hogy a *HIF1AN* mikroRNS-ek által közvetített gátlása a VHL-hez társuló phaeochromocytomákban a hypoxia által indukált gének aktiválódásához vezethet, míg a *HIF2 $\alpha$*  és a *VEGF* gének gátlása antagonistá szerepet játszhat. Meg kell azonban jegyezni, hogy e potenciális mikroRNS célpontokat csak *in silico*, bioinformatikai módszerekkel azonosítottuk, ezért biológiai szerepük tényleges igazolásához az mRNS-mikroRNS kapcsolatok kísérletes megerősítése szükséges.

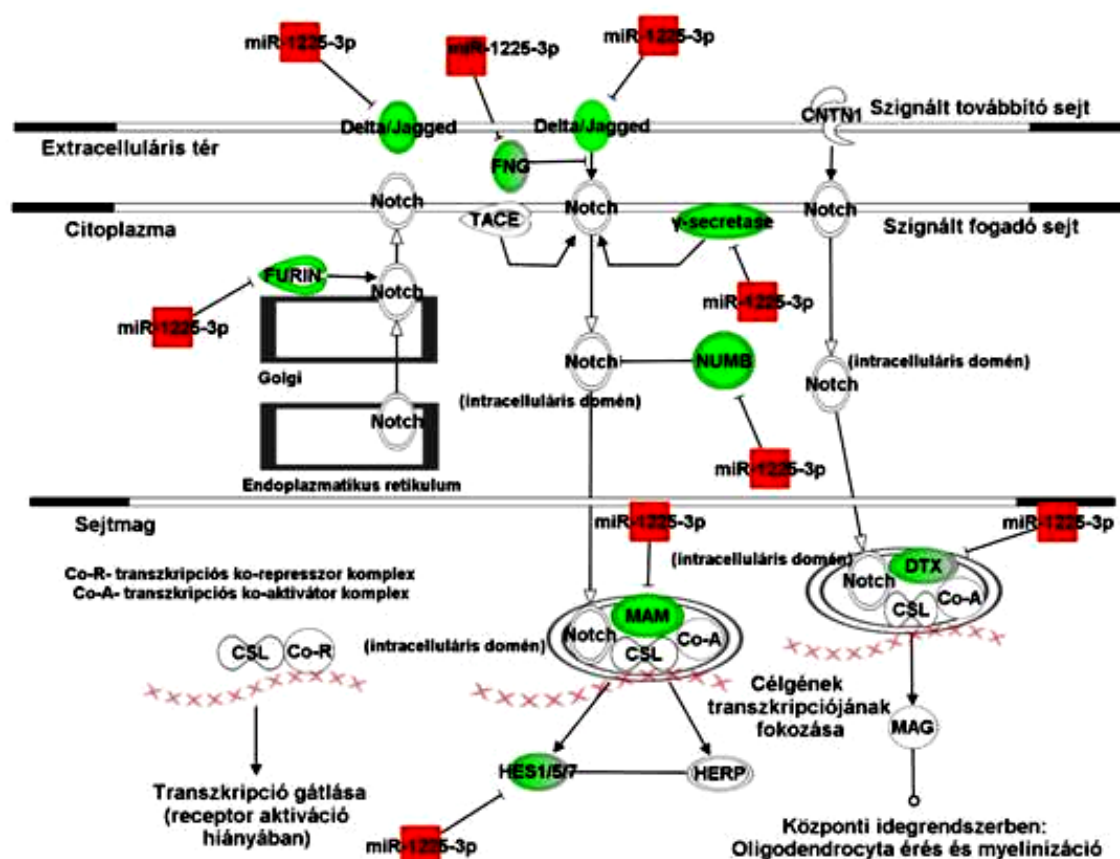
### 5.3.2. Útvonalelemzés az *in silico* azonosított mikroRNS-ek patogenetikai jelentőségének vizsgálatára

Az *in silico* azonosított mikroRNS célpontokat útvonalelemzésnek vetettük alá. A kimutatott útvonalak között a phaeochromocytoma mintákon korábban elvégzett tanulmányok [78] eredményei alapján a sporadikus recidíváló vs. VHL phaeochromocytoma összehasonlításban a "*Wnt- $\beta$ -katenin* szignál", a MEN2 tumorokban pedig a "*Myc*-mediált apoptózis szignál" patogenetikai utakat érdemes kiemelni. A c-myc fehérjével kapcsolatba lévő Max fehérjét (myc associated factor X) kódoló Max gén mutációit nemrégiben írták le, mint az öröklődő phaeochromocytoma ritka okait [55]. A sporadikus recidíváló phaeochromocytomákban a "*Notch* szignál" (**17. ábra**) valamint a "G-fehérjéhez kapcsolt receptor szignál" útvonalak eltéréseit találtuk.

A mikroRNS-ek általi génexpresszió szabályozás megértéséhez nagy jelentőségűek az mRNS-expressziót vizsgáló nagy áteresztőképességű génexpressziós transzkriptomikai

vizsgálatok. Irodalomkutatásunk alapján a recidíváló pheochromocytomák génexpressziós mintázatát eddig nem közölték és mindössze hat olyan tanulmányt találtunk, amelyekben rosszindulatú pheochromocytomák mRNA expressziós mintázatát is vizsgálták. Ezek közül is három tanulmányban csak kevés (2-5) minta került feldolgozásra [72, 259, 260].

A három nagyobb számban rosszindulatú pheochromocytomát vizsgáló tanulmány közül Brouwers és mtsai a jó- és rosszindulatú daganatok között szignifikánsan eltérő gének gén ontológiai (Gene Ontology = GO) elemzése során többek között a „jelátvitel” eltéréseit találták [75]. Suh és mtsai. „géncsoport dúsulás vizsgálattal” (GSEA) a "Notch1-jelátviteli út" és a "Gα-12 útvonal" tagjait mutatták ki [78].



**17. ábra: Az útvonalelemzés eredménye a sporadikus recidíváló pheochromocytomákban.**

A hsa-miR-1225-3p potenciális célpontjai között a Notch-jelátviteli útvonal több résztvevője is megtalálható. Az egyes fehérjék közötti vonalak és nyilak már leírt molekuláris kölcsönhatásokat mutatnak. A piros négyszögek a sporadikus recidíváló és benignus pheochromocytoma minták között szignifikáns expressziós eltérést mutató hsa-miR-1225-3p-t jelölik. Piros: szignifikáns expresszió növekedés; zöld: a hsa-miR-1225-3p potenciálisan gátolt cél mRNA molekulái.

A "Notch-jelátvitel" aktiválódásának biológiai hatása szövetenként eltérő lehet. Egyes szövetekben, a sejtek differenciálódásának gátlása révén a daganatok kialakulását segítheti elő, míg pl. a központi idegrendszerben inkább fokozza a differenciálódási folyamatokat (oligodendrociták érése és myelinizáció fokozódása) [261]. PC12 patkány phaeochromocytoma sejtvonalon a "Notch-jelátviteli út" hiszton-deacetiláz gátló valproátsavval történő serkentése a sejtek szaporodását gátolta és differenciálódásukat segítette elő [262].

**Nem zárható ki ezek alapján, hogy a "Notch-jelátviteli út" hiszton-deacetiláz inhibitorokkal történő serkentése a phaeochromocytomák gyógyszeres kezelésének egyik lehetőségét jelentheti.** Suh és mtsai a "C-myc szignál" fokozott aktivitását is kimutatták a rosszindulatú phaeochromocytomákban [78]. A "C-myc út" poszttranszkripció szabályozásának zavarát saját bioinformatikai elemzésünk is kimutatta a sporadikus recidíváló daganatokban a MEN2-höz társult phaeochromocytomákhoz viszonyítva. Suh és mtsai tanulmányában leírt mRNS transzkriptomikai [78] és saját vizsgálatunk recidíváló daganatokon végzett bioinformatikai mikroRNS cél mRNS elemzésének átfedő eredményei arra utalhatnak, hogy phaeochromocytomákban a recidíva és rosszindulatúság patomechanizmusában hasonló útvonalak játszhatnak szerepet.

Fontosnak tartom azonban ismét hangsúlyozni, hogy e molekuláris útvonalakat munkacsoportunk és a hivatkozott más kutatócsoportok is csak bioinformatikai módszerekkel azonosították. Phaeochromocytoma minták párhuzamos mRNS és mikroRNS expressziós vizsgálata, valamint ezek fehérjeszintű megerősítése szükséges ahhoz, hogy ezen útvonalak biológiai jelentőségét igazolhassuk. Az FFPE mintákból azonban a mikroRNS-ek vizsgálatához képest az mRNS és fehérje szintű vizsgálatok sokkal nehezebbek, így ezekre nem tettünk kísérletet.

Munkacsoportunkkal közel azonos időben publikálták eredményeiket Meyer-Rochow és mtsai., akik microarray segítségével a jó- és rosszindulatú phaeochromocytomák között 18 szignifikánsan változó mikroRNS-t azonosítottak [263]. Eredményeik szerint a *hsa-miR-15a* és a *hsa-miR-16* szignifikánsan csökkent, míg a mellékvesekéreg-carcinomára is jellemző *IGF-2* gén intronikus régiójáról átíródó *hsa-miR-483-5p* szignifikánsan fokozott mértékben fejeződött ki a rosszindulatú daganatokban. Az *IGF-2* mRNS és a *hsa-miR-15a* kifejeződésének együttes vizsgálatát alkalmas biomarkernek találták a phaeochromocytomák rosszindulatú viselkedésének jelzésére, míg a *hsa-miR-483-5p* fokozott szintje csökkent

betegségmentes túléléssel korrelált. A *hsa-miR-15a* és a *hsa-miR-16* csökkent kifejeződését már más daganatokban leírták [151].

Összességében az általunk leírt mikroRNS mintázatok hozzájárulhatnak a különböző sporadikus és öröklődő daganatok osztályozásához, valamint a *hsa-miR-1225-3p* a daganatok recidivakészségének jelzéséhez. Mindazonáltal további, nagyobb elemszámú vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy e markerek gyakorlati alkalmazásra kerüljenek. A bioinformatikai elemzéssel kimutatott útvonalak iránymutatók lehetnek jövőbeli validálás, valamint akár a gyógyszeres kezelés lehetséges célpontjaiként.

#### 5.4. Funkcionális genomikai metaanalízis a szakirodalomban eddig közölt génexpressziós és CGH eredmények, valamint saját eredményeink felhasználásával

A mellékvesekéreg-daganatok genomikai vizsgálata terén elemzésünk elkészültéig összesen 11 különböző mRNS expressziós és 10 CGH vizsgálatot közöltek. A génexpressziós vizsgálatok szignifikáns génlistái között néhány stabil, szinte valamennyi vizsgálatban megfigyelhető közös eltéréstől (pl. az *IGF-2* és topoizomeráz 2A (*TOP2A*) fokozott kifejeződése mellékvesekéreg carcinoma mintákban) eltekintve számottevőek a különbségek, miáltal a vizsgálatok átfogó értelmezése és a daganatok patogenezisében fontos kórfolyamatok azonosítása nehéz. Metaanalízis keretében megkíséreltük a korábbi vizsgálatok eredményeinek újraelmézését és újraosztályozását, valamint a génexpressziós változások összevetését a kromoszómák eltéréseivel.

A génexpressziós és kromoszómális eltérések korrelációjához GSEA-t végeztünk, amelynek során elsősorban az adenoma-carcinoma összehasonlításra összpontosítottunk. Giordano és *mtsai*. [43], illetve de Reyniès és *mtsai*. [44] nyilvánosan elérhető microarray adatainak kromoszómális eltérésekkel történő korrelációjának eredményeként 28-28 olyan kromoszómarégiót találtunk, amelyeken a kódolt gének többsége növekedett expressziót mutatott. Ezek között 17 kromoszómarégió volt közös, és ezek mindegyikét leírták már korábban (**7. táblázat**). E kromoszómarégiók további vizsgálata során 1105 olyan gént azonosítottunk, amelyek fokozott kifejeződése hátterében kromoszómarégió többlet állhat. A metaanalízis során csak olyan kromoszómarégiókat sikerült kimutatnunk, amelyeken az ott kódolt gének többsége fokozott expressziót mutatott, ugyanakkor kromoszómarégió vesztésre utaló expressziós csökkenéseket ezzel a módszerrel nem sikerült azonosítanunk. Ezzel szemben számos szakirodalmi adat ismert a mellékvesekéreg-daganatokban (elsősorban carcinomákban) előforduló kromoszóma vesztésekről is [185-194]. A kromoszómarégió vesztések kimutatásának nehézsége a metaanalízisben használt megközelítésben, amelynek során különböző daganatokon végzett transzkriptomikai és CGH eredményeket használtunk fel, a génexpressziós és kromoszómális eltérések korrelációjának nehézségét jelzi. E probléma orvosolható lehet olyan vizsgálatokkal, amelyekben ugyanazon mintákon végeznek párhuzamos génexpressziós és CGH vizsgálatokat.

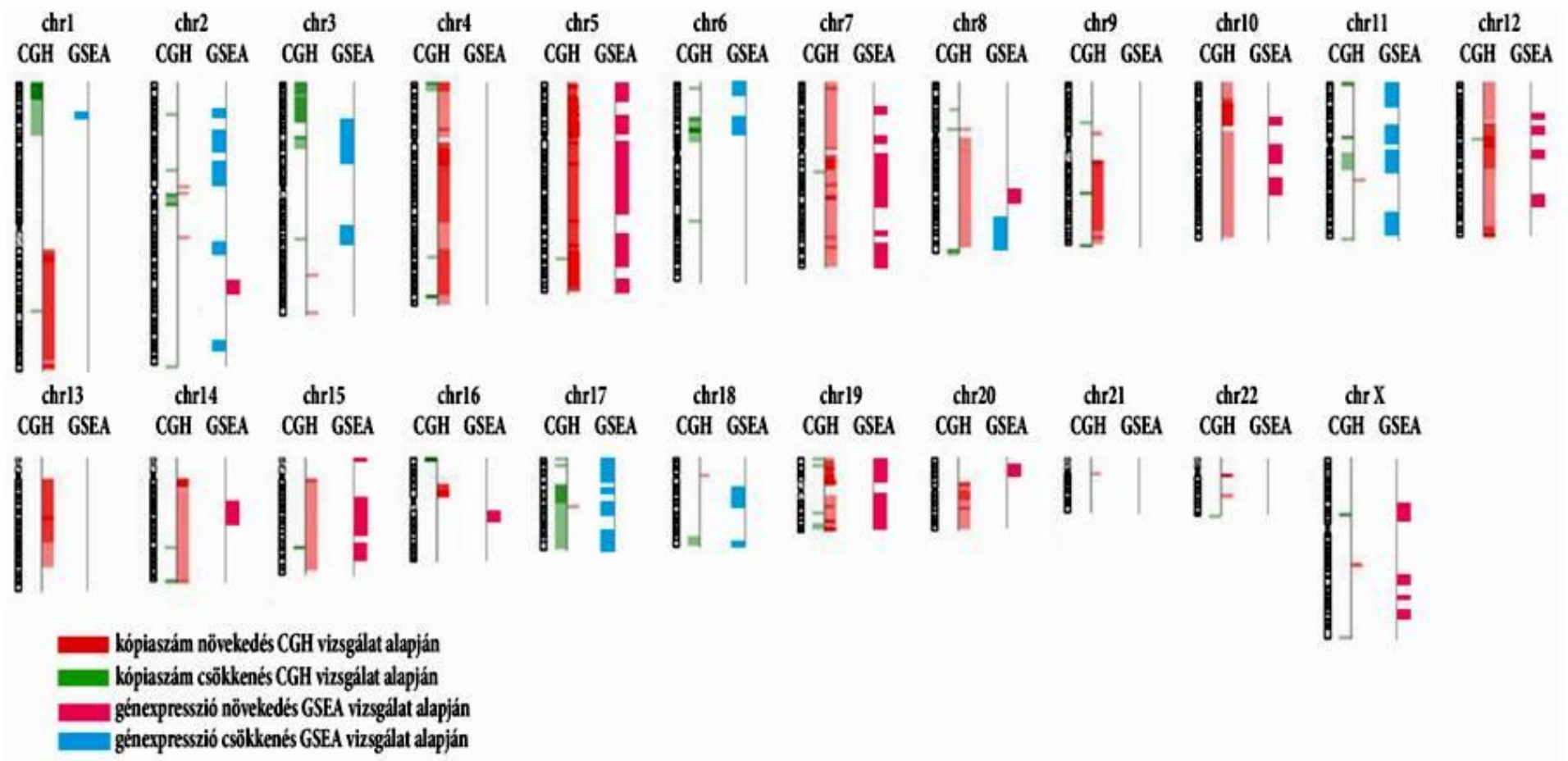
| Kromoszómarégió többlet GSEA alapján                                           | Közlemények, amelyekben az adott kromoszóma aberrációt CGH vagy FISH módszerrel kimutatták                                                                                                                                      |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CHR5P12, CHR5P15,<br>CHR5Q12, CHR5Q13, CHR5Q14<br>CHR5Q31, CHR5Q33,<br>CHR5Q35 | Kjellman és <i>mtsai</i> . [185]; Figueiredo és <i>mtsai</i> . [186]; Zhao és <i>mtsai</i> . [188]; Dohna és <i>mtsai</i> . [189]; Sidhu és <i>mtsai</i> . [190]; Zhao és <i>mtsai</i> . [191]; Stephan és <i>mtsai</i> . [194] |
| CHR7P21, CHR7P22,<br>CHR7Q22                                                   | Dohna és <i>mtsai</i> . [189]; Sidhu és <i>mtsai</i> . [190]; Zhao és <i>mtsai</i> . [191]; Stephan és <i>mtsai</i> . [194]                                                                                                     |
| CHR12Q12, CHR12Q13,<br>CHR12Q15, CHR12Q23, CHR12Q24                            | Kjellman és <i>mtsai</i> . [185]; Figueiredo és <i>mtsai</i> . [186]; Zhao és <i>mtsai</i> . [188]; Dohna és <i>mtsai</i> . [189]; Sidhu és <i>mtsai</i> . [190]; Zhao és <i>mtsai</i> . [191]; Stephan és <i>mtsai</i> . [194] |
| CHR19Q12                                                                       | Dohna és <i>mtsai</i> . [189]; Sidhu és <i>mtsai</i> . [190]                                                                                                                                                                    |

**7. táblázat: Két szabadon elérhető microarray [de Reynies et al., 2009, Giordano et al., 2009] vizsgálat génexpressziós (mellékvesekéreg-adenoma-carcinoma GSEA) eredményeinek és a mellékvesekéreg-carcinomákban végzett citogenetikai vizsgálatok korrelációja. FISH: fluoreszcens in situ hibridizáció**

Ennek keretében egy saját vizsgálatot végeztünk 11 mellékvesekéreg-daganat mintán párhuzamos mRNS microarray és CGH megközelítéssel a kromoszómaeltérésekkel párba állítható génexpressziós változások közvetlen azonosítása céljából.

#### **5.4.1. Párhuzamos mRNS expressziós microarray és komparatív genom hibridizáció (CGH) ugyanazon mellékvesekéreg-daganat mintákon**

Az mRNS microarray vizsgálatok GSEA elemzésével és a párhuzamos CGH mérések összevetésével a carcinomákban talált kromoszómaaberrációk génexpressziós hatásait közvetlenül tudtuk vizsgálni. A CGH vizsgálat során 101 olyan kromoszómarégiót találtunk, amelyek kópiaszám változása a vizsgált minták 75%-ában kimutatható volt. Az ugyanezen minták génexpressziós adatain végzett GSEA ezek közül 46 kromoszómarégió jelezte az egyirányú expressziós változást mutató gének dúsulását (**18. ábra**). A GSEA érzékenysége kromoszómaeltérések kimutatására 45,54 %-nak, míg fajlagossága 84,86%-nak bizonyult. Mindezek szerint a GSEA a mintákban fellelhető kromoszómális változások kevesebb, mint felének kimutatására alkalmas, ugyanakkor a GSEA alapján szignifikánsnak vélt kromoszóma eltérések jelentős része ténylegesen kimutatható az adott mintákban. Összességében a rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokban megfigyelhető szignifikáns génexpressziós változások 15%-ának háttérében mutathatók ki citogenetikai eltérések.



**18. ábra:** Az ugyanazon mellékvesekéreg-daganat mintákon párhuzamosan végzett mRNS microarray és CGH vizsgálatok korrelációja. A kromoszómák mellett az azonos mintákból kapott CGH és a GSEA eredményeket ábrázoltuk.

#### 5.4.2. Útvonalelemzés a mellékvesekéreg-carcinoma patogenezisében alapvető molekuláris útvonalak azonosítása céljából

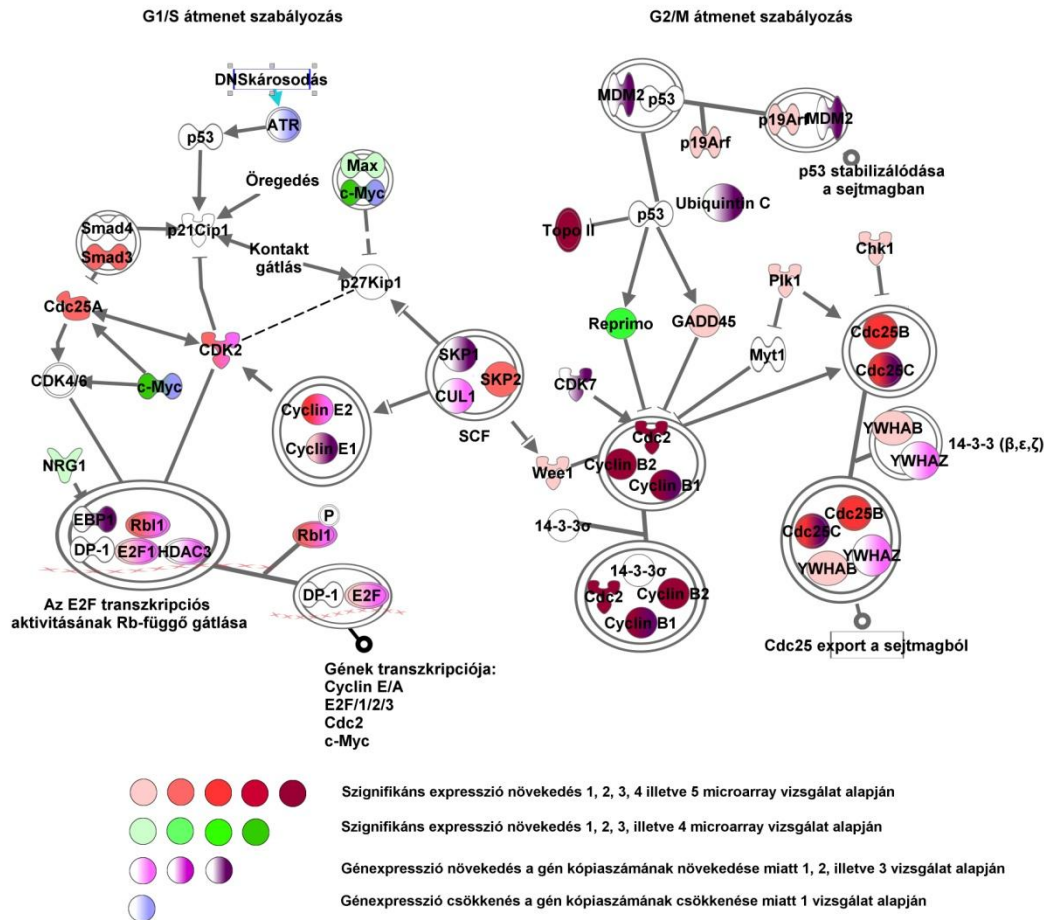
A metaanalízis keretében vizsgált microarray vizsgálatok szignifikáns expressziós változást mutató génlistáinak IPA útvonalelemzése során a normális mellékvese és mellékvesekéreg-carcinoma, valamint az adenoma-carcinoma összehasonlításban a sejtciklus G1/S, G2/M átmenetében, a retinsav jelátvitelben, a komplement rendszerben és az antigénprezentációban szereplő útvonalakkal találtunk szignifikáns átfedést. Az mRNS microarray és CGH vizsgálatok közvetett és közvetlen korrelációjával kapott génlisták a sejtciklus G1/S és G2/M átmenetében szerepet játszó génekkel mutattak szignifikáns átfedést.

***Az alábbiakban e három molekuláris útvonal főbb jellegzetességeit ismertetem.***

##### 5.4.2.1. A sejtciklus G1/S és G2/M átmenetének eltérései mellékvesekéreg-carcinomában

A G1 ciklinek (Ciklin E, *CCNE*) és a G1 sejtosztódást szabályozó („cell division”) protein kinázok (*CDK2*, *CDK4*) mRNS-einek fokozottabb kifejeződését mellékvesekéreg-carcinomában korábbi tanulmányokban már kimutatták [235]. Metaanalízisünkben a *CCNE1* és *CCNE2* fokozott kifejeződését saját microarray vizsgálatunk mellett három másik tanulmányban észleltük [36, 43, 44]. A génexpressziós és kromoszómaeltérések korrelációja alapján a *CCNE1*-t kódoló chr19q12, valamint a *CDK2*-t kódoló chr12q13 kromoszómarégió az ott kódolt gének többsége fokozott expressziót mutatott [36, 43, 44]. A 19q12 és a 12q13 régió többletét már több citogenetikai vizsgálatban igazolták (**7. táblázat**).

A G1/S átmenet mellett több, a G2/M átmenet szabályozásában szereplő gén fokozott kifejeződését és az ezeket kódoló kromoszómarégió többletét mutattuk ki, így a ciklin B1-et (*CCNB1*) és a cell division protein kináz 7-et (*CDK7*) a chr5q13, az ubiquitin C-t (*UBC*) a chr12q24 és az Mdm2 p53 binding proteint (*MDM2*) a chr12q15 kromoszómarégiókon [36, 39, 43, 44].



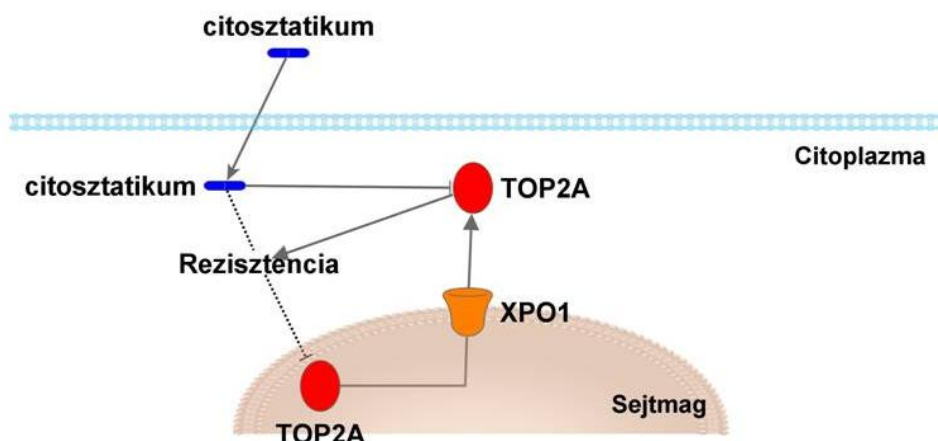
**19. ábra:** A sejtciklus G1/S és G2/M átmenetében szereplő gének expressziós eltérései a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok microarray eredményeinek összehasonlító metaanalízise alapján.

A **19. ábra** a sejtciklus G1/S és G2/M átmenetében szerepet játszó gének expressziós eltéréseit mutatja be.

A G2/M átmenet több génjének fokozott kifejeződését kimutatható kromoszómális eltérés nélkül észleltük, ezek közé tartozik a *CCNB2*, a sejtciklust szabályozó (cell division cycle 2, *CDC2*), a *CDC25B* és a topoizomeráz 2 alfa (*TOP2A*) [36, 39, 43, 44]. A korábban bemutatott mikroRNS expressziós eredményeink szövetspecifikus target predikciója és útvonalelemzése is a sejtciklus G2/M átmenet károsodását jelezte, mint a legfontosabb patogenetikai utat (**5.2.3. fejezet**). Mindezek alapján a sejtciklusban szereplő gének mellékvesekéreg-carcinómában észlelt megváltozott kifejeződése hátterében, mind mikroRNS, mind mRNS szintű eltérések is szerepet játszanak.

Fontos kiemelni a **TOP2A**-t, mivel azt több korábbi vizsgálatban a rosszindulatúság jelzésére alkalmas diagnosztikus markernek találták, és fokozott kifejeződését mind qRT-PCR, mind immunhisztokémiái módszerekkel bizonyították [36]. (A **TOP2A** fokozott kifejeződését qRT-PCR-rel saját vizsgálatunkban is megerősítettük.) A **TOP2A** fehérje több, a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében alkalmazott kemoterápiás szer (etopozid, doxorubicin) célmolekulája [42]. A kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia a **TOP2A** támadáspontú citosztatikumokkal kapcsolatban is előfordul, és ebben három fő mechanizmust azonosítottak *in vitro* kísérletek során: 1. a **TOP2A** expresszió csökkenése, 2. a gyógyszerkötőhelyek mutációja és 3. a fehérje aberráns citoplazmatikus transzlokációja [264]. A topoizomeráz citoplazmatikus transzportjában fontos szerepet játszik az exportin (**XPO1**) fehérje.

Metanalízisünk eredménye szerint mellékvesekéreg-carcinomákban az **XPO1** gén fokozott kifejeződést mutat a jóindulatú daganatokhoz képest. Ovarium carcinomában is leírták az **XPO1** fokozott kifejeződését és ezt a **TOP2A** nagyfokú citoplazmatikus megjelenésével hozták kapcsolatba, sőt a betegek teljes túlélésével is összefüggésben állt. Feltételezik, hogy az **XPO1** expresszió fokozódása a **TOP2A** citoplazmatikus transzlokációja révén hozzájárulhat a citosztatikumokkal szembeni rezisztencia kialakulásához [264]. Feltételezésünk szerint hasonló mechanizmus a mellékvesekéreg-carcinomában is működhet, és ez közrejátszhat a mellékvesekéreg-carcinoma citosztatikumokkal szembeni rezisztenciájában. Mindazonáltal e feltételezésünket alátámasztó kísérletes adatok még nem állnak rendelkezésre. A **20. ábrán** a szóbjövő patomechanizmus sematikus modelljét mutatjuk be.



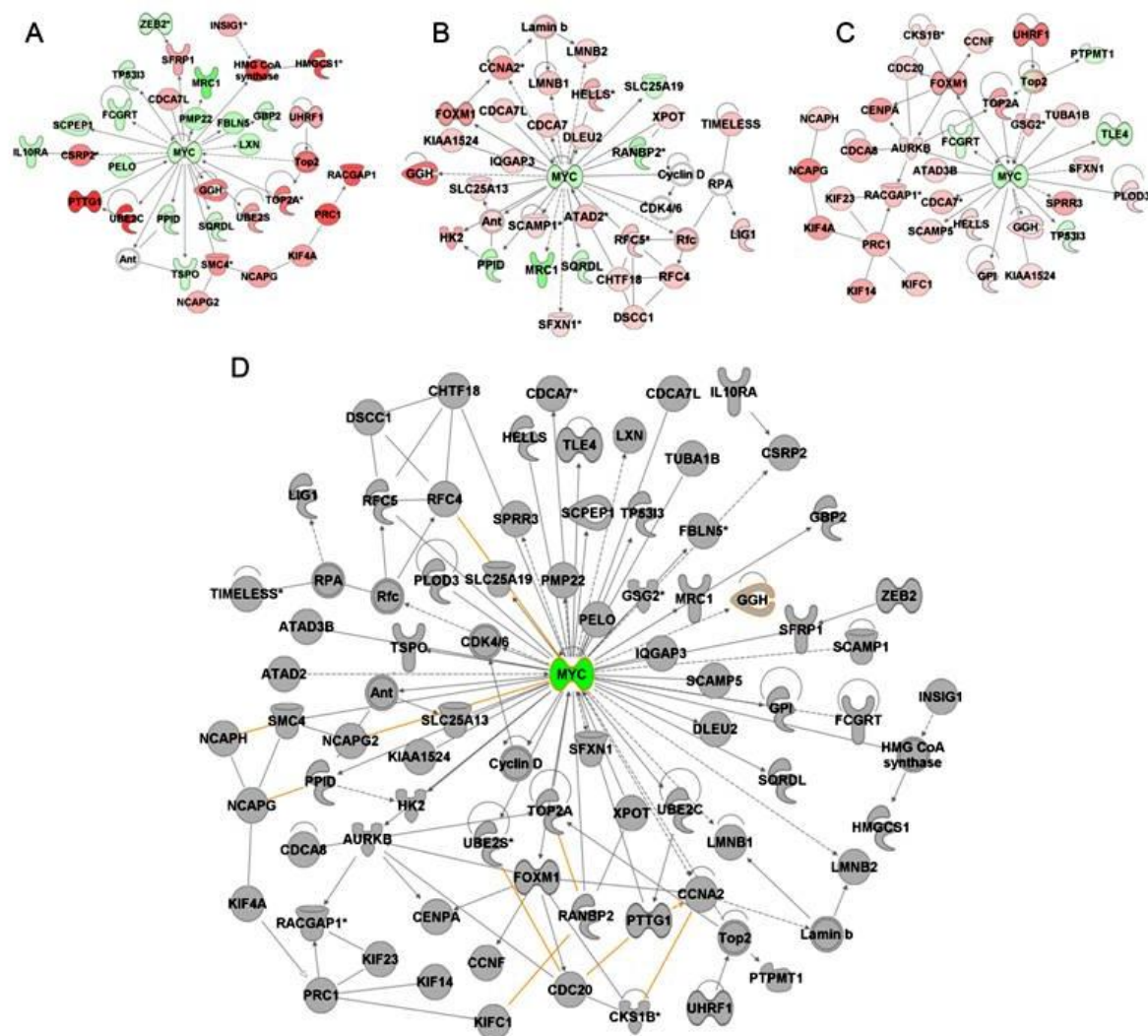
**20. ábra:** A citosztatikum rezisztencia lehetséges modellje mellékvesekéreg-carcinómában a génexpressziós vizsgálatok metaanalízise során észlelt párhuzamos TOP2A és az XPO1 expresszió fokozódás alapján. A daganatsejtek citoplazmájában felhalmozódó TOP2A a citosztatikumok megkötésével a sejtmagi TOP2A fehérjét megvédheti a citosztatikumok hatásától.

#### 5.4.2.2. A c-myc központi szerepe a mellékvesekéreg-carcinoma patogenezisében. Hipotézis.

A sejtciklus útvonalainak vizsgálata során a **c-myc protoonkogén csökkent kifejeződését** észleltük szinte valamennyi vizsgálatban, és ezt a 8q24 kromoszómarégió elvesztésével tudtuk kapcsolatba hozni.

A microarray adatok hálózatelemzésével skálafüggetlen hálózatokat nyertünk. A **c-myc a skálafüggetlen hálózatok legfőbb csomópontjának bizonyult**, ami arra utalhat, hogy a c-myc csökkent kifejeződése a rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok alapvető patogenetikai eseménye lehet. A c-myc protoonkogén a sejtosztódás, differenciáció és apoptózis folyamatainak alapvető tényezője [265], és fokozott expresszióját számos daganatban (Burkitt lymphoma, prosztata- és emlőrák, melanoma malignum stb.) kimutatták [266].

A skálafüggetlen hálózatok nagy foksámú csomópontjai számos más csomóval vannak kapcsolatban a hálózatban, és ezáltal minél nagyobb egy csomó foksáma, annál fontosabb szerepet tölthet be a hálózat működésében. A nagy foksámú csomópontok elvesztése az egész hálózat összeomlását vonhatja maga után [159, 267]. Hálózattopológiai elemzésünk alapján a c-myc csökkent kifejeződése a mellékvesekéreg-carcinoma génexpressziós hálózatának és talán patogenezisének központi eleme lehet (**21. ábra**).



**21. ábra:** Az IPA-val végzett hálózat elemzés eredményei három microarray vizsgálat eredményei alapján: A: Giordano és mtsai, 2009 [43], B: de Reyniès és mtsai, 2009 [44], C: saját vizsgálatunk, D: e három vizsgálat egyesített hálózata, amelyben a csökkent kifejeződésű *c-myc* (zöld) a legnagyobb fokszerű csomópont.

Hipotézisünket korábbi kísérletes eredmények is alátámasztják. Hormontermelő mellékvesekéreg-carcinoma szövetekben a *c-myc* mRNS csökkent kifejeződését találták ép mellékvesével, kortizol- és aldosterontermelő, valamint hormonálisan inaktív mellékvesekéreg-adenomákkal összehasonlítva. A *c-myc* kifejeződésének mértéke csak az ép mellékvesekéregben észlelt érték 10 %-át érte el a rosszindulatú daganatokban [268].

Magzati patkány és felnőtt humán mellékvesekéreg sejtenyészeteken végzett *in vitro* vizsgálatok a *c-myc* funkcionális jelentőségét jelzik [269, 270]. Mind patkány, mind humán sejtenyészeteken az adrenokortikotropin (ACTH) kezelés a *c-myc* mRNS fokozott

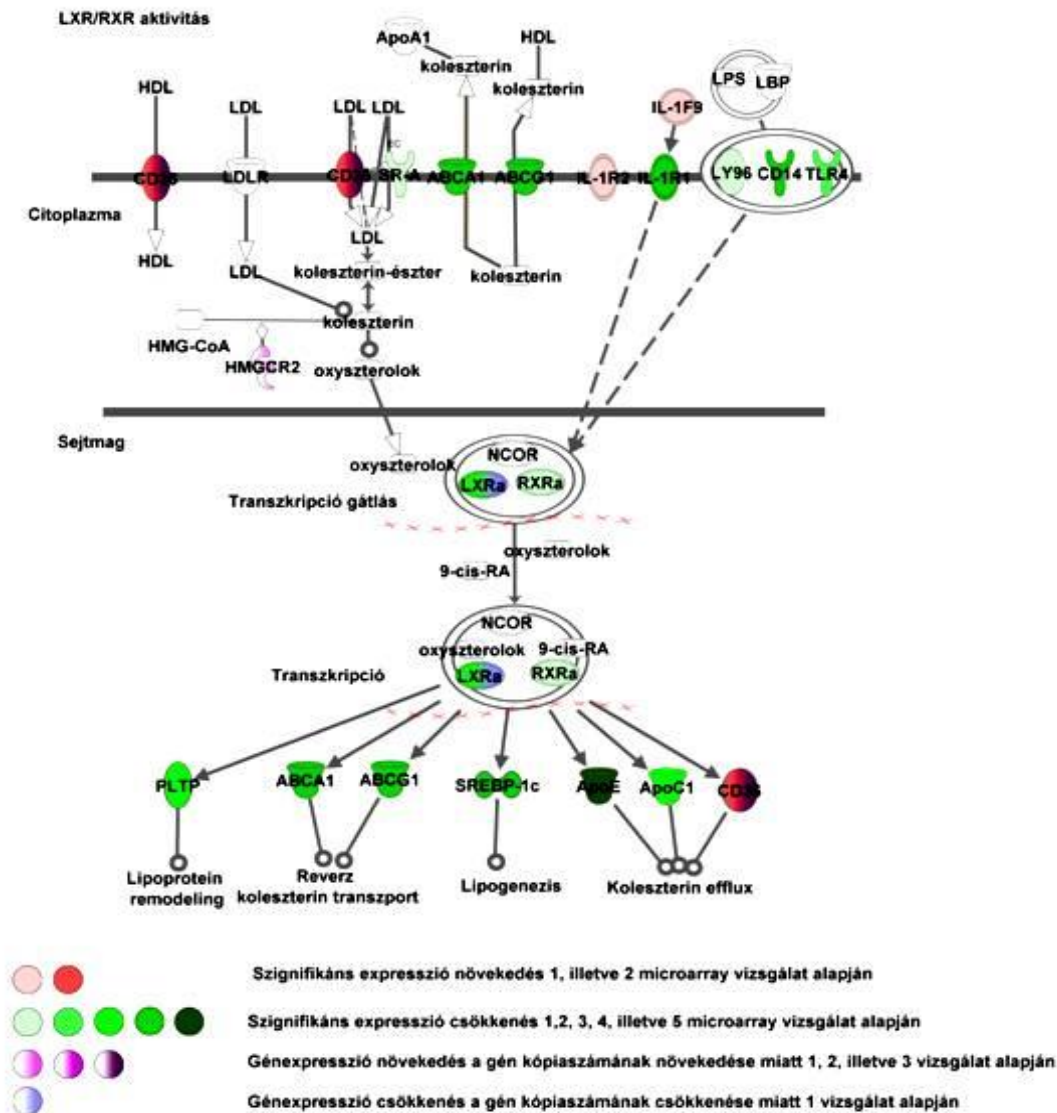
kifejeződésére vezetett. Az ACTH a magzati patkány mellékvesekéreg tenyészeteken gátolta a sejtek szaporodását, és e hatását megelőzte a *c-myc* fokozott kifejeződése. A magzati és felnőtt mellékvesekéreg génexpressziós mintázatában számos hasonlóság mutatható ki [32]. Felmerülhet annak lehetősége, hogy amennyiben a sejt szaporodás gátlásához a *c-myc* növekedett kifejeződése társul, a *c-myc* csökkent expressziója a mellékvesekéreg sejtek fokozott szaporodásával társulhat.

A *c-myc* fokozott kifejeződése számos sejt típusban serkenti a sejt osztódást és a rosszindulatú átalakulást [265], de számos rendszerben apoptózist is előidézhet és tumorszuppresszor mechanizmusokat is aktiválhat [271]. Keratinocytákban a *c-myc* fokozott kifejeződése érésüket serkenti [272], és a vékonybél kriptáinak progenitor sejtjei *c-myc* hiányában is növekednek [273]. Here teratomákban a *c-myc* fehérje csökkent kifejeződését írták le [274]. E példák azt jelzik, hogy egyes szövetekben a *c-myc* nem szükséges a sejtek osztódásához, sőt csökkent kifejeződése is előfordul osztódó szövetekben.

A daganatok többségére jellemző fokozott *c-myc* kifejeződésre tekintettel, **a mellékvesekéreg-carcinómában észlelt csökkent *c-myc* expresszió figyelemre méltó jelenség. Lehetségesnek tűnik, hogy a mellékvesekéreg egy különleges sejt környezetet képvisel, ahol a *c-myc* csökkent kifejeződése a daganat növekedésének központi elemét jelenti.** Nem tudjuk ugyanakkor eldönteni, hogy a *c-myc* csökkent expressziója a mellékvesekéreg-daganatok oka vagy következménye. A hálózattopológiai vizsgálat inkább kóroki szerepét támogatja, de ennek igazolásához további kísérletes vizsgálatok (pl. *in vitro* transzfekciós modellek, *in vivo* kondicionális knockout) lennének szükségesek.

#### 5.4.2.3. A retinsav jelátviteli út vonal

Az útvonalelemzés a második legjellemzőbb patogenetikai útvonalként a retinsav jelátviteli útvonalat adta ki **(22. ábra)**. Az A-vitamin származék retinsav patogenetikai szerepére több daganatban vannak adatok és egyes daganatok esetében kemoprevenció ill. kemoterápia céljaira is használják [275].



**22. ábra: A retinsav jelátviteli útvonal tagjainak expressziós változásai a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok microarray eredményeinek metaanalízise alapján.**

Korábbi vizsgálatokban már leírták, hogy mellékvesekéreg-carcinoma sejtvonal (NCI-H295R) *in vitro* 9-cisz-retinsav kezelése a sejtek proliferációját gátolta és differenciálódásukat segítette elő [276], azonban ennek pontos hatásmechanizmusa nem ismert. **Metaanalízisünk alapján elsőként írtuk le mellékvesekéreg-carcinómában a retinsav bioszintézisben szereplő enzimek és a retinoid receptorok csökkent kifejeződését.**

A retinsavat mind a magzati, mind a felnőtt mellékvesében kimutatták, sőt az emlősök embrionális fejlődése során az elsődleges retinsav-termelő máj érését megelőzően a szérumban fő retinsav forrása a mellékvese. A felnőtt mellékvese retinsav koncentrációja a

májban mérhetőnek körülbelül fele, ami a biokémiai vizsgálatok alapján messze elegendő az intraadrenális retinsav receptorok (Retinsav receptor – RAR, retinoid X receptor – RXR) aktiválásához [277]. A RAR az all-transz retinsavat (ATRA) és a 9-cisz-retinsavat, míg az RXR csak a 9-cisz retinsavat képes kötni [278].

Az RXR két altípusa ismert: RXR-alfa (RXRA) és RXR-béta (RXRB). A 9-cisz retinsavat kötő RXR más sejtmagi receptorokkal (liver X receptor (LXR), peroxiszóma proliferátor-aktivált receptor (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR), pregnán X receptor (PXR), konstitutíven aktivált receptor (constitutively activated receptor, CAR) stb.) heterodimereket képez és ezek transzkripciós faktorként számos gén kifejeződését szabályozzák [278]. Metanalízisünkben a retinsav bioszintézisében alapvető aldehid dehidrogenáz 1A típusú enzimek közül az *ALDH1A1* és *ALDH1A3* csökkent kifejeződését észleltük carcinoma szövetekben.

A retinsav receptorai közül az *RXRA* kifejeződése a carcinomákban az adenomákhoz képest csökkent mértékű volt, valamint saját vizsgálatunkban az *RXRB* kifejeződése is és az utóbbit a chr6p21 kromoszómarégió elvesztésével tudtuk kapcsolatba hozni. Az RXR heterodimer receptorai közül több microarray vizsgálat elemzése során az *LXR* csökkent kifejeződését is észleltük, és ez a már több citogenetikai vizsgálatban leírt chr11p11 kromoszómarégió elvesztésével hozható kapcsolatba [185, 190, 194].

Eredményeink alapján a **mellékvesekéreg-carcinómát csökkent retinoid képződés és hatás jellemezheti**. A retinsav jelátvitel csökkenése számos általa szabályozott gén expressziós változásait vonhatja maga után, és ezek számos más folyamat szabályozásában játszanak szerepet. Az alábbiakban e főbb szabályozási utakat tárgyaljuk.

#### **5.4.2.3.1. Koleszterin és lipid anyagcsere: az RXR/LXR és az RXR/PPARG jelátviteli utak**

A mellékvesekéreg hormontermelésében a koleszterin és lipid anyagcsere alapvető jelentőségű tényező.

A mellékvesekéreg sejtjeiben a koleszterin transzportban, bioszintézisben és tárolásban szerepet játszó gének kifejeződését az LXR és PPARG receptorok szabályozzák [279-281]. Az LXR ligandjaiként az oxiszterolokat azonosították. Az LXR-nek két altípusa, az LXR-alfa (*LXRA*) és az LXR-béta (*LXRB*) ismert, és mindkét altípust kimutatták az emberi

mellékvesekéregben [282]. A PPAR $\gamma$  jelen van mind a normális mellékvesekéregben, mind a mellékvesekéreg jó-, és rosszindulatú daganataiban, mind az NCI-H295 mellékvesekéreg-carcinoma sejtvonalban [276]. A PPAR $\gamma$  agonista thiazolidinedionok önmagukban, illetve 9-cisz-retinsavval együtt adva gátolták az NCI-H295 sejtvonal szaporodását és invazivitását, ugyanakkor serkentették a daganatsejtek differenciálódását [276, 283].

Az LXRA és PPAR $\gamma$  számos mellékvesekéregben kifejeződő gén expresszióját szabályozza. Ezek között a koleszterin és lipid transzportban (ATP-binding cassette A1 és G1 (*ABCA1*, *ABCG1*), scavenger receptor-B1 (*SR-B1*), scavenger receptor CD36 (thrombospondin receptor, *CD36*), foszfolipid transzfer protein (*PLTP*)), tárolásban (apolipoprotein E és C1 (*APOE*, *APOC1*)) és szintézisben (sterol regulatory element binding protein 1c (*SREBP-1c*)) szerepet játszó gének is megtalálhatók [279-281]. E gének többsége szignifikánsan csökkent kifejeződést mutatott.

**A koleszterin/lipid bioszintézis és tárolás többszintű eltérései** szerepet játszhatnak a mellékvesekéreg-daganatok eltérő lipidtartalmában és **magyarázhatják** azt a klinikopatológiai megfigyelést, ami szerint **a rosszindulatú daganatok a jóindulatú adenomákhoz képest lipidszegénynek tűnnek.**

#### 5.4.2.3.2. Lipopoliszacharid receptor (Toll-like receptor 4 (TLR4)) útvonal

Az útvonalelemzés eredményei alapján a retinsav jelátvitellel összefüggő utak közül szükségesnek tartom kiemelni a lipopoliszacharid receptor útvonalat. Ez az útvonal is az immun-neuroendokrin kölcsönhatások jelentőségét jelzi a mellékvesekéreg-daganatok patogenezésében.

Az interleukin-1 receptorcsaládba tartozó Toll-like receptorok (TLR) alapvető szerepet játszanak a természetes immunitás folyamatainak szabályozásában. A TLR-ek közé tartozik a lipopoliszacharid (LPS) receptora a TLR4 [106], amely a mellékvesekéreg sejtein is kimutatható [284]. A TLR4 és a retinsav jelátvitel kapcsolatát májszövetben igazolták, mivel ott az LPS okozta TLR4 aktiváció az RXRA transzkripciót fokozó hatását csökkentette [285]. Az LPS megkötéséhez a TLR4 mellett további fehérjék, így a CD14 és a limfocita antigén 96 (LY96) is szükségesek [106]. Mellékvesekéreg sejtvonal *in vitro* LPS kezelése IL-6, IL-8 és kortizol elválasztását váltja ki [286]. A TLR4 génkiütött (knockout) egerekben vad típusú fajtársaikhoz képest növekedett plazma kortizol szintet, nagyobb mellékveséket és a

mellékvesekéreg morfológiai eltéréseit, csökkent lipid raktárakat írtak le [284]. Mindezen megfigyelések a TLR4 szerepét támasztják alá a mellékvesekéreg működésének szabályozásában.

Több microarray vizsgálat elemzése során észleltük a *TLR4* csökkent expresszióját [43, 44] és a *TLR4* expresszió csökkenését saját mintáinkon valós idejű qRT-PCR-rel is sikerült validálnunk. A TLR4 LPS jelátvitelben szerepet játszó további fehérjék génjei közül a CD14 és az LY96 mRNS-ének szignifikáns csökkenését is észleltük.

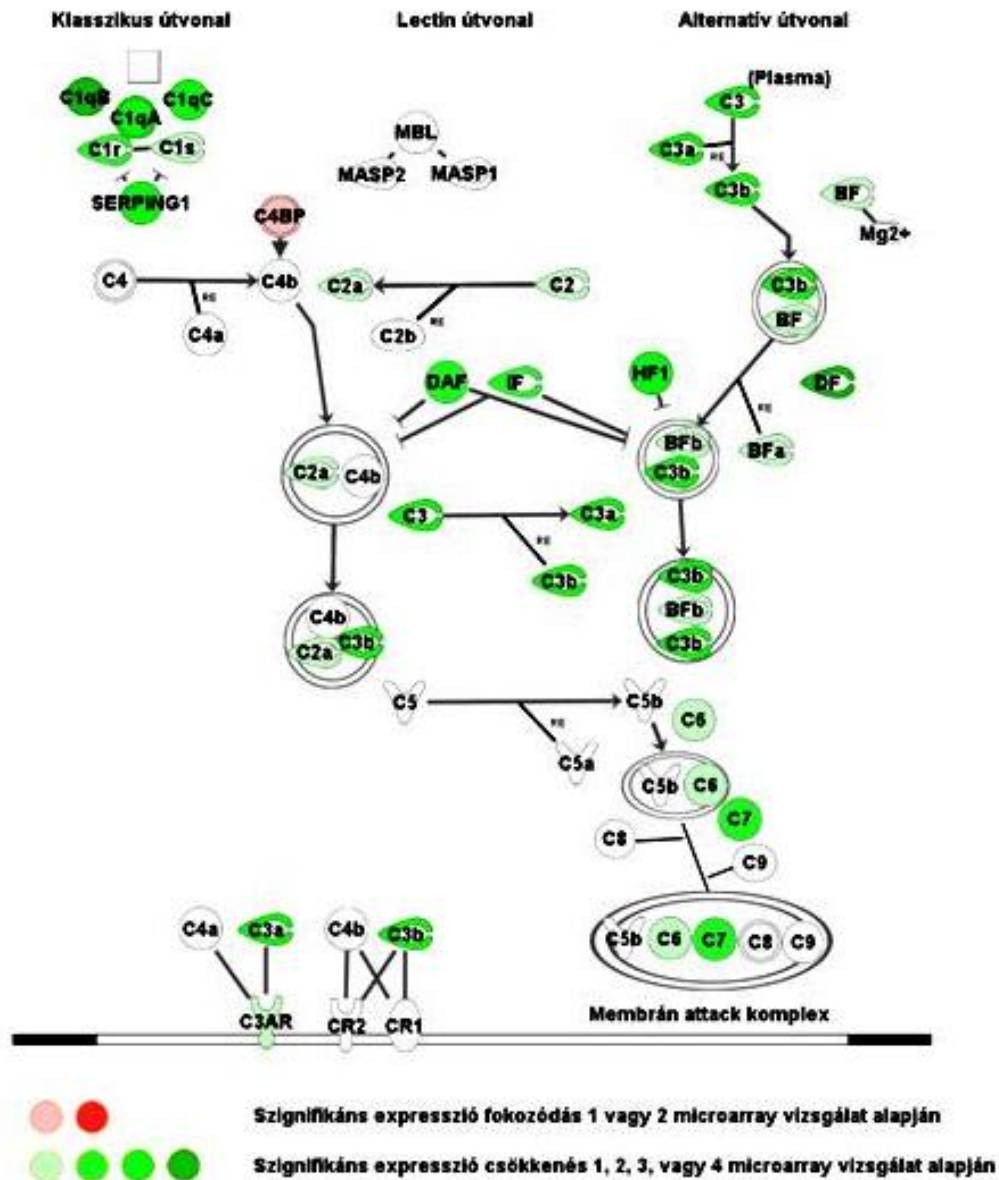
A Toll-like receptorokkal egy receptorcsaládba tartozó IL-1 receptorok expressziós eltéréseit is megfigyeltük mellékvesekéreg-carcinoma szövetekben. A biológiailag aktív *IL1R1* kifejeződésének szignifikáns csökkenését több microarray vizsgálatban, míg a biológiailag inaktív *IL1R2* szignifikánsan fokozott kifejeződését egy microarray elemzése során észleltük. A csökkent *IL1R1* és a fokozott *IL1R2* expresszió összességében az IL-1 jelátvitel csökkenését jelezheti a mellékvesekéreg-carcinomákban.

**Az LPS receptor komplex és az IL-1 jelátvitel eltérései az immunológiai mechanizmusok jelentőségére utalnak mellékvesekéreg-carcinomában.** A mellékvesekéregben több citokin termelődik, így többek között az IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , LIF és IL-18 termelődésére vannak adatok. A citokinek legnagyobb mennyiségben a zona reticularisban termelődnek, de a mellékvesekéreg sejtjei mellett a mellékvesekérget infiltráló makrofágok, limfociták és a mellékvesevelő kromaffin sejtjei képezik a citokinek fő forrását. A citokinek befolyásolhatják a szteroidhormonok elválasztását, és egyes adatok szerint a mellékvesekéreg-daganatok képződésében is szerepet játszhatnak [287]. Microarray vizsgálatokban több citokinreceptor megváltozott kifejeződését is kimutatták mellékvesekéreg-carcinomában [45, 51].

#### 5.4.2.4. A komplementrendszer és az antigénprezentáció eltérései

A harmadik fő patogenetikai útvonalként a komplementrendszer és antigénprezentáció eltéréseit azonosítottuk, ami ismét az immun-neuroendokrin interakciók mellékvese-daganatok patogenezisében játszott szerepét támasztja alá. Több antigénprezentációban és komplementrendszerben fontos gén megváltozott expresszióját észleltük, azonban ezek patogenetikai jelentősége kísérletes eredmények hiányában egyelőre nehezen értelmezhető.

A komplementrendszer fehérjéit kódoló gének többségének szignifikánsan csökkent kifejeződését észleltük a mellékvesekéreg-carcinoma szövetekben (23. ábra).



**23. ábra:** A komplementrendszer tagjainak expressziós eltérései a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok microarray vizsgálatainak metaanalízise alapján.

Ezek közé tartozik a komplement komponens 1 q szubkomponens, A lánc (C1QA), a komplement komponens 1 q szubkomponens, a B lánc (C1QB), a komplement faktor D (CFD vagy DF), a komplement faktor H (CDH vagy HF1), a szerpin peptidáz inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1 (SERPING1). Korábbi tanulmányokban a SERPING1 szignifikánsan csökkent kifejeződését validálták mellékvesekéreg-carcinomában, sőt felvetették alkalmazhatóságát a rosszindulatúság jelzésére alkalmas biomarkerként [45, 46]. A komplementrendszer további tagjainak (komplement komponens 2, 6 és 7 (C2, C6, C7),

komplement faktor B és I (*BF*, *IF*), komplement komponens 3a receptor (*C3AR*), komplement komponens (3a/4a) receptor (*C1R*) és a decay accelerating faktor (*DAF* vagy *CD55*) szignifikánsan csökkent kifejeződése szintén több vizsgálat elemzése során [36, 43, 44, 195] volt kimutatható.

Bár e megfigyelések érdekesek, és a komplementrendszer daganatbiológiában játszott szerepéről számos adat látott már napvilágot [288], mellékvesekéreg-daganatokban jelenleg nem ismertek olyan kísérletes eredmények, amelyek alapján az észlelt eltérések biológiai jelentőségére következtethetnénk.

A komplementrendszer mellett az útvonalelemzés másik fő immunológiai útvonalként az antigénprezentációt adta meg. Az antigénprezentáció folyamatában alapvető fő hisztokompatibilitás komplex (major histocompatibility complex, MHC) molekuláinak eltérő mRNS szintű kifejeződését több microarray vizsgálat elemzése során észleltük. A professzionális antigénprezentáló sejtekre jellemző MHCII molekulák érdekes módon a mellékvesekéreg zona reticularis rétegében is kimutathatók [289]. A rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokban azonban az MHCII fehérjék nem mutathatók ki, sőt az MHCII fehérjék immunhisztokémiai kimutatása a daganat jóindulatúsága mellett szól [290].

Metaanalízisünkben számos MHCII fehérjé kódoló gén csökkent expresszióját észleltük. A génexpressziós és citogenetikai eredmények korrelációja során az MHCII gének csökkent kifejeződésével az MHC régiót hordozó chr6p21 kromoszómarégió elvesztését tudtuk összefüggésbe hozni. Nem világos, hogy a mellékvesekéreg sejteken található MHCII molekulák milyen funkcionális szerepet töltenek be, vagyis ténylegesen részt vesznek-e az antigénprezentáció folyamataiban.

**Mindezek alapján a komplementrendszer és antigénprezentáció folyamataiban szereplő gének eltérései kimutathatóak a mellékvesekéreg daganataiban, de ezek biológiai jelentőségét jelenleg – kísérletes adatok hiányában – nem tudjuk felmérni.**

A metaanalízisünkben azonosított útvonalak a mellékvesekéreg-carcinoma gyógyszeres kezelésének új támadáspontjait jelezhetik. Ebből a szempontból különösen a retinsav jelátviteli útvonal befolyásolása lehet fontos, de más útvonalak további tanulmányozása, *in vitro* és *in vivo* validálása is hasznos lehet. Tekintettel arra, hogy a mellékvesekéreg-carcinoma gyógyszeres kezelésében kevés hatékony szerrel rendelkezünk [9], a funkcionális

## dc\_206\_11

genomikai és bioinformatikai megközelítések az új gyógyszeres támadáspontok azonosításának fontos megközelítési módját jelezhetik [291].

### **5.5. A hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebomlásában szerepet játszó gének és fehérjék kifejeződése az egészséges és daganatos mellékvesekéregben**

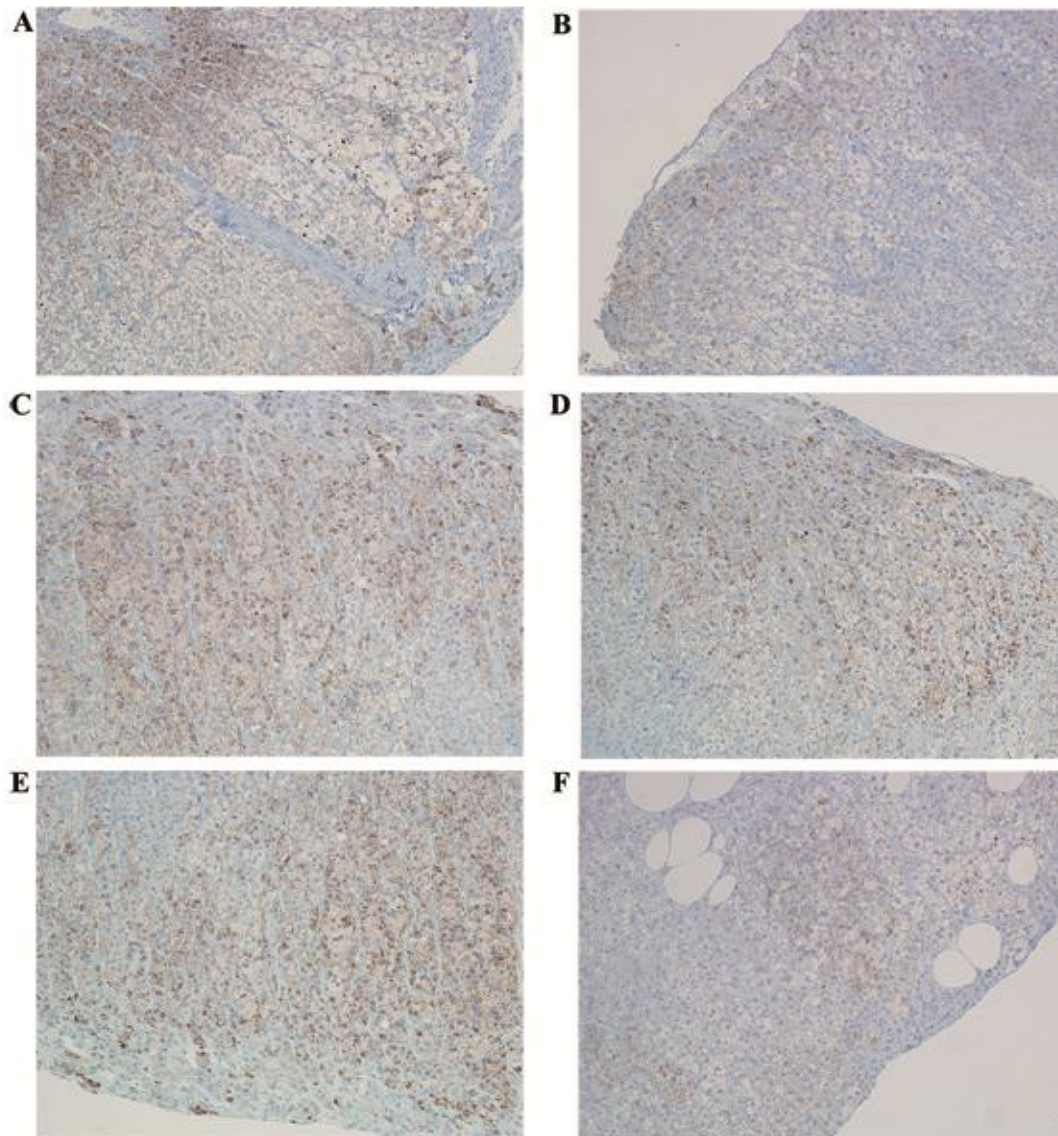
Bár a hisztamin patogenetikai jelentőségét már több daganatban vizsgálták és igazolták (pl. melanoma malignum, vastagbélrák) [14-16], mellékvesekéreg-daganatokban betöltött szerepe nem ismert, sőt az ép mellékvesekéregben játszott szerepe sem világos. Vizsgálatunkban a hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebomlásában szerepet játszó gének és fehérjék kifejeződését tanulmányoztuk annak megállapítása céljából, hogy a mellékvesekéregben a hisztaminerg apparátus elemei kifejeződnek-e.

Első lépésben immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztünk ép mellékvesekéreg szöveteken a hisztidin dekarboxiláz (HDC), a hisztaminreceptorok (HRH1-4) és a hisztamin lebomlásában alapvető hisztamin-N-metil transzferáz (HNMT) és diamin-oxidáz (DAO) kimutatása céljából **(24. ábra)**.

A DAO kivételével valamennyi fehérje jelenlétét kimutattuk az ép mellékvesekéregben, ami alapján az ép mellékvesekéregben a hisztamin anyagcsere fő elemei jelen vannak.

Korábbi vizsgálatokban a HDC jelenlétét kimutatták emberi és patkány mellékvesevelőben [86, 87]. Immunhisztokémiai vizsgálataink eredményei alapján a HDC a mellékvesekéreg mindhárom rétegében jelen van és itt festődését intenzívebbnek találtuk, mint a mellékvesevelőben.

A hisztamin legfőbb szöveti forrásai a hízósejtek [292]. A patkány mellékvesekéreg vizsgálata során hízósejteket mutattak ki a mellékvesét körülvevő tokban az azon áthatoló erek mentén. Az ezekből ACTH hatásra felszabaduló hisztamin és szerotonin a mellékvesekéreg vérátáramlásának fokozódása révén befolyásolhatja a mellékvesekéreg sejtek hormonszekréciónak [293].



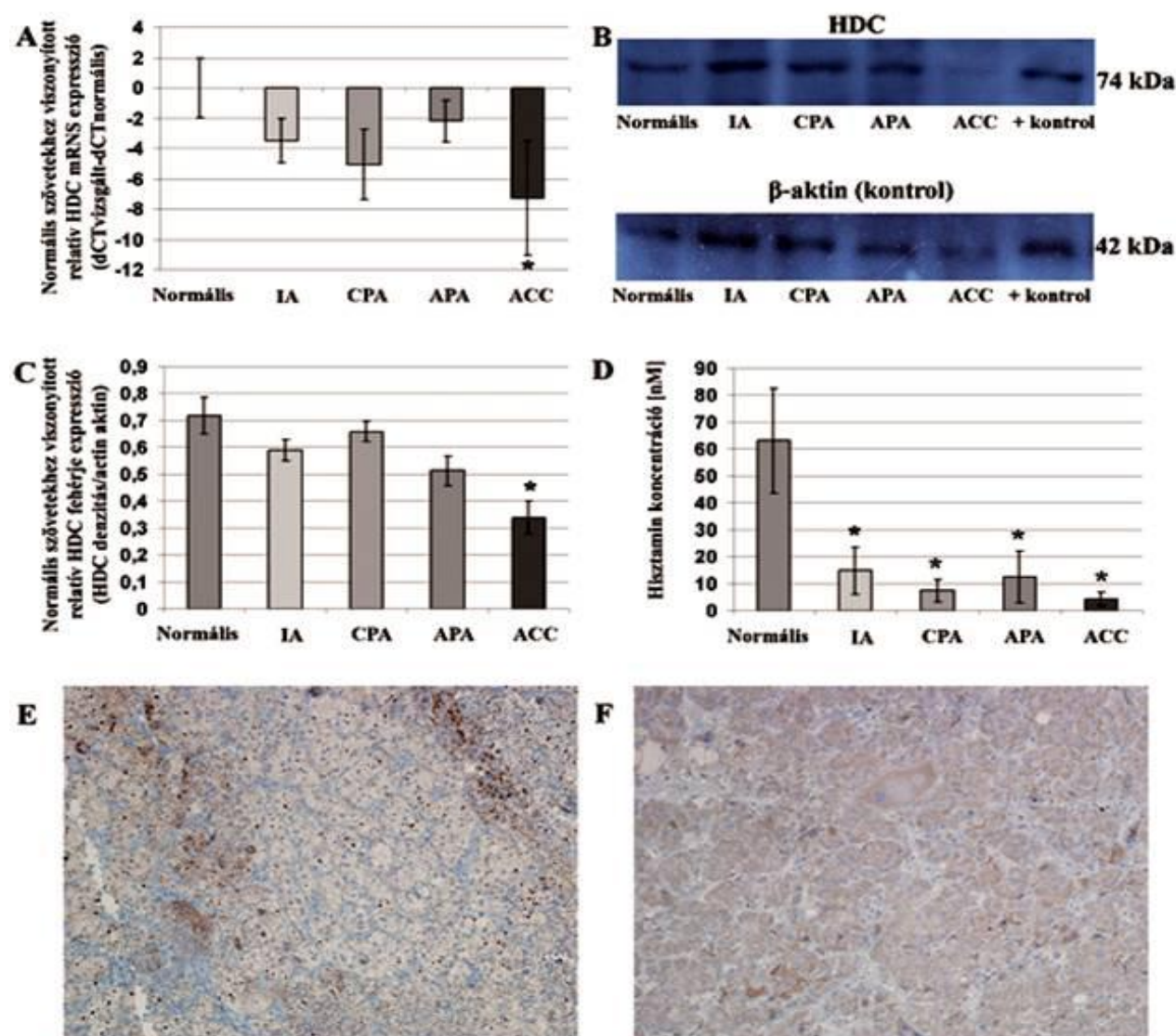
**24. ábra: A HDC (A), a HRH1 (B), a HRH2 (C), a HRH3 (D), a HRH4 (E) és a HNMT (F) kifejeződése a normális mellékvesekéregben immunhisztokémiai vizsgálattal. Reprezentatív vizsgálatok eredményei. 20x-os nagyítás.**

A hízósejtek jelenlétét toluidinkék festéssel és c-kit (CD117) immunhisztokémiával is kerestük mellékvesekéreg szövetekben. Toluidinkék festéssel metakromáziás festődésű sejteket nem találtunk és a c-kit immunhisztokémia is csak elvétve mutatott pozitívan festődő sejteket. Hasonló eredményre jutottak Zhang és mtsai is, akik az ép mellékvesekéregben nem találtak c-kit pozitív sejteket [294].

Lefebvre és mtsai. [295] hízósejtszerű sejteket találtak az emberi mellékvesekéregben és eredményeik szerint az ezekből felszabaduló szerotonin szerepet játszhat a mellékvesekéreg sejtek kortizol termelésének parakrin szabályozásában is. Eredményeink

alapján az **emberi mellékvesében a hisztamin fő forrásának nem a hízósejtek (vagy hízósejtszerű sejtek), hanem maguk a mellékvesekéreg sejtjei tekinthetők.**

Miután az ép mellékvesekéregben kimutattuk a hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebomlásában szereplő fehérjét, jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokban vizsgáltuk e génnek kifejeződését. Valamennyi vizsgált mellékvesekéreg-daganatban kimutattuk a HDC jelenlétét mind mRNS, mind fehérje szinten (**25. ábra A-B**).



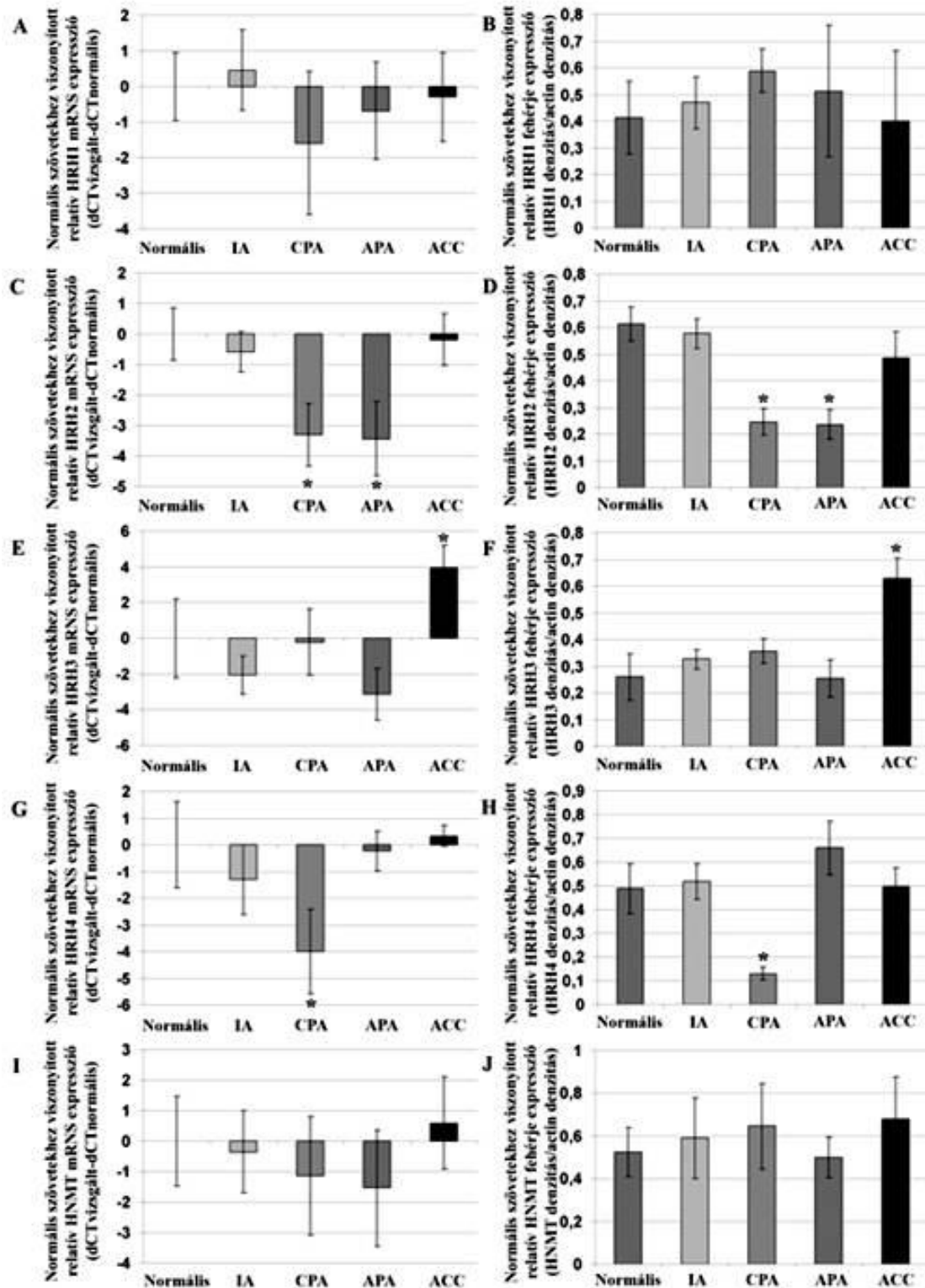
**25. ábra: A HDC és hisztamin kifejeződése mellékvesekéreg-daganatokban.** A: a HDC mRNS kifejeződése (valós idejű qRT-PCR, a normális mintákhoz viszonyított  $\Delta\Delta CT$  értékek), B-C: HDC fehérje szintű vizsgálata (B: reprezentatív kvalitatív Western-blot, C: a Western-blot eredmények denzitometriás elemzése a  $\beta$ -aktinhez viszonyítva). D: a hisztamin koncentrációja a normális mellékvesekéregben és a daganatokban. A HDC immunhisztokémiai kimutatása egy reprezentatív jó- (E) és rosszindulatú daganatban (F) (20x-os nagyítás). Rövidítések: IA: Inaktív adenoma, CPA: kortizoltermelő adenoma, APA: aldosterontermelő adenoma, ACC: mellékvesekéreg-carcinoma (átlag  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$ ,  $n=58$ ).

Mind mRNS-, mind fehérjeszintű vizsgálataink alapján a HDC kifejeződése a normális és a hormonálisan inaktív adenoma szövetekben volt a legnagyobb mértékű, valamivel kisebb mennyiségben volt kimutatható a hormontermelő (kortizol és aldosteron) jóindulatú daganatokban és szignifikánsan csökkent kifejeződést mutatott a carcinoma szövetekben **(25. ábra A-C, E, F)**.

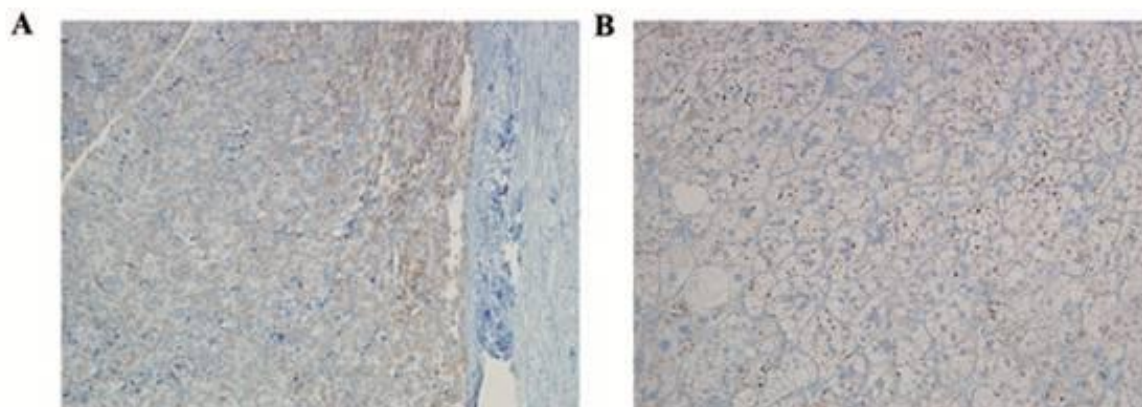
Miután kimutattuk a hisztamin bioszintézis kulcsenzimét mind az ép, mind a daganatos mellékvesekéregben, kérdésként merült fel magának a hisztamin mennyiségének meghatározása mellékvesekéreg szövetben. ELISA módszerrel vizsgálva **a hisztamin mennyisége szignifikánsan kevesebb volt a rosszindulatú daganatokban mind az adenomákhoz, mind az ép mellékvesekéreghez viszonyítva (25. ábra D)**.

Korábbi, a hisztamin mellékvesekéregre kifejtett hatását vizsgáló tanulmányokban ellentmondásos adatokat közöltek a hisztaminreceptorok kifejeződéséről. Eredményeink szerint a hisztamin valamennyi receptora kifejeződik a normális mellékvesekéregben (mind mRNS, mind fehérje szinten), így feltételezhető, hogy a korábbi elképzelésekkel ellentétben a hisztamin közvetlenül, a mellékvesévelő kromaffin sejtjeinek közreműködése nélkül hathat a mellékvesekéreg sejtjeire. Korábbi tanulmányokban azt találták, hogy a hisztamin HRH1 receptora részt vesz a szteroidhormonok szekréciójának szabályozásában [89, 90]. Vizsgálataink alapján a HRH1 kifejeződése bizonyult legnagyobb mértékűnek az összes vizsgált csoportban mind mRNS, mind fehérje szinten, azonban az egyes csoportok között nem mutatott eltérést.

**A HRH2 szignifikánsan kisebb mértékben fejeződött ki a kortizol- és aldosterontermelő adenomákban minden más vizsgált csoporthoz képest.** Kortizoltermelő adenomákban a HRH4 nem volt kimutatható, míg a többi csoport mintáinak többségében, ha kis mértékben is, de kimutatható volt. Érdekes megfigyelés, hogy **a HRH3 expressziója a rosszindulatú daganatokban szignifikánsan magasabb volt mind a normális szövetekhez, mind az adenomákhoz képest (26. ábra)**. Ezt az eltérést immunhisztokémiai vizsgálat során is észleltük, **ami akár a rosszindulatúságra jellemző diagnosztikus markerként történő alkalmazhatóságát is felvetheti (27. ábra)**. A döntően idegrendszerben kifejeződő HRH3 mellékvesekéreg-carcinomában megfigyelt nagymértékű expressziója figyelemre méltó, de ennek funkcionális jelentősége nem világos.



**26. ábra: A HRH1 (A, B), HRH2 (C, D), HRH3 (E, F), HRH4 (G, H) és HNMT (I, J) mRNS- (qRT-PCR a normális mintákhoz viszonyított  $\Delta\Delta CT$  értékek) és fehérjeszintű (Western-blot eredmények denzitometriás elemzése a  $\beta$ -aktinhez viszonyítva) kifejeződésének vizsgálata a normális mellékvesekéregben és a mellékvesekéreg jó- és rosszindulatú daganataiban. Rövidítések: IA: Inaktív adenoma, CPA: kortizoltermelő adenoma, APA: aldosterontermelő adenoma, ACC: mellékvesekéreg-carcinoma (\*  $p < 0.05$ ,  $n = 58$ ).**



**27. ábra: A HRH3 immunhisztokémia eredménye egy-egy reprezentatív malignus (A) és egy kortizoltermelő benignus (B) mellékvesekéreg-daganatban (20x-os nagyítás).**

A hisztamin receptorai a G-fehérjékhez kapcsolt receptorok csoportjába tartoznak. Míg a HRH2 az intracelluláris cAMP koncentrációját emeli, addig a HRH3 és HRH4 az adenilát cikláz aktivitását gátolják [296, 297]. Az ACTH-cAMP-PKA jelátviteli útvonal szerepet játszik a ritka, jóindulatú, kortizoltermelő mellékvesekéreg-daganat kialakulására hajlamosító daganatszindrómák (Carney-complex, McCune-Albright- szindróma) patogenezisében és szerepére a sporadikus jóindulatú mellékvesekéreg-daganatokban is vannak adatok, azonban mellékvesekéreg-carcinómában jelentősége nem tisztázott [21].

A hormontermelő adenomákban észlelt csökkent HRH2 és a kortizoltermelő rosszindulatú mellékvesekéreg-carcinómára jellemző növekedett HRH3 expresszió e daganatokban csökkent cAMP jelátvitelre vezethet. Tekintettel arra, hogy a daganatokban a hisztamin koncentrációja az ép mellékvesekéreghez képest csökkent, e hipotézis jelentősége kérdéses, illetve tisztázásához további vizsgálatok lennének szükségesek.

A HNMT expressziója egyik csoport között sem mutatott szignifikáns különbséget. A DAO sem mRNS, sem fehérje szinten nem volt kimutatható.

A hisztamin patogenetikai szerepét több daganatban igazolták és elsősorban daganatképződést serkentő hatásait írták le. Hatását kifejtheti mind közvetlenül a daganat sejteken, azok hisztamin receptorain keresztül, mind közvetve, a daganatsejteket körülvevő stróma sejtek befolyásolása révén [15]. Kimutatták, hogy az emberi melanoma sejtek hisztamint termelnek, és ez autokrin növekedési faktorként, a HRH1 és HRH2 receptorokon keresztül serkenti a sejtek szaporodását [298]. Egérmodellben a fokozott hisztamintermelést a melanoma gyorsabb progressziójával is kapcsolatba hozták [299]. A hisztamin a helyi

immunválaszt is nagymértékben képes befolyásolni [300]. Egerek colorectális tumoraiban a hisztamin hatására a Th1 immunválaszt serkentő IL-12 és interferon- $\gamma$  csökkenése és a Th2 immunválaszt serkentő IL-10 növekedése volt kimutatható [16].

Eredményeink szerint a mellékvesekéreg-daganatokban a hisztamin mennyisége csökkent. Elképzelhető, hogy a HDC mellékvesekéreg-daganatokban észlelt csökkent kifejeződése e daganatok „dedifferenciálódásának” részjelensége, hiszen a rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatokban más gének (pl. szteroidhormon bioszintézisben szereplő gének, *novH*) csökkent kifejeződését is leírták [47, 48, 301]. Expressziós vizsgálataink alapján nem tudunk választ adni arra a kérdésre, hogy a hisztaminnak milyen funkcionális jelentősége van ezekben a daganatokban és a hisztaminreceptorok kifejeződésének megváltozott mintázata a hisztamin csökkent koncentrációjával együtt milyen kórélettani következményekre vezet. Nem eldönthető kérdés az sem, hogy a hisztaminnal kapcsolatos gének és fehérjék eltérései a mellékvesekéreg-daganatok kialakulásában játszanak közre, vagy ezek csak következmények. E kérdések eldöntéséhez további, funkcionális vizsgálatok szükségesek. Mindazonáltal valószínűsíthető, hogy szemben más daganatokkal a hisztamin a mellékvesekéregben nem egyértelműen daganatnövekedést serkentő hatású. E megfigyelésünk is jelezheti, hogy a mellékvesekéreg több tekintetben is eltérően viselkedik más szervektől.

**A hisztamin mellékvesekéreg-daganatokban betöltött szerepe a gyulladásos-immun folyamatok és az endokrin daganatok közötti kapcsolatra utal.**

## 5.6. *In silico* genomikai vizsgálatok szekvenciavariánsok felderítésére a hisztamin bioszintézisében, hatásában és lebontásában szereplő fehérjék génjeiben

A HDC, hisztaminreceptorok (HRH1-4), HNMT és DAO szekvenciavariánsait *in silico* megközelítéssel kerestük. Számos már leírt és több új variánst azonosítottunk mind a nem kódoló, mind a kódoló szekvenciákban. E megközelítés hátránya, hogy az újonnan talált variánsok esetében nem tudjuk kizárni annak lehetőségét, hogy ezek nem valós eltérések, hanem csak a molekuláris genetikai vizsgálatok (polimeráz láncreakció, szekvenálás) műtermékei [175].

A nem kódoló régiókban észlelt variánsokat nem sikerült a génnek működésében ismert szabályozó szekvenciákkal (promoter, enhancer, splicing donor és akceptor helyek) kapcsolatba hozni, ezáltal e variánsok jelentőségére nem tudtunk következtetést levonni.

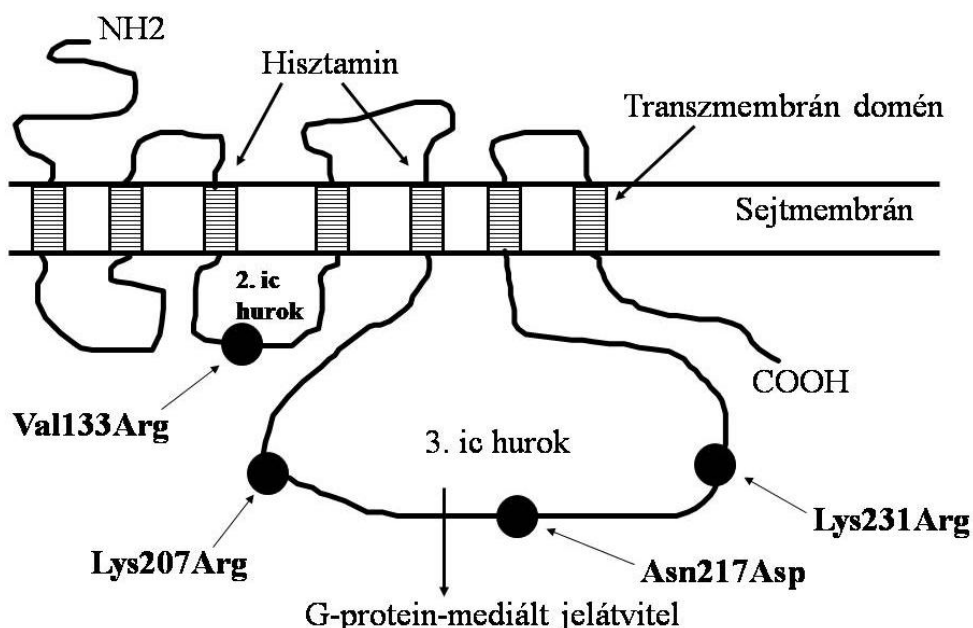
A kódoló szekvenciák variánsai között mind aminosavcserével járó (**8. táblázat**), mind aminosavcserével nem járó szekvenciaeltéréseket találtunk. Az aminosavcserével nem járó variánsoknak is lehet biológiai szerepe, mivel rejtett intragénikus szabályozó szekvenciákat befolyásolhatnak. Az aminosavcserével járó variánsok között vannak olyanok, amelyek a fehérjék fizikokémiai tulajdonságait befolyásolhatják, hiszen az eredeti és megváltozott aminosav jellemzői jelentősen különböznek (pl.. Asp⇒His a DAO aminosavszekvenciájában), míg mások vélhetően nem eredményeznek drasztikus változásokat (pl. Lys⇒Arg a H2R, Asp⇒Glu a H3R, Ser⇒Thr a DAO esetében). A talált aminosavcserével járó variánsokat összevetettük az adott enzimek és receptorok esetében ismert struktúra-funkció adatokkal a célból, hogy a variánsok funkcionális jelentőségére tudjunk következtetni.

A HDC génben három aminosavcserével járó variánst észleltünk (Ser148Gln, Ile400Asn, Arg617Trp), azonban ezek esetleges biológiai jelentőségére vonatkozó struktúra-funkció adatot nem találtunk.

| Vizsgált gén | Észlelt variáns (eredeti aminosav - érintett kodon - megváltozott aminosav) |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| HDC          | Ser148Gln, Ile400Asn, Arg617Trp                                             |
| H1R          | Gly252Val                                                                   |
| H2R          | <b>Val133Arg, Lys175Asn, Lys207Arg, Asn217Asp, Lys231Arg, Val268Met</b>     |
| H3R          | Asp19Glu                                                                    |
| H4R          | <b>Ala138Val*</b> , <b>His206Arg*</b> , Arg252Gln                           |
| DAO          | Pro280Ala, Asp290Thr, <b>Ser332Phe*</b> , Ser592Thr, Arg632Gly, Asp664His   |
| HNMT         | <b>Thr105Ile</b>                                                            |

**8. Táblázat: A kódoló szekvenciákat érintő, aminosavcserével járó variánsok.** A vastagon szedett variánsokat populációgenetikai vizsgálatokban megerősítették. A csillaggal is jelzett variánsokat *in silico* módszerünkkel elsőként mi azonosítottuk.

A hét transzmembrán domént tartalmazó membránreceptorok családjába tartozó hisztaminreceptorok felépítésében nagy jelentőséggel bír a harmadik intracelluláris hurok, mivel ez a régió fontos szerepet játszik a jelátviteli folyamatokban, a G-fehérjék kapcsolódása révén [302]. A HRH1 receptorban talált Gly252Val variáns, valamint a HRH2 receptorban talált hat, már leírt, aminosavcserével járó variáns közül a Lys207Arg, Asn217Asp és Lys231Arg variánsok érdekes lehetnek, mivel a harmadik intracelluláris hurokban találhatók [303]. A második intracelluláris hurokrégió is lehet, a harmadikhoz képest kisebb jelátviteli jelentősége [304]. A HRH2 Val133Ala variánsa a második intracelluláris hurokban található, ami így szintén szerepet játszhat a jelátviteli folyamatok befolyásolásában (**28. ábra**). Schizophreniában szenvedő betegekben az Asn217Asp előfordulását gyakoribbnak találták, mint az egészséges populációban [305]. Későbbi tanulmányokban azonban ezt nem erősítették meg [306]. A HRH3 receptorban talált egyetlen kódoló szakaszt érintő variáns, az Asp19Glu az N-terminális extracelluláris régióban található. Ez a régió a jelátvitelben és a ligand kötésében mai ismereteink szerint nem játszik szerepet.



**28. ábra:** A HRH2-ben talált fontosabb, aminosavcserével járó szekvenciavariánsok sematikus ábrázolása. (ic: intracelluláris)

A HRH4 génjében talált három variáns közül az Ala138Val és His206Arg variánsokat elsőként írtuk le és ezeket később populációgenetikai vizsgálatok során megerősítették [307]. E variánsok biológiai jelentőségére még nem tudtunk következtetni, mivel a H4 receptor esetében struktúra-funkció adatok nem voltak ismertek.

A hisztamin lebontásában szerepet játszó enzimek közül a DAO *in silico* észlelt szekvenciavariánsai között a Ser332Phe variánst később populációgenetikai vizsgálatokban megerősítették [307]. A további variánsok közül az Asp664His aminosavcserével járó variáns figyelemre méltó lehet, mivel ezen aminosavcsere az amilorid kötéseért felelős hidrofób aminosavszekvencia szomszédságában helyezkedik el. A diamin-oxidáz alternatív elnevezése amiloridkötő fehérje, ami arra utal, hogy ez az enzim a káliumspóroló vízajtó amilorid célfehérjéje [308]. Elképzelhető, hogy ez a variáns (amennyiben valós) az amilorid kötődésének befolyásolása révén klinikai jelentőggel is bírhat. Másrésztől ismert az is, hogy a DAO katalitikus csoportjának felépítésében igen fontos rézion kötésében hisztidinek vesznek részt [309], és nem zárható ki, hogy egy újabb hisztidin megjelenése a katalitikus régió működését zavarhatja. A Ser592Thr variáns egy közvetlenül a katalitikus régió (367-590 aminosavak) [310] mellett elhelyezkedő szerint változtat meg. A DAO struktúrájának fenntartásában bázikus lizin és arginin aminosavaknak fontos szerepe lehet [311], ebből a szempontból az Arg632Gly csere emelendő ki, mivel egy bázikus aminosavat neutrálisra

cserél. A HNMT génben egyetlen, már leírt polimorfizmust találtunk. A Thr105Ile (C314T) izoleucint tartalmazó variánsa csökkent enzimaktivitású és hőstabilitású enzimet kódol [312]. E variáns populációs gyakorisága 5 és 10 % között változik. Egyes adatok e variánst összefüggésbe hozták az asthma bronchiale-val, azonban az összefüggést nem sikerült egyértelműen igazolni [80]. Az Thr105Ile polimorfizmust a kortizol metabolizmusával is kapcsolatba hozták, mivel az Ile variánst hordozókban metilprednizolon adása nyomán az endogén kortizolelválasztás gátlása kifejezettebb volt. Feltételezték, hogy e megfigyelés hátterében a csökkent aktivitású enzim következtében a hypothalamikus hisztaminerg neuronokban felszaporodó hisztamin centrális hatása állhat [313].

A többi kódoló szekvenciát érintő variánst nem sikerült a fehérjék működésében bizonyított szereppel bíró régiókkal kapcsolatba hozni. Mindazonáltal nem zárható ki, hogy e variánsok is fontosak lehetnek. A fehérjék struktúrájának befolyásolása révén olyan aminosavcserék is funkcionális változásokat eredményezhetnek, melyek közvetlenül nem változtatnak meg kiemelt régiókat.

**Az a megfigyelés, miszerint az *in silico* azonosított feltételezhető szekvenciavariánsaink közül hármat későbbi populációgenetikai vizsgálatok során igazoltak, módszerünk alkalmazhatóságát jelzi a genetikai variánsok kutatásában.** Mindazonáltal számos *in silico* azonosított variánsunkat nem találták meg biológiai mintákban, ami egyrészt felveti az adatbázisokban található hibák lehetőségét, másrészt hangsúlyoznom kell, hogy az e módszerrel azonosított variánsok igazolásához a populációgenetikai vizsgálatok elengedhetetlenek.

## 5.7. *In silico* genomikai vizsgálatok a szteroidhormon bioszintézis és metabolizmus enzimei és a glükokortikoidreceptor génjeiben

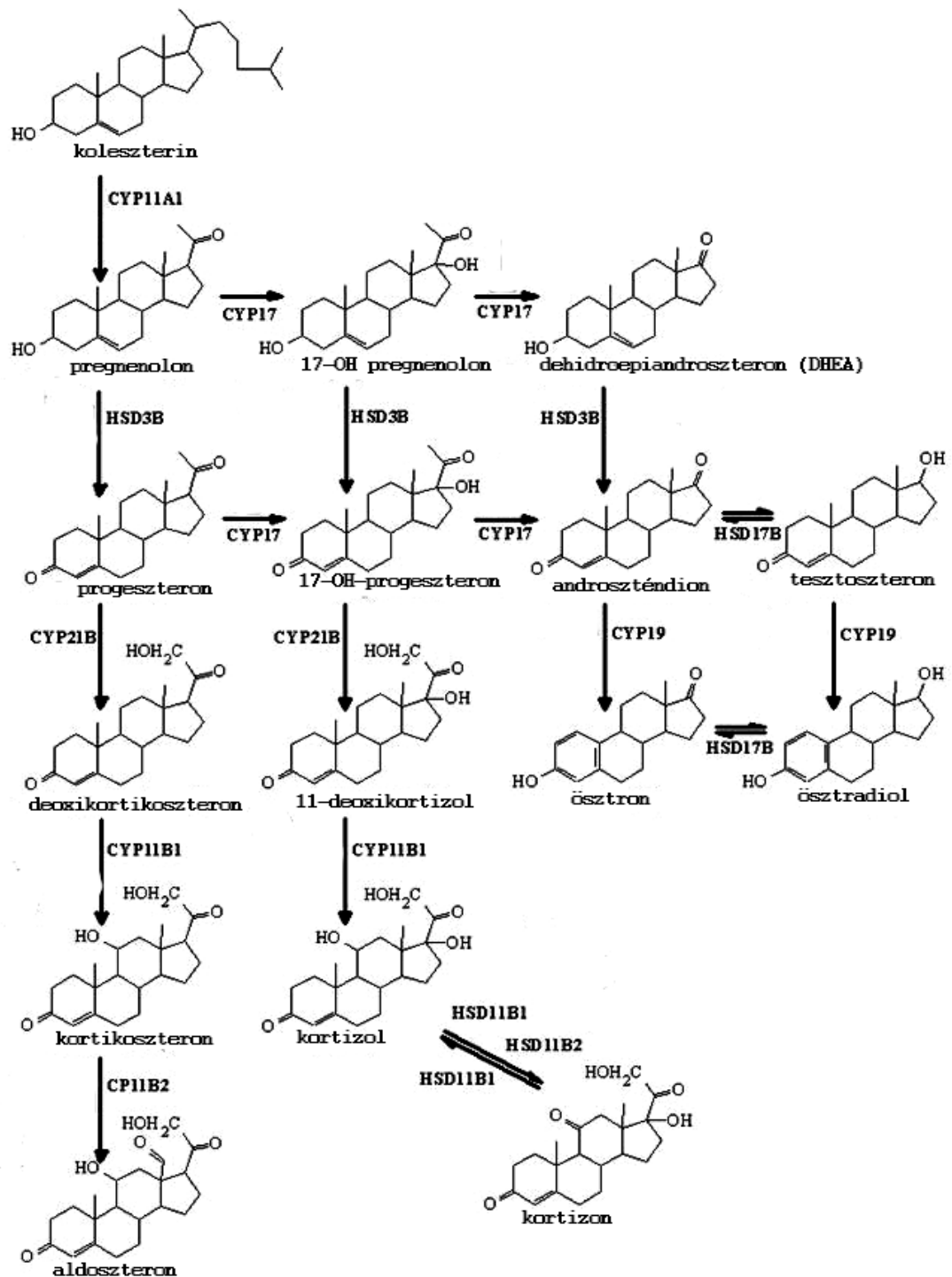
Az *in silico* genomikai vizsgálatok területén maradva e helyütt tárgyalom két másik munkám eredményeit, amelyekben a szteroidhormonok bioszintézisében és metabolizmusában szereplő enzimek génjeinek valamint a glükokortikoidreceptor gén szekvenciavariánsait vizsgáltam.

Több adat utal arra, hogy mind a szteroidhormon-bioszintézis és -metabolizmus enzimei, mind a glükokortikoidreceptor szerepet játszhat a mellékvesekéreg-daganatok patogenezisében, és feltételezhetjük, hogy variánsaiknak is szerepe lehet a daganatok kialakulásában. Az eredményeket röviden ismertetem.

### 5.7.1. Szteroidhormon bioszintézis és metabolizmus

Jól ismert, hogy a szteroidhormon bioszintézis egyes enzimeit érintő mutációk (főként a 21-hidroxiláz, 17 $\alpha$ -hidroxiláz/17-20 liáz, 11 $\beta$ -hidroxiláz) congenitális adrenalis hyperplasia kialakulásához vezetnek [314]. Egyes adatok arra utalnak, hogy ezen enzimek eltérései a mellékvesekéreg-daganatok patogenezisében is szerepet játszhatnak. A sporadikus mellékvesekéreg-daganatok kis részében a 21-hidroxiláz szomatikus mutációit mutatták ki [315]. A génexpressziós vizsgálatok eredményei szerint a rosszindulatú daganatokban a szteroid bioszintézis enzimek kifejeződése csökkent mértékű a jóindulatúakhoz képest [47].

A szteroidhormonok bioszintézisében és lebontásában szereplő enzimek (**29. ábra**) közül a p450 oldallánchasító enzim (*CYP11A1*), a 17 $\alpha$ -hidroxiláz/17-20 liáz (*CYP17*), a 3 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 és 2 izotípusa (*HSD3B1* és *HSD3B2*), a 21-hidroxiláz (*CYP21B*), a 11 $\beta$ -hidroxiláz 1 (kortizol-szintáz, *CYP11B1*), a 11 $\beta$ -hidroxiláz 2 (aldoszteron-szintáz, *CYP11B2*), aromatáz (*CYP19*), 11 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1 és 2 (*HSD11B1* és *HSD11B2*), szteroid 5 $\alpha$ -reduktáz 1 és 2 (*SRD5A1* és *SRD5A2*), szteroid 5 $\beta$ -reduktáz (*SRD5B1*), dehidroepiandroszteron szulfotranszferáz (*DHEA-ST*), 17 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 1, 2 és 3 (*HSD17B1-3*) enzimek génszekvenciáit vizsgáltuk a kódoló és nem kódoló szakaszok szekvenciavariánsainak vizsgálata céljából.



29. ábra: A szteroidhormon bioszintézis folyamatainak sematikus ábrázolása. Rövidítések a szövegben.

A szteroidhormon bioszintézis sebességmeghatározó lépését az oldallánchasító enzim (*CYP11A1*) katalizálja. A *HSD11B1* és 2, a *SRD5A1* és 2, a *SRD5B1* és a *DHEA-ST* a szteroidhormonok metabolizmusában vesznek részt. A 17 $\beta$ -hidroxiszteroid dehidrogenáz 3 típusa közül az 1-es és 3-as elsősorban a szteroidhormonok bioszintézisében (ösztadiol és tesztoszteron), míg a 2-es típus a metabolizmusukban (ösztadiol-ösztion, tesztoszteron-androsztendion átalakulás) vesz részt [316].

Mind a kódoló, mind a nem kódoló szakaszokon számos variánst találtunk, amelyek között már ismert variánsok is azonosíthatók voltak.

A nem kódoló szakaszokon nagyszámú szekvenciavariánst találtunk pl. 59-et a *HSD11B2*-ben, 53-at a *CYP19*-ben és 77-et a *CYP17*-ben. Két ismert nem kódoló szekvenciát érintő szekvencia variánst is találtunk, így az emlőrákra vonatkozó hajlam meghatározásával összefüggésbe hozott *CYP19* szekvenciavariánst a gén 3' nem kódoló régiójában (C/T +19 bp) [317], valamint az aldoszteron bioszintézis utolsó lépését katalizáló aldoszteron- szintázt kódoló *CYP11B2* gén -344C/T polimorfizmusát, amelyet már több hypertóniával, primer aldosteronizmussal és szívelégtelenséggel foglalkozó tanulmányban vizsgáltak [318].

A kódoló szekvenciákat érintő szekvenciavariánsok között mind aminosavcserével járó, mind „csendes” (silent) szekvenciavariánsokat észleltünk. A *CYP11A1* és *CYP11B2* génben 7-7, a *CYP17*-ben és *CYP21*-ben 2-2 eddig nem leírt szekvenciavariánst azonosítottunk stb. A **9. táblázatban** a szteroid bioszintetikus enzimek, míg a **10. táblázatban** a metabolizmusban szerepet játszó enzimek variánsait mutatom be.

Az oldallánchasító enzimet kódoló *CYP11A1* génben hét eddig ismeretlen variánst is találtunk, azonban ezek biológiai jelentősége nem ismert.

A kortizol és aldoszteron bioszintézisében alapvető 21-hidroxilázt kódoló génben (*CYP21B*) három ismert (Lys102Arg, Pro426Arg, Asn493Ser) és két új variánst (Asp437Glu, Pro490Pro) észleltünk. A Pro426Arg variánsa érdekes lehet, mivel a 426-os pozícióban található prolin az enzim katalitikus centrumának felépítésében, a hem kötésében alapvető jelentőségű [319].

| Vizsgált gén | szekvenciavariáns (kodon száma középén) | érintett aminosavak |
|--------------|-----------------------------------------|---------------------|
| CYP11A1      | tac16tgc                                | Tyr16Cys            |
|              | ata137gta                               | Ile137Val           |
|              | ttc274ttg                               | Phe274 Leu          |
|              | atg301atc                               | Met301Ile           |
|              | gtc356gtg                               | Val (NV)            |
|              | gcc501ccc                               | Ala501Pro           |
|              | aag 505gag                              | Lys505Glu           |
| CYP17        | <b>tgg22tgc</b>                         | <b>Trp22Cys</b>     |
|              | <b>tct65tcg</b>                         | <b>Ser (NV)</b>     |
|              | cat46cac                                | His (NV)            |
|              | gat192gac                               | Asp (NV)            |
|              | <b>gat283gac</b>                        | <b>Asp (NV)</b>     |
| HSD3B1       | <b>ttg338ctg</b>                        | <b>Leu (NV)</b>     |
|              | <b>aac367acc</b>                        | <b>Asn367Thr*</b>   |
| CYP21B       | <b>aag102agg</b>                        | <b>Lys102Arg</b>    |
|              | <b>ccg426cgc</b>                        | <b>Pro426Arg</b>    |
|              | gac437gag                               | Asp437Glu           |
|              | cca490ccg                               | Pro (NV)            |
|              | <b>aac493agc</b>                        | <b>Asn493Ser</b>    |
| CYP11B1      | <b>cgg43cag</b>                         | <b>Arg43Gln*</b>    |
|              | cta75ctg                                | Leu (NV)            |
|              | <b>ctg362ctc</b>                        | <b>Leu (NV)</b>     |
|              | ttc494tgc                               | Phe494Cys           |
| CYP11B2      | tcc17tcg                                | Ser17Cys            |
|              | atc55atg                                | Ile55Met            |
|              | tac119atc                               | Tyr119Ile           |
|              | ttc168ttt                               | Phe (NV)            |
|              | <b>aag173agg</b>                        | <b>Lys173Arg</b>    |
|              | aga249agc                               | Arg249Ser           |
|              | gcg291gca                               | Ala (NV)            |
|              | ccc322ccg                               | Pro (NV)            |
|              | agg374cgg                               | Arg (NV)            |
|              | gtg386gcg                               | Val386Ala           |
| CYP19        | <b>gta80gtg</b>                         | <b>Val (NV)</b>     |
|              | ggt219ggg                               | Gly (NV)            |
|              | <b>cgc264tgc</b>                        | <b>Arg264Cys</b>    |
|              | aac496agc                               | Asn496Ser           |
| HSD17B1      | agt192ggt                               | Ser192Gly           |

**9. táblázat: A szteroidhormonok bioszintézisében szereplő enzimek génjeiben észlelt kódoló szekvenciákat érintő variánsok.** A vastagon szedett variánsokat már leírták. \*-gal jelölt variánsokat későbbi genetikai epidemiológiai vizsgálatokban igazolták. NV (nincs változás, szinonim): nem eredményez aminosavcserét

A **HSD3B1** gén **Asn367Thr** variánsát későbbi vizsgálatokban igazolták és afroamerikai valamint kaukázusi népességben 10 % feletti allélgyakoriságot állapítottak meg [320]. A kortizolszintézis utolsó lépését katalizáló enzimet kódoló **CYP11B1** génben egy másik *in silico* variánsunk előfordulását is igazolták (**Arg43Gln**), és *in vitro* mutagenézisen alapuló vizsgálatokkal azt találták, hogy e variáns a vad típushoz képest 30-50 %-os intracelluláris enzimszint csökkenést eredményezett [321].

A többi ismert szekvenciavariáns közül érdemes még megemlíteni aldosteron szintáz (**CYP11B2**) **Lys173Arg** polimorfizmusát, amit primer aldosteronismussal és alacsony renin aktivitással (low renin) hypertóniával hoztak összefüggésbe. A **Lys173** variáns a fent említett nem kódoló -344T variánssal együtt a **CYP11B2** nagyobb mértékű kifejeződésével jár az ép mellékvesekéregben és aldosterontermelő adenomákban is a -344C/Arg173 haplotípushoz viszonyítva [322].

A szteroidhormonok metabolizmusában szereplő gének közül a 11-béta hidroxiszteroid dehidrogenáz 2 típusa (**HSD11B2**) a kortizol-kortizon átalakulás katalizálásával fontos szerepet játszik az aldosteronreceptor kortizollal szembeni védelmében. E gén egyetlen, már ismert variánsát találtuk [323].

| Vizsgált gén   | szekvenciavariáns<br>(érintett kodon<br>száma középen) | érintett<br>aminosavak |
|----------------|--------------------------------------------------------|------------------------|
| <b>HSD11B1</b> | caa253cag                                              | Gln (NV)               |
| <b>HSD11B2</b> | <b>gtg148ttg</b>                                       | <b>Val148Leu</b>       |
| <b>SRD5A1</b>  | cgg30cgc                                               | Arg (NV)               |
|                | ccg103cca                                              | Pro (NV)               |
|                | gca116gcg                                              | Ala (NV)               |
|                | aca190acg                                              | Thr (NV)               |
|                | gcg29ccg                                               | Ala29Pro               |
| <b>SRD5A2</b>  | <b>gta89cta</b>                                        | <b>Val89Leu</b>        |
| <b>DHEA-ST</b> | agc90acg                                               | Ser90Thr               |
|                | gtg158gtc                                              | Val (NV)               |
|                | cta159gta                                              | Leu159Val              |
| <b>HSD17B2</b> | gga14gca                                               | Gly14Ala               |

**10. táblázat: A szteroidhormonok metabolizmusában szereplő enzimek génjeiben észlelt kódoló szekvenciákat érintő variánsok.** A vastagon szedett variánsokat már leírták. NV (nincs változás): nem eredményez aminosavcserét

A tesztoszteron-dihidrotesztoszteron átalakulásban alapvető funkciójú 5-alfa reduktáz 2-es típusában egyetlen, már ismert variánst (Val89Leu) találtunk, amit a prosztata carcinomára vonatkozó hajlammal [324, 325], illetve a polycystás ovarium szindrómával [326] is összefüggésbe hoztak.

A szteroidhormonok bioszintézisében és metabolizmusában szereplő enzimek génjeinek szekvenciavariánsai a farmakogenetika fontos fejezetét képezik. Több betegség kialakulásában és kezelésében is fontosak lehetnek, ezért felderítésük fontos. *In silico* vizsgálatunkban több, már leírt variáns mellett számos újat találtunk, amelyek közül populációgenetikai vizsgálatokban eddig kettőt igazoltak.

Az *in silico* azonosított variánsok további vizsgálata keretében egyrészt ezek populációgenetikai megerősítése lenne szükséges, másrészt biológiai jelentőségük vizsgálatához közelebb vihetnek a háromdimenziós fehérjemodellezési módszerek. A következőkben ismertetendő *in silico* azonosított glükokortikoidreceptor variánsok potenciális jelentőségét e módszerrel vizsgáltuk.

### 5.7.2. Glükokortikoidreceptor (GR)

A kortizol sokrétű hatásait a glükokortikoidreceptoron keresztül fejti ki. A glükokortikoidreceptor mutációi állnak a ritkán előforduló glükokortikoidrezisztencia hátterében. A betegek többségében magas vérnyomás, fáradtság, valamint androgén illetve mineralokortikoid túltermelés tünetei figyelhetők meg. A mutációk mellett több polimorfizmus is ismert a glükokortikoidreceptor génben [173, 327].

A glükokortikoidreceptor a mellékvesekéreg-daganatok patogenezisében is szerepet játszhat. Klinikánk endokrin munkacsoportja írta le, hogy a glükokortikoidreceptor (GR) két izoformája (alfa és béta) nagyobb mértékben fejeződik ki a jóindulatú kortizoltermelő adenomákban az ép szövetekhez és hormonálisan inaktív adenomákhoz képest [328]. A jóindulatú mellékvesekéreg-daganatokhoz képest a rosszindulatú daganatok GR kifejeződése fokozott mértékű [231]. Klinikánk endokrin munkacsoportjának egy másik megfigyelése szerint az GR ismert Asn363Ser (N363S) polimorfizmusának előfordulási gyakorisága a kétoldali mellékvesekéreg-adenomában szenvedő betegekben szignifikánsan nagyobb az egészségesekhez és az egyoldali adenomát hordozókhoz képest [329].

Mindezen megfigyelések a glükokortikoidreceptor és glükokortikoid hatás patogenetikai jelentőségére utalhatnak a mellékvesekéreg-daganataiban, bár ezek molekuláris mechanizmusa nem tisztázott. A glükokortikoidok immun-neuroendokrin kölcsönhatásokban betöltött kitüntetett szerepére tekintettel, a glükokortikoidreceptor variánsainak is fontos szerepe lehet a glükokortikoidok immunológiai hatásaiban.

A glükokortikoidreceptor kilenc exonból épül fel. Az alfa és béta izoforma a 9. exonban különbözik (9 $\alpha$  és 9 $\beta$ ). A kortizol elsősorban a GR $\alpha$  izoformán keresztül fejti ki hatásait, míg a GR $\beta$  inkább gátló hatású, bár újabb adatok transzkripciót aktiváló hatásaira is utalnak [330]. *In silico* vizsgálatunkban a glükokortikoidreceptor exonjait, intronjait, a glükokortikoidreceptor  $\alpha$  és  $\beta$  mRNS-ét vizsgáltuk eddig ismeretlen szekvenciavariánsok felderítése céljából.

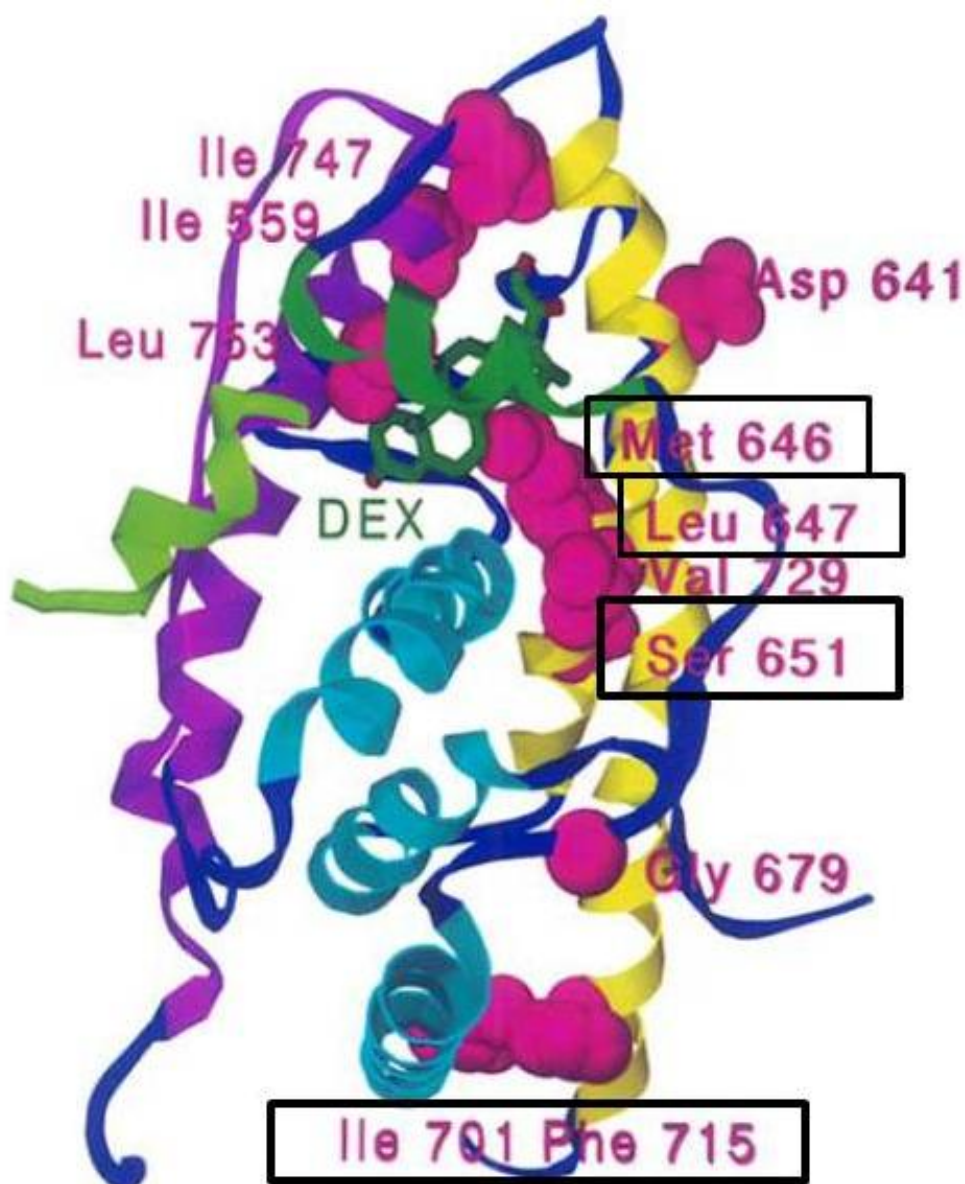
| Szekvenciavariáns | Érintett aminosav   | Érintett exon                    |
|-------------------|---------------------|----------------------------------|
| <b>CAC→CAT*</b>   | <b>His588 (NV)*</b> | <b>Exon 6</b>                    |
| ATG→ACC           | Met646Thr           | Exon 7                           |
| CTG→CCG           | Leu647Pro           | Exon 7                           |
| TCT→TAT           | Ser651Tyr           | Exon 7                           |
| <b>GAC→GAT*</b>   | <b>Asp678 (NV)*</b> | <b>Exon 8</b>                    |
| GGT→GGG           | Gly679 (NV)         | Exon 8                           |
| ATT→CTT           | Ile701Leu           | Exon 8                           |
| TTT→TGT           | Phe715Cys           | Exon 8                           |
| <b>AAT→AAC*</b>   | <b>Asn766 (NV)*</b> | <b>Exon 9<math>\alpha</math></b> |

**11. táblázat: A glükokortikoidreceptor kódoló szekvenciáinak *in silico* vizsgálatával azonosított variánsai** (NV: aminosavcserét nem eredményező variáns). A vastagon szedett variánsokat már leírták.

A kódoló szakaszokon 8 szekvenciavariánst találtunk (**11. táblázat**), ezek közül három, aminosavcserével nem járó csendes polimorfizmus már ismert volt (His588His, Asp678Asp és Asn766Asn). Valamennyi szekvencia variáns a fehérje hormonkötő régióját befolyásolta. A Gly679Gly csendes szekvencia variáns ugyanazon kodont érinti, mint egy már leírt glükokortikoid-rezisztenciával társított mutáció (Gly679Ser).

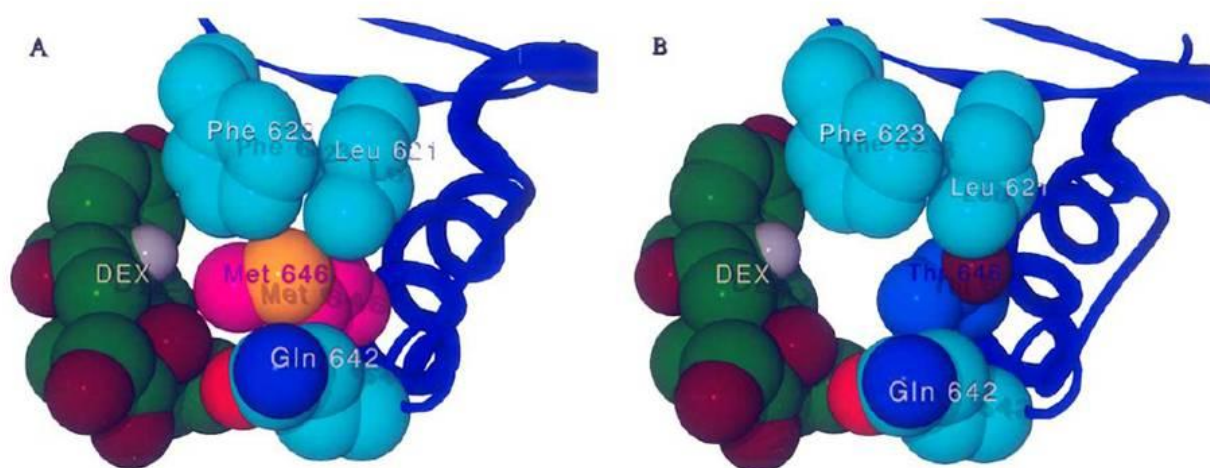
A glükokortikoidreceptor hormonkötő részének háromdimenziós szerkezetét 2002-ben közölték [331], valamint a ligand (dexametazon) és receptor antagonist (RU468) kötésére bekövetkező változásokat is leírták [332]. Ezzel lehetővé vált a mutációk és variánsok következtében beálló térszerkezeti változások háromdimenziós modellezése, amit az aminosavcserével járó variánsok esetén vizsgáltunk.

A **30. ábra** a glükokortikoidreceptor hormonkötő részének szalagdiagramját mutatja néhány ismert, glükokortikoid-rezisztenciát okozó mutáció és *in silico* variánsaink feltüntetésével.



**30. ábra:** A glükokortikoidreceptor hormonkötő részének sematikus ábrája (szalagdiagram – *ribbon diagram*). A bekeretezett aminosavak *in silico* azonosított variánsok, a többi jelölt aminosavat glükokortikoid-rezisztenciát okozó mutációk érintik.

A háromdimenziós modellezés alapján az *in silico* azonosított Met646Thr variáns közvetlenül a ligand (dexametazon) kötését érintheti. A metioninhez képest kisebb méretű treonin a ligandkötő zsebet kevésbé tölti ki, ami csökkent hormonkötéshez vezethet (**31. ábra**). A patkány glükokortikoidreceptorban a humán 646-os metioninnak megfelelő 664-es metionint *in vitro* mutagenezissel vizsgálták, és ennek treoninra cserélése a receptor hormonkötési képességét jelentősen megváltoztatta [333]. Mindezen adatok e variáns funkcionális jelentőségét jelezhetik.



**31. ábra:** A világosbarnával jelzett 646-os metionin közvetlen kapcsolatban áll a sötétzöld és sötétvörös színekkel jelölt dexametazonnal (A). A késsel jelölt treonin csak részben tölti ki a ligandkötő zsebet, ami csökkent hormonkötést vonhat maga után (B).

A 646-os metionin mellett elhelyezkedő leucin (Leu647) a hormonkötő régió melletti hidrofób zseb felépítésében fontos, így a Leu647Pro *in silico* variáns prolinja e zseb felépítését zavarhatja.

*In silico* vizsgálataink során ugyanazon csírasejtes nukleotidszekvenciában észleltük az Ile701Leu és a Phe715Cys variánsokat. Ezen aminosavak a hormonkötő régióval szemben helyezkednek el és a ligand stabilitásának biztosításában játszhatnak szerepet. Amennyiben e variánsok valóban léteznek és nem szekvenálási hibákból származnak, a glükokortikoidreceptor működését alapvetően befolyásolhatják. A Ser651Tyr funkcionális következményei nem világosak, mivel ez a fehérje felszínén helyezkedik el másik 12 tirozinnal egyetemben, így lehetséges, hogy nem okoz működési zavart.

Mindazonáltal hangsúlyoznom kell, hogy *in silico* eredményeink biológiai jelentőségének megerősítése kísérletes vizsgálatokat igényelne.

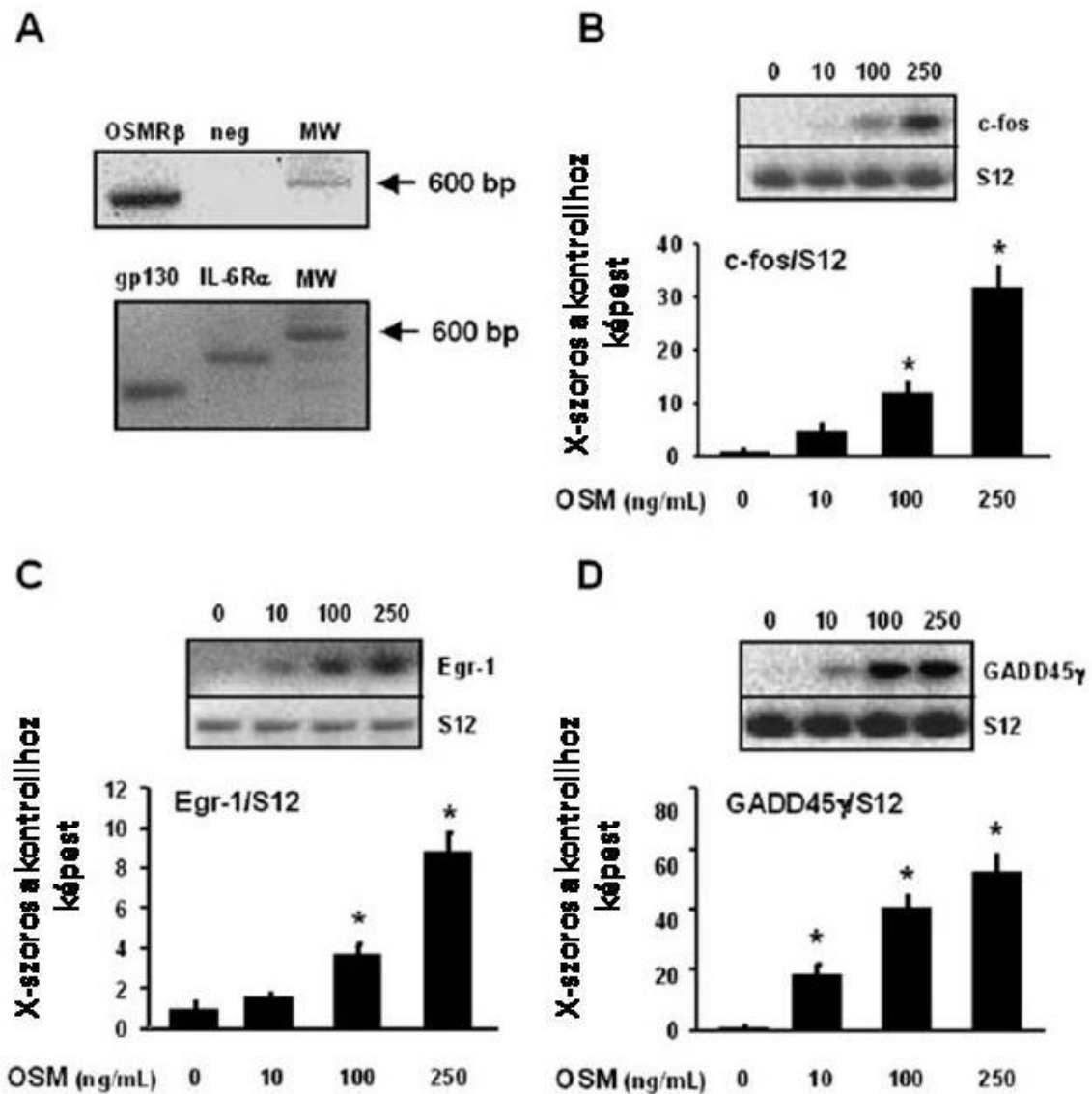
## 5.8. Citokinek és receptoraik kifejeződésének vizsgálata hypothalamikus GnRH-neuronokban: az oncostatin M (OSM) hatásai

Az immun-neuroendokrin kölcsönhatások vizsgálata keretében tanulmányoztam a hypothalamikus GnRH-neuronok citokin és citokinreceptor expressziós mintázatát, mivel ez vizsgálatunkat megelőzően nem volt ismert. A reproduktív tengely (hypothalamus-hypophysis-gonádok) aktivitása számos betegségben lecsökken (pl. fertőzések, daganatos betegségek) és ebben a citokinek is szerepet játszanak. A proinflammatorikus citokinek (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) több ponton is befolyásolhatják a reproduktív tengely működését, azonban a különböző kísérleti rendszerekben tett megfigyelések között számos eltérés figyelhető meg, így nehéz egységes képet kialakítani [92].

**Elsőként vizsgáltuk közvetlenül a hypothalamikus GnRH-neuronok citokin és citokinreceptor expressziós mintázatát.**

E neuronok vizsgálata nehéz, mivel elszórtan helyezkednek el a hypothalamusban és ezért közvetlen vizsgálatuk elsősorban sejtenyészetek révén lehetséges. E munkámat Svájcban végeztem, ahol kondicionális immortalizáció technikájával állítottak elő egy új sejtvonalat. E sejtvonal (GnV-4) a Tet-On rendszer felhasználása következtében csak tetraciklin (doxiciklin) jelenlétében osztódik, annak hiányában differenciálódik és az ép GnRH-neuronokhoz nagyban hasonló fenotípust vesz fel [97, 98].

Első lépésben a GnV-4 sejtvonal citokin és citokinreceptor expresszióját mRNS szinten kvalitatív RT-PCR-rel vizsgáltuk. Vizsgálatainkat azon citokinekre és receptorokra összpontosítottuk, amelyek jelentőségét az immun-neuroendokrin kölcsönhatásokban más kísérleti rendszerekben már kimutatták [109]. Vizsgáltuk az IL-1 és IL-6 citokincsalád receptorait, az IL-2 receptor alegységeit és az IL-10 receptorát. Kimutattuk, hogy GnV-4 sejtek kifejezik az **IL-1 mindkét receptorának (IL-1R1 és IL-1R2) és a jelátvitelhez szükséges járulékos fehérje mRNS-ét (IL-1 receptor accessory protein, IL-1Rap), az IL-2 receptor  $\gamma$  alegységét, valamint az IL-6 receptorcsalád közös gp130 jelátviteli alegységét, valamint az IL-6 és oncostatin M (OSM) receptorát (OSMR $\beta$ ) (32. ábra A)**. Érdekes módon, az IL-6 családba tartozó és ismert központi idegrendszeri funkciókkal rendelkező ciliáris neurotrofikus faktor (CNTF) és leukémia inhibitoros faktor (LIF) receptorait nem észleltük [110].



**32. ábra:** Az OSMR $\beta$ , gp130 és IL-6R $\alpha$  mRNS expressziójának kimutatása kvalitatív RT-PCR-rel (A). Az OSM hatása a korai gének kifejeződésére (B-D) szemikvantitatív RT-PCR alapján az S12 riboszomális fehérje mRNS-éhez viszonyítva. \*:  $p < 0,05$ , bp: bázispár, MW: molekulatömeg marker. ( $n=3$ )

Az IL-1 receptorok és a jelátvitelhez szükséges IL-1Rap együttes kifejeződése arra utal, hogy az IL-1 hatásához szükséges fehérjék jelen lehetnek a hypothalamikus GnRH-neuronokon. Korábbi *in vivo* eredmények az IL-1 $\beta$  GnRH expressziót befolyásoló hatására utalnak [334], és eredményeink ennek molekuláris hátterét igazolhatják. Természetesen az mRNS szintű eredmények fehérjeszintű megerősítése szükséges.

A citokinek közül az IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist (IL-1RN), IL-6 és OSM mRNS kifejeződését vizsgáltuk, de csak az IL-6-ét találtuk meg. Az IL-6 és az IL-6 receptor

mindkét alegységének (gp130 + ligandspecifikus alegység) együttes jelenléte autokrin szabályozás lehetőségét veti fel, amit már korábbi eredmények alapján is feltételeztek [105].

**A receptorok közül az OSM receptorának expressziója tűnt a legérdekesebbnek,** mivel ennek központi idegrendszeri kifejeződéséről eddig kevés adat volt: kismértékű expresszióját számos agyterületen észlelték, de legmagasabb mértékben a bulbus olfactoriusban fejeződött ki [335, 336]. Mivel a hypothalamikus GnRH-neuronok is az olfactoricus plakod területéről származnak, e megfigyelés fejlődéstani szempontból is érdekes lehet [96, 337].

Emberben az OSM kétféle receptorhoz kötődhet. Az 1-es típusú OSM receptor egyben a LIF receptora is, míg a 2-es típusú receptort az OSM-re specifikus OSMR $\beta$  alkotja a gp130 közös jelátviteli alegységgel közösen. Rágcsálókban csak a 2-es típusú receptor köti az OSM-et [108]. Mivel a patkány eredetű GnV-4 sejtvonalban a LIF receptort egyébként sem mutattuk ki, az OSM hatásai csak a 2-es típusú receptoron keresztül jöhetnek létre.

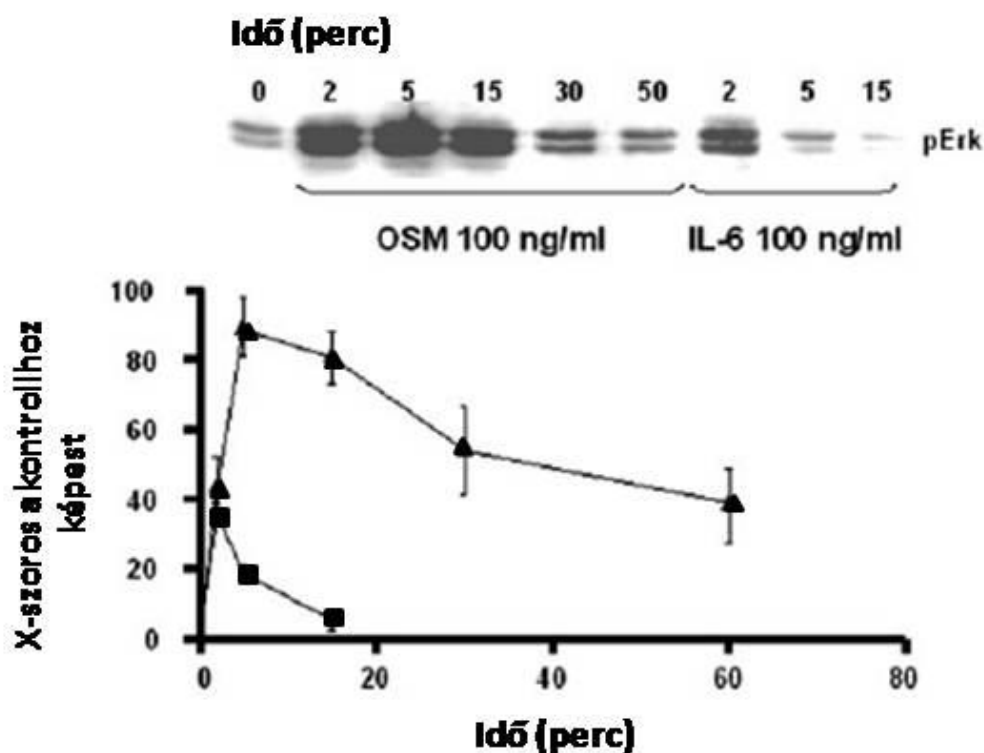
Az OSM számos hatását írták le a gyulladás, vérképzés, máj regenerációs folyamatainak szabályozásában, potenciális endokrin jelentőségéről azonban csak kevés megfigyelést közöltek. Az OSM serkenti az agyalapi mirigy ACTH [338] és a méhlepény humán chorion gonadotropin (hCG) elválasztását [339], valamint Sertoli-sejteken autokrin növekedési faktorként is szóbajön [340].

A továbbiakban az OSM funkcionális jelentőségét vizsgáltuk. Első lépésben az OSM kezelés korai gének kifejeződésére kifejtett hatását vizsgáltuk szemikvantitatív RT-PCR-rel. 30 perces kezelések során az OSM dóziszfüggően serkentette a *c-fos* (**32. ábra B**), az *Egr-1* (*early growth response-1/korai növekedési válasz 1 gén*) (**32. ábra C**), a *GADD45 $\gamma$*  (*growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma/növekedés gátlás és DNS-károsodás indukálta 45 gamma gén*) (**32. ábra D**) és az *MKP-1* (*mitogén aktiválta kináz foszfataz 1*) gének kifejeződését. Ezek közül a *c-fos* és a *GADD45 $\gamma$*  kifejeződését serkentette a legnagyobb mértékben. A szintén vizsgált *Myd118* (másnéven *GADD45 $\beta$* ) gén kifejeződését az OSM kezelés nem befolyásolta. A *c-fos* kifejeződésének fokozódását az idegsejtek általánosan elismert aktivációs jelének tekintik [341, 342]. Az *Egr-1* a sejtosztódás és apoptózis szabályozásában játszik szerepet [343]. Az OSM máj és simaizom sejtekben serkentette a *c-fos* és *Egr-1* kifejeződését [344-346]. A GADD45 fehérjecsald tagjai a genom stabilitásának fenntartásában és a DNS-károsodásra adott válaszban játszanak szerepet [347, 348], és ezek OSM általi serkentését más sejtvonalon (NIH3T3) már igazolták [349]. Az OSM az idegsejtek

apoptózisában szerepet játszhat, ami felveti, hogy egyes neurodegeneratív kórképekben (pl. HIV encephalopathia) patogenetikai tényező lehet [350].

Mindezen megfigyelések arra utalnak, hogy az **OSM kezelés hatására a hypothalamikus GnRH-neuronok aktiválódnak és az OSM alapvető sejtosztódási, differenciálódási és apoptózisban fontos mechanizmusokat is befolyásolhat.**

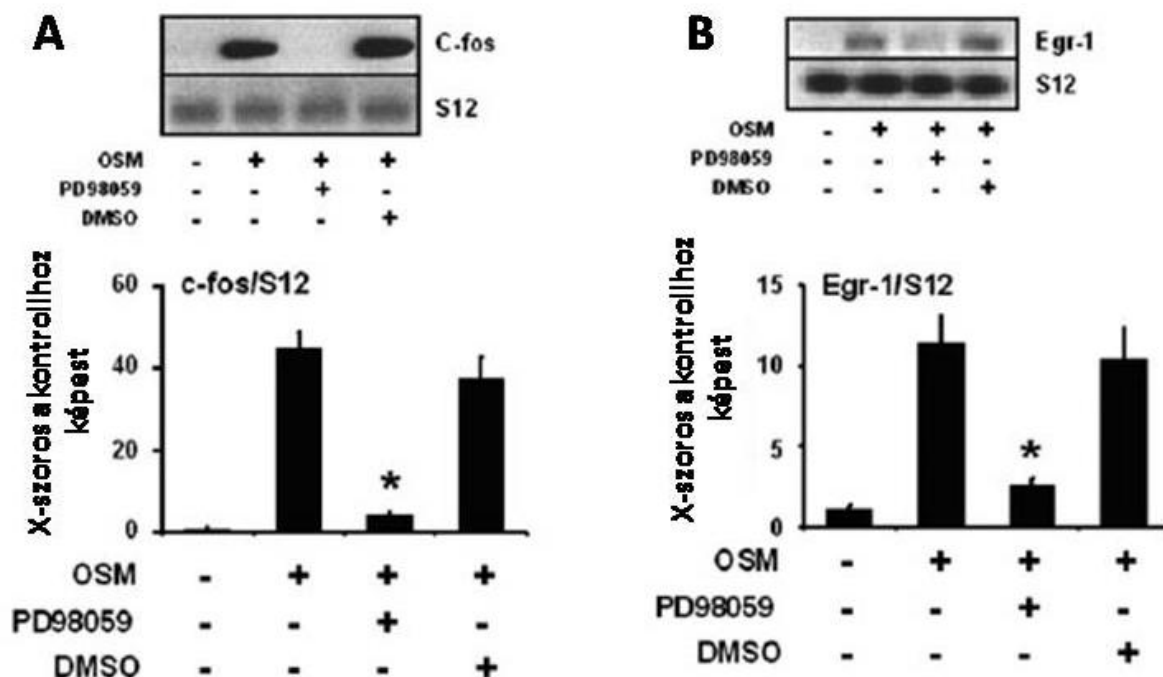
A korai gének közül a *c-fos*, *Egr-1* és *MKP-1* aktivációját is kapcsolatba hozták más sejttípusokon a mitogén aktiválta protein kináz (MAPK) jelátviteli úttal. Vizsgáltuk ezért az OSM és az IL-6 a MAPK jelátviteli útra kifejtett hatását. Az OSM szignifikánsan serkentette a MAPK Erk1/2 foszforilációját és hatása sokkal erősebb volt és tovább tartott, mint az azonos koncentrációban alkalmazott IL-6-é. (**33. ábra**). (Az OSM és az IL-6 móltömege közel azonos, ezért 100 ng/ml-es koncentrációjuk közel azonos moláris koncentrációt eredményez.)



**33. ábra: Az OSM és IL-6 hatásai az Erk foszforilációjára.** A felső panel egy jellemző kvalitatív Western-blotot mutat be. Az alsó panelen a densitometriai eredményeket mutatom be: a háromszögekkel jelölt görbe az OSM, a négyzetekkel jelölt az IL-6 hatását mutatja ( $n=4$ ).

Az *MKP-1* terméke a MAPK jelátviteli út negatív szabályozásában játszik szerepet [351], és OSM általi serkentése negatív visszacsatolás lehetőségére utal.

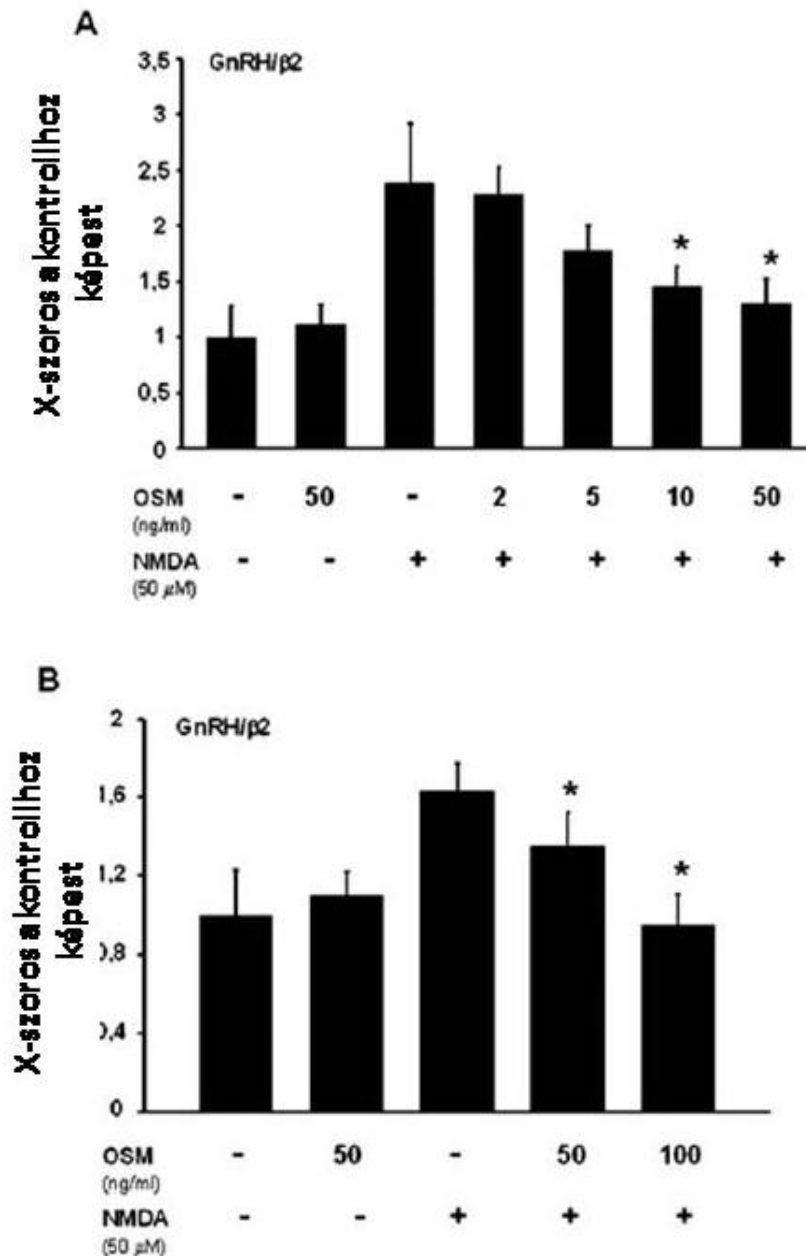
A MAPK jelátviteli út jelentőségének további vizsgálata keretében, az Erk1/2 aktivációt specifikusan gátló PD98059 jelenlétében is tanulmányoztuk az OSM korai gének aktivációjára kifejtett hatását. A PD98059 teljesen meggátolta az OSM *Egr-1* és *c-fos* mRNS expresszióra kifejtett hatását, ami igazolja a MAPK jelátviteli út jelentőségét e két korai gén serkentésének folyamatában (34. ábra).



**34. ábra: Az OSM korai gének kifejeződését serkentő hatását az Erk1/2 gátló PD98059 szignifikánsan gátolja.** A GnV-4 sejteket 1 órán át előkezeltük 50  $\mu$ M PD98059-el, majd 30 perces OSM kezelésnek (250 ng/ml) vetettük alá. A felső panelek jellemző kvalitatív RT-PCR eredményeket mutatnak (agaróz gél elektroforézis képe), míg az alsó paneleken a denzitometria során kvantifikált eredményeket mutatom be az S12 riboszomális fehérje mRNS-éhez viszonyítva. \*:  $p < 0,05$ , DMSO: dimetil szulfoxid (szolvens kontroll). ( $n=3$ )

Mai ismereteink szerint a hypothalamikus GnRH-neuronok elsődleges és talán egyetlen élettani feladata a GnRH elválasztása. Az OSM GnRH mRNS expresszióra kifejtett hatását valós idejű qRT-PCR-rel vizsgáltuk mind a GnV-4 sejteken, mind primer magzati patkány hypothalamus sejt kultúrákon. Az OSM önmagában nem befolyásolta a GnRH mRNS kifejeződését, azonban **az N-metil-D-aszpartát (NMDA, 50  $\mu$ M) indukálta GnRH mRNS expresszió növekedést dóziszfüggően, hatékonyan gátolta.** A glutamát receptor agonista NMDA a GnRH kifejeződés egyik leghatékonyabb serkentője [352]. A maximális, 70 %-os

gátlást a GnV-4 sejteken 50 ng/ml-es OSM koncentrációnál, míg a primer főtális hypothalamus tenyészeteken 100 ng/ml-es koncentrációnál érték el. **(35. ábra)** E különbségben közrejátszhat, hogy a GnV-4 sejtvonal a hypothalamikus GnRH-neuronszerű sejtek szintényszete, míg a primer hypothalamikus tenyészetek kevert sejt kultúrák.



**35. ábra:** Az OSM dóziszfüggően gátolja az NMDA indukálta GnRH mRNS expressziót 6 órák kezelése során. Valós idejű qRT-PCR eredmények. A GnRH expressziót a β2-mikroglobulinhoz, mint belső kontrollhoz viszonyítottuk. GnV-4 sejtek (A) (n=6), magzati patkány hypothalamikus tenyészetek (B) (n=6).

Eredményeink szerint az OSM szerepet játszhat a GnRH-neuronok működésének szabályozásában és akár bizonyos betegségek, ill. stresszhelyzetek hatására bekövetkező **reproduktív aktivitás csökkenésében is**. A citokinek reproduktív tengelyre kifejtett hatásaiban ezek szerint közvetlen GnRH-neuronokra kifejtett hatások is szerepet játszanak, de ezek igazolásához *in vivo* vizsgálatok is szükségesek lennének.

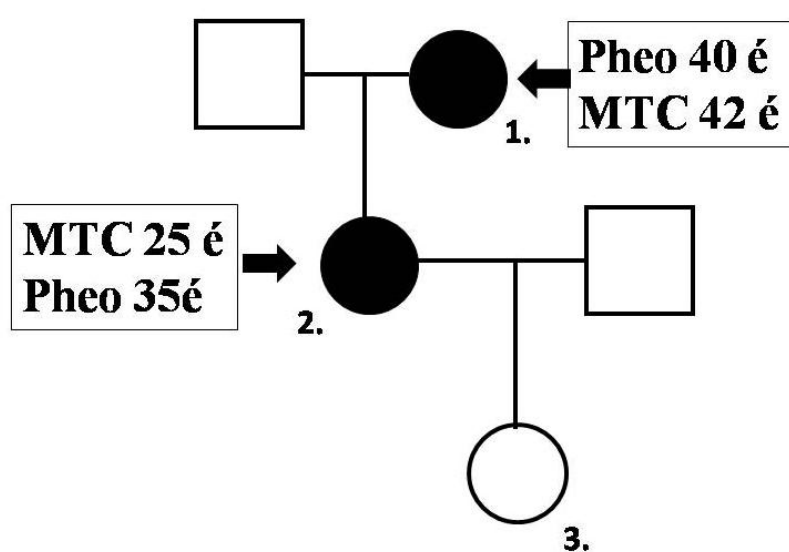
A citokinek és így az OSM hatása is alapvetően parakrin jellegű. Az OSM fő forrásai a periférián az aktivált T- és mononukleáris sejtek [353], azonban a központi idegrendszerben is termelődhet a microglia révén [354], sőt az agy gyulladásos elváltozásai [355] és daganatok (gliomák) [356] is termelhetik. Mindezek alapján elképzelhető, hogy egyes központi idegrendszeri gyulladásos és daganatos betegségek következtében helyileg termelődő OSM a hypothalamikus GnRH elválasztás befolyásolásán keresztül a reproduktív aktivitást módosíthatja.

## 5.9. Multiplex endokrin neoplasia 2A típusában (MEN2A) szenvedő betegek vizsgálata

### 5.9.1. A SE ÁOK II. Belgyógyászati Klinikán elsőként igazolt MEN2A család esete

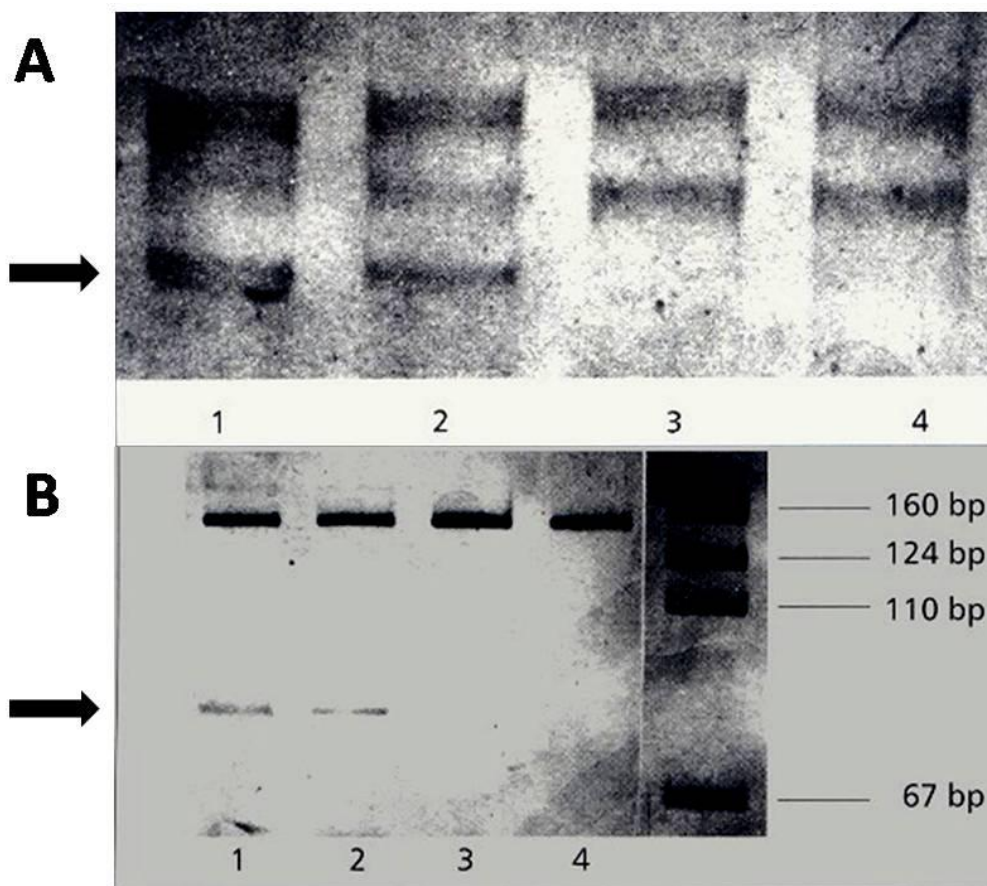
A Semmelweis Egyetem ÁOK II. Belgyógyászati Klinikán az elsők között végeztünk hazánkban genetikai vizsgálatot medulláris pajzsmirigyrák (MTC), phaeochromocytoma (Pheo) és primer hyperparathyreosis kialakulására hajlamosító MEN2A szindróma igazolására. Ennek során 1998-es hamburgi tanulmányutam (Dr. Wolfgang Höppner, Institut für Hormon und Fertilitätsforschung) során elsajátított módszert használtunk. A jelenleg laboratóriumunkban is alkalmazott PCR reakciót követő direkt szekvenálással szemben első vizsgálataink során az exonokra specifikus PCR reakció után egyláncú DNS konformációs vizsgálatot (single strand conformational polymorphism, SSCP) használtunk a mutációk szűrésére, majd restrikciós enzimemésztést egyes mutációk igazolása céljából [183].

Az elsőként közölt esetünkben a család elsőként vizsgált (index eset) tagjánál 40 éves korában medulláris pajzsmirigyrák igazolódott és teljes thyreoidectomya történt. 2 évvel később phaeochromocytoma miatt műtötték. Az index eset lányánál 25 éves korában metasztatizáló medulláris pajzsmirigyrákra derült fény, ami miatt teljes thyreoidectomya és nyaki blokk disszekció történt. 10 évvel később kétoldali phaeochromocytoma is kialakult. A családfát a **36. ábra** mutatja be.



**36. ábra:** A II. Belgyógyászati Klinikán genetikai vizsgálattal elsőként diagnosztizált MEN2A család családfája. A fekete szimbólumok a betegeket, az üresek az egészségeseket jelzik. Kör: nők, négyzet: férfiak.

A molekuláris genetikai vizsgálatok során elsőként a MEN2A-ban leggyakrabban érintett *RET* 11-es exon PCR amplifikációját végeztünk, majd SSCP következett (**37. ábra A**). Ennek során a két érintett családtag mintájában egy alsó, harmadik futtatási csík jelenléte jelzi a heterozigóciát. Az SSCP képe alapján felmerült TGC634TAC (aminosavszinten Cys → Tyr) mutáció igazolásához restriktós enzimemésztést végeztünk, mivel a mutáció egy *Rsa1* hasítóhelyet hoz létre, ami a vad típusú DNS-ben hiányzik (**37. ábra B**). Mindkét érintettben igazoltuk a mutációt. Az unokában mutációt nem találtunk, így MEN2A irányú gondozása nem szükséges.



**37. ábra:** A: SSCP eredménye a TGC634TAC mutációt hordozó család genetikai vizsgálata során. B: *Rsa1* restriktió enzim emésztés eredménye. Az 1-2. mintában látható alsó többletcsíkok (nyilak) a heterozigóciát jelzik. A minták számai a családfa jelzéseinek felelnek meg. 1-2. betegek, 3. egészséges unoka, 4. kontroll.

A TGC634TAC mutáció a MEN2A szindrómát okozó egyik leggyakoribb *RET* protoonkogén mutáció [66].

### 5.9.2. Új klinikai fenotípusok MEN2A szindrómában

A multiplex endokrin neoplasia 2A típusában több geno-fenotípus összefüggést írtak le. Az alábbiakban két általunk leírt új fenotípust ismertetek.

#### 5.9.2.1. Phaeochromocytoma előfordulása a RET protoonkogén 10-es exon 609-es kodon mutációja esetén

A multiplex endokrin neoplasia szindrómák diagnózisára és gondozására vonatkozó 2002-ben közölt nemzetközi irányelvek szerint a geno-fenotípus összefüggések vizsgálatának addigi eredményei alapján a RET protoonkogén 10-es exonjában előforduló 609-es kodon mutációk nem hajlamosítanak phaeochromocytomára [66].

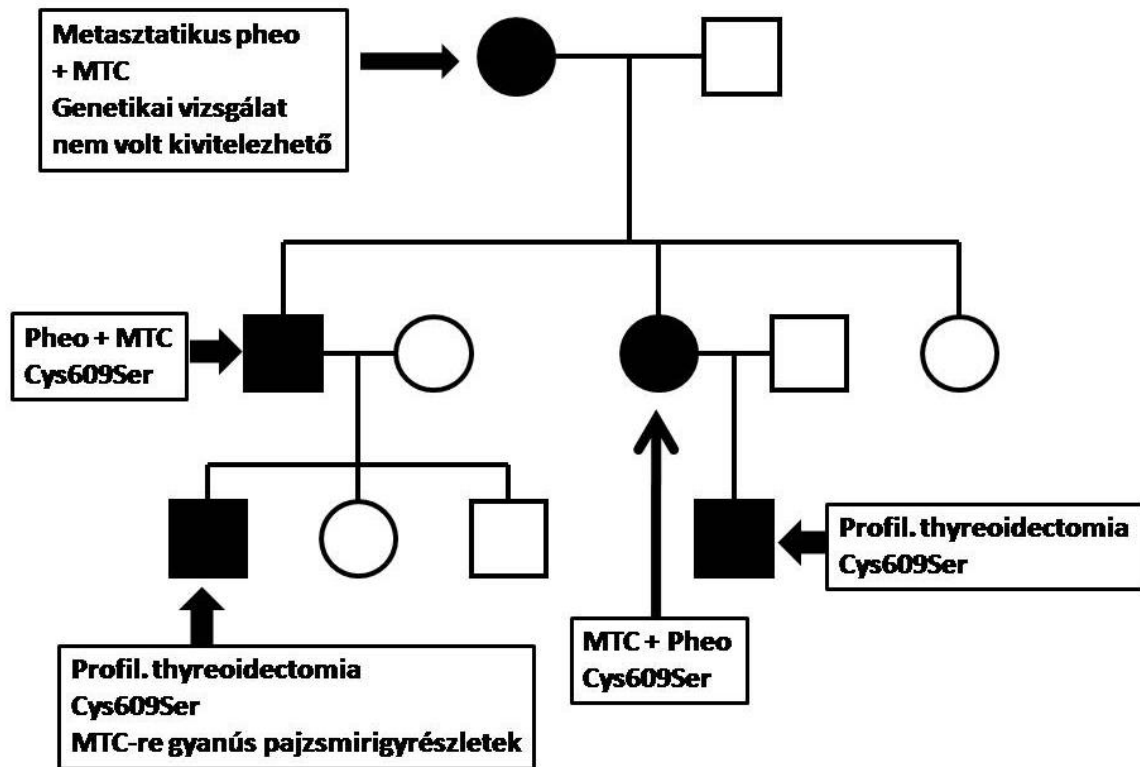
Ennek kapcsán elsőként ismertettük egy olyan magyar család esetét, ahol a TGC609TCC, aminosavszinten Cys→Ser cserét eredményező mutáció phaeochromocytomával társult.

Az elsőként vizsgált egyénnél (index eset) 48 éves korában phaeochromocytomát diagnosztizáltak. Sikeres adrenalectomiát követően, MEN2A szindróma gyanújával történt MTC irányú vizsgálata során a szérum kalcitonin érték jelentős emelkedettségét találtuk (780 pg/ml; normális felső határ: 11,5 pg/ml). A pajzsmirigy ultrahang vizsgálata göb jelenlétét mutatta és az ebből végzett aspirációs citológiai vizsgálat medulláris cacinoma gyanúját vetette fel, amit a teljes thyreoidectomia során eltávolított pajzsmirigy szövettani vizsgálata megerősített.

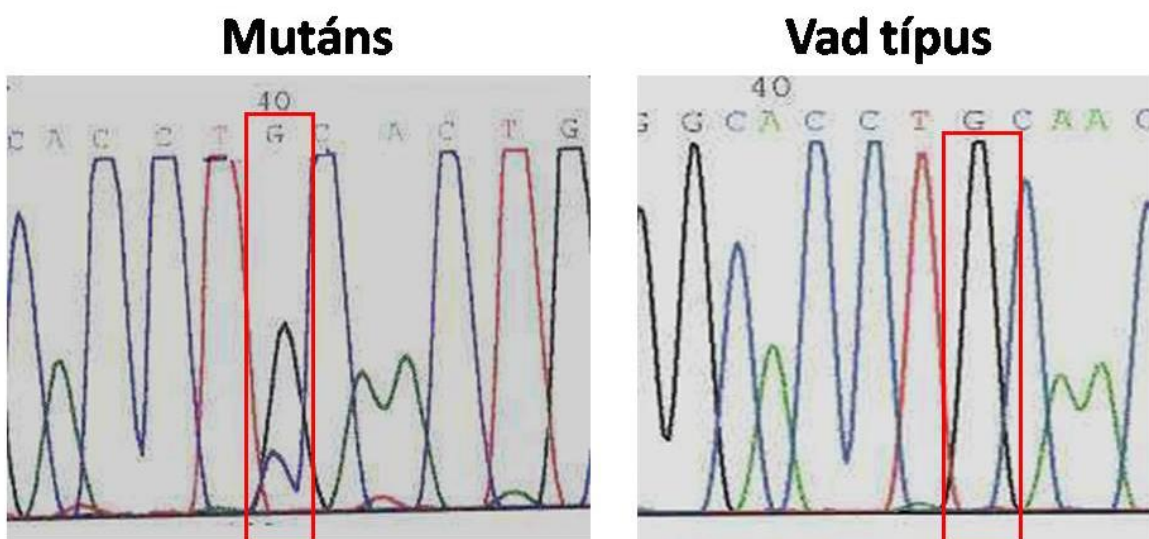
Bár a beteg édesanyjának genetikai anyaga már nem volt elérhető, anamnéziséből ismert volt, hogy 50 éves korában mellékvese kiindulású phaeochromocytoma miatt operálták, majd néhány évvel később medulláris pajzsmirigyrák miatt teljes thyreoidectomia történt. Metasztatikus phaeochromocytomában hunyt el. Rosszindulatú phaeochromocytoma előfordulása a MEN2A szindrómában nagyon ritka [67]. A családfát a **38. ábra** mutatja be. A genetikai vizsgálatot direkt szekvenálással végeztük, amelynek eredményét a **39. ábrán** mutatom be.

Az index eset gyermekeinél is genetikai vizsgálatot végeztünk. Három gyermeke közül egyik fiánál megtaláltuk a mutációt. A MEN2 szindrómában érvényes irányelvek szerint profilaktikus thyreoidectomiát végeztünk [66], és a szövettani vizsgálata során már MTC-re gyanús területeket írtak le. Phaeochromocytoma irányában további rendszeres klinikai

vizsgálata szükséges. Az index eset testvérénél és annak fiánál is kimutattuk a betegséget okozó mutációt. Testvérénél medulláris pajzsmirigyrák miatt teljes thyreoidectomia és phaeochromocytoma miatt adrenalectomia történt, míg a testvér fiában a mutáció kimutatása miatt profilaktikus thyreoidectomiát végeztettünk.



**38. ábra: A TGC609TCC (Cys609Ser) mutációt hordozó család családfája.** A fekete szimbólumok a betegeket, az üresek az egészségeseket jelzik. Kör: nők, négyzet: férfiak. Profil: profilaktikus



**39. ábra: A TGC609TCC mutáció kimutatása direkt szekvenálással**

Esetünk alapján megállapíthatjuk, hogy a **RET protoonkogén 10-es exon 609-es mutációi közül a TGC609TCC (Cys609Ser) esetében phaeochromocytoma előfordul**, tehát az ezt hordozó betegeket phaeochromocytoma irányában is szűrni kell. **A korábban vélt geno-fenotípus összefüggés eredményeink alapján nem tartható.**

#### **5.9.2.2. Bilaterális phaeochromocytoma és hyperparathyreosis előfordulása medulláris pajzsmirigyrák nélkül MEN2A szindrómában**

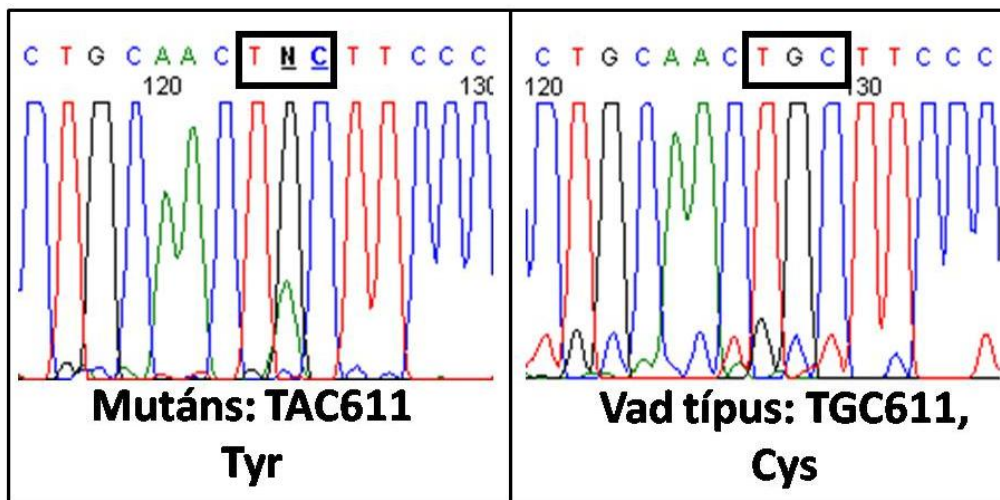
A szintén 10-es exonban előforduló TGC611TAC (Cys611Tyr) mutáció esetén egy **különös fenotípust írtunk le bilaterális phaeochromocytoma és hyperparathyreosis társulásával, ugyanakkor a MEN2A legnagyobb penetranciát mutató eltérését, a medulláris pajzsmirigyrákot a betegben nem észleltük.**

A 46 éves nőbeteg extrém fokú vérnyomáskiugrásai háttérében biokémiai és képalkotó vizsgálatokkal kétoldali phaeochromocytomát igazoltunk **(40. ábra)**. Növekedett szérumkalcium értéke primer hyperparathyreosis gyanúját keltette, amit a parathormon meghatározás alátámasztott (szérum parathormon: 165 pg/ml, referenciatartomány: 10-65). Pajzsmirigy ultrahang vizsgálat két mellékpajzsmirigy adenomára gyanús képletet írt le, azonban a pajzsmirigy állományában daganatra (medulláris pajzsmirigyrák) gyanús elváltozást nem találtunk. A beteg kalcitoninszintje csak minimális mértékben volt emelkedett (9,9 pg/ml norm. 0-9 pg/ml). Kétoldali adrenalectomiát követően vérnyomáskiugrásai megszűntek.

A kétoldali phaeochromocytoma és primer hyperparathyreosis társulására tekintettel MEN2A szindróma gyanújával genetikai vizsgálatot végeztünk, ami a RET protoonkogén 10-es exon 611-es kodon TGC611TAC (aminosavszíntén Cys→Tyr cserét eredményező) mutációját igazolta **(41. ábra)**.



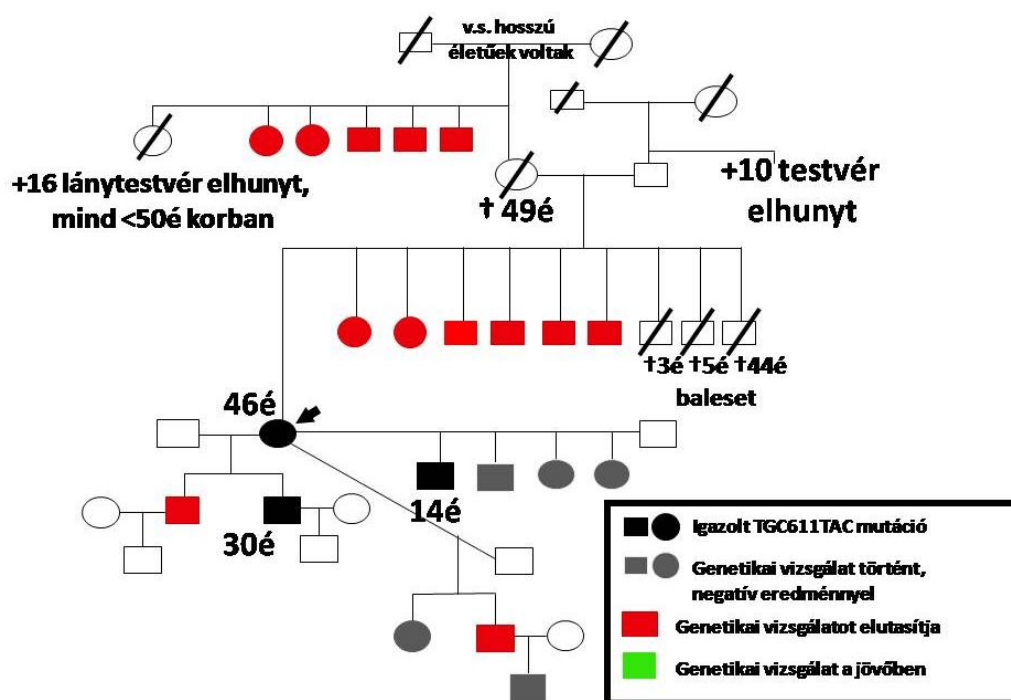
**40. ábra:** A kétoldali *phaeochromocytoma* képe natív és kontrasztos computer tomográfia (CT), valamint metajód-benzilguanidin (MIBG) szcintigráfia során.



**41. ábra:** A TGC611TAC mutáció kimutatása direkt szekvenálással.

A beteg két gyermekében is kimutattuk a mutációt, de sokgenerációs, népes családjának többsége a genetikai vizsgálatba nem egyezett bele. A családfa elemzésekor feltűnt, hogy a beteg édesanyja 49 éves korában hirtelen és annak 16 lánytestvére 50 éves kora előtt, többen közülük szintén hirtelen hunytak el, ami *phaeochromocytomával* kapcsolatos hirtelen halál lehetőségét vetheti fel (**42. ábra**).

dc\_206\_11



**42. ábra: A TGC611TAC mutációt hordozó beteg családfája. Az index esetet nyíl jelöli.**

A betegnek felajánlottuk a profilaktikus thyreoidectomiát ill. ezzel egybekötve a primer hyperparathyreosis műtéti megoldását, amibe azonban nem egyezett bele. Medulláris pajzsmirigyákra utaló eltérést a medulláris pajzsmirigyák tumormarkereinek (kalcitonin ill. carcinoembrionális antigén) és a pajzsmirigy ismételt ultrahangos vizsgálatával sem találtunk. Szintén nem utalt medulláris pajzsmirigyákra a kalcitonin stimulációs próbaként alkalmazott pentagasztrin teszt sem (0,5 µg/kg pentagasztrin adása után a szérumkalcitonin koncentráció a medulláris pajzsmirigyákra jellemző határérték (100 pg/ml) alatt maradt).

Esetünk a világon a második olyan eset, ahol a Cys611Tyr mutáció kétoldali phaeochromocytomával társul a MEN2A szindrómában legnagyobb penetranciával jellemzett medulláris pajzsmirigyák nélkül. Egy 70 holland éves nőben írtak le Cys611Tyr mellett kialakult bilaterális phaeochromocytomát, akiben sem medulláris pajzsmirigyák, sem primer hyperparathyreosis nem volt kimutatható [357]. Esetünk ugyanakkor az első, ahol a kétoldali phaeochromocytomához primer hyperparathyreosis is társult. Korábban a Cys611Tyr mutációt a medulláris pajzsmirigyák kialakulása szempontjából közepes kockázatú *RET* mutációként értékelték [66]. Esetünk és a már említett holland eset mellett egy olyan Cys611Tyr mutációt hordozó családot is leírtak, ahol a medulláris pajzsmirigyák

megjelent, de nagyon lassú progressziójú volt és nem eredményezett halálos kimenetelt [358]. A 10-es exon Cys609Ser mutációja esetén is leírtak hasonló, elsősorban phaeochromocytomára és alacsony penetranciájú medulláris pajzsmirigyákkal társuló MEN2A fenotípust [359].

Mindezek alapján állíthatjuk, hogy a **Cys611Tyr mutáció legalábbis egyes esetekben a medulláris pajzsmirigyák szempontjából az alacsony kockázatú csoportba tartozik.** Ebben számos tényező szerepet játszhat (pl. etnikai különbségek, egyéb gének eltérései, stb.) és jelenleg nem tudjuk megmagyarázni e különbség molekuláris hátterét. Másrésről a Cys611Tyr mutációt korábban a phaeochromocytoma szempontjából alacsony kockázatúnak minősítették, ugyanakkor a kétoldali phaeochromocytoma előfordulása két független esetben ennek felülvizsgálatát is indokoltá teheti [360].

### 5.10. *In silico* genomikai vizsgálatok a multiplex endokrin neoplasia szindrómák (MEN1, MEN2) génjeiben előforduló szekvenciavariánsok felderítésére

A már korábban ismertetett *in silico* módszert a MEN1 szindróma kialakulásáért felelős *MEN1* és a MEN2-ért felelős *RET* gének szekvenciavariánsainak keresésére is felhasználtuk.

A *MEN1* gén nem kódoló szakaszán 54, míg a *RET* gén nem kódoló részén 36 variánst 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 szekvenciavariánst azonosítottunk, amelyek közül az Arg77Arg és Pro785Pro aminosavcserével nem járó „csendes” (silent) variánsok. A csendes szekvenciavariánsoknak is lehet azonban kórélettani következménye amennyiben a genetikai szabályozásban fontos helyeket érintenek. A 77-es kodon mutációját már korábban leírták Hirschprung-betegségben szenvedő betegeknél (Arg77Cys) [361]. /A Hirschprung-betegség eseteinek egy részében szintén a *RET* gén mutációit mutatták ki./ Öt, már korábban közölt csendes variánst is észleltünk (Ala45Ala, Ala432Ala, Gly691Ser, Leu769Leu, Ser904Ser) [362]. (12. táblázat)

| <i>RET</i>                                                |               | <i>MEN1</i>                                               |               |
|-----------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------------------|---------------|
| Szekvenciavariáns<br>(az érintett kodon<br>száma középen) | aminosavcsere | Szekvenciavariáns (az<br>érintett kodon száma<br>középen) | aminosavcsere |
| CGC <b>77</b> CGA                                         | Arg, NV       | TTC <b>416</b> TTA                                        | Phe ⇒ Leu     |
| CCA <b>785</b> CCT                                        | Pro, NV       | CAC <b>433</b> CAT*                                       | His, NV       |
| TCC <b>904</b> CCC                                        | Ser ⇒ Pro     | TCA <b>512</b> TCT                                        | Ser, NV       |
| CGC <b>982</b> TGC                                        | Arg ⇒ Cys     | CAA <b>584</b> CCA                                        | Gln ⇒ Pro     |

**12. táblázat: A *RET* és a *MEN1* gének kódoló szakaszain talált eddig nem leírt *in silico* szekvenciavariánsok.** NV: nem eredményez aminosavcserét; \*későbbi populációgenetikai vizsgálatokban igazolták

A már leírt, aminosavcserével nem járó variánsok közül a Ser836Ser polimorfizmust a sporadikus medulláris pajzsmirigyrák kialakulásával is kapcsolatba hozták, mivel a sporadikus medulláris pajzsmirigyrákban szenvedőkben szignifikánsan gyakrabban fordult elő, mint a

kontroll népességben [362]. Munkacsoportunk vizsgált egy négy generációs, 80 tagot számláló családot, ahol a familiáris medulláris pajzsmirigyrákra (FMTC) hajlamosító *RET* protoonkogén exon 14 Val804Leu mutációja mellett a Ser836Ser variáns is előfordult. 23 családtagot vizsgáltunk, akik közül 12-ben találtuk meg a Val804Leu mutációt, háromban mind a Val804Leu mutációt és a Ser836Ser polimorfizmust és hat egyénben csak a Ser836Ser polimorfizmust. A Val804Leu mutáció és a Ser836Ser polimorfizmus különböző allélokon fordult elő. A Val804Leu mutáció következtében kialakult medulláris pajzsmirigyrák minden érintettben időskorban alakult ki, lassú progressziójú volt, és egy esetben sem járt halálos kimenetellel. A Ser836Ser polimorfizmus egyidejű jelenléte a betegség progresszióját nem befolyásolta [363].

Egy szintén 804-es kodont érintő, Val804Met mutációt vizsgáló tanulmányban két másik ismert polimorfizmus, a Gly691Ser és a Ser904Ser egyidejű jelenlétét ugyanakkor a medulláris pajzsmirigyrákra való hajlammal hozták kapcsolatba [364].

A két *in silico* azonosított, aminosavcserével járó variáns (Ser904Pro és Arg982Cys) igazolásához populációgenetikai ill. kísérletes vizsgálatok lennének szükségesek. Mindkét variáns a RET receptor tirozin kináz intracelluláris részén elhelyezkedő aminosavat befolyásol, aminek következtében –amennyiben ezen eltérések valósnak bizonyulnak – a RET fehérje jelátviteli folyamatait is befolyásolhatják. A Ser904Pro variánst egyébként egy Klinikánkon vizsgált phaeochromocytomás betegben is megtaláltuk (Dr. Patócs Attila, személyes közlés), de e betegséggel való összefüggésének bizonyításához további vizsgálatok szükségesek.

A *MEN1* génben is négy szekvencia variánst találtunk: Phe416Leu és Gln584Pro aminosavcserével járó valamint a His433His és Ser512Ser csendes variánsokat. Érdekes, hogy a His433His variánst szomatikus variánsként korábban már leírták sporadikus hypophysis daganatban, mi azonban csírasejtes variánsként észleltük [365]. E variánst *in silico* vizsgálatunk közlése után, mint tényleges polimorfizmust igazolták 1% körüli allélfrekvenciával [366, 367]. Három már ismert szekvenciavariánst (Arg171Gln, Asp418Asp, Ala541Thr) [368] is találtunk. Mivel a *MEN1* gén termékének, a meninnek térszerkezete és struktúra-funkció összefüggései még nem ismertek, e variánsok biológiai jelentőségére még nem következtethetünk.

## 6. ÖSSZEFOGLALÁS

### 6.1. Vizsgálataim eredményeinek összefoglalása, új megállapítások

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

**Mellékvese-daganatokban az 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 és a rosszindulatúság megállapítása nehéz, e mikroRNS marker gyakorlati szempontból is hasznos lehet.
3. Sporadikus benignus, öröklődő 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 felveti gyakorlati jelentőségét.

**A mikroRNS-ek biológiai jelentőségének vizsgálatára bioinformatikai elemzéseket végeztünk.**

6. Ugyanazon mintákon végzett párhuzamos mikroRNS és mRNS 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 mRNS-ek azonosítása révén szűkítettük a szóbajövő mRNS-ek körét.

A mellékvesekéreg-carcinomák 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 recidívájában 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 mRNS expressziós és citogenetikai eltérések korrelációja céljából saját vizsgálatot is végeztünk ugyanazon mintákon végzett mRNS microarray és komparatív genom hibridizáció végzésével.

8. A metaanalízis eredményei szerint mellékvesekéreg-carcinomában három fő patogenetikai utat azonosítottunk: 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 során 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 bioszintéziséért 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 sejtelei 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, valamint 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 jelzi.
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 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 (Cys609Ser) esetén.

**22B:** A *RET* protoonkogén 10-es exon 611-es kodon Cys611Tyr mutációja esetén kétoldali phaeochromocytoma és primer hyperparathyreosis társulását írtuk le medulláris pajzsmirigyák megjelenése nélkül.

## 6.2. 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 phaeochromocytomák esetében.
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.

## 7. Az értekezést megalapozó közlemények listája:

### 7.1. Idegen nyelvű folyóiratszövegek $\Sigma$ IF: 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; Pócsa 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:**  
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

## 7.2. Magyar nyelvű folyóiratcikkek:

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

**7.3. 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

#### 7.4. 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  
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, Pócs 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-Springer, New York, Austin, 1-15 old., ISBN 978-1-4419-1662-4, 2009

**7. Igaz P**

Phaeochromocytoma.

In: Az endokrin- és anyagcsere-betegségek gyakorlati kézikönyve. Leövey A, Nagy E, Paragh Gy, Rácz K (szerk.). Medicina, Budapest, 328-228 *old.*

*ISBN 978963226277 2, 2011*

**8. Rácz K; Tóth M; Igaz P**

Endokrin daganatok In: Az onkológia tankönyve, Tulassay Z (szerk.), Semmelweis Kiadó, Budapest – *MEGJELENÉS ALATT*

## 8. 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 B; 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" citokinsalád 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. Dérfalvi B; **Igaz P;** Fülöp A; Tóth 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**  
Xenotranszplantates: ¿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 apoptosusra 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**; Tobisch 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**; Rácz 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; Rácz 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;** Rácz 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,** Rácz 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; Rácz 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 HETILAP 149, 393-398  
2008
- 36. Igaz P;** Tulassay Z:  
Az autoimmun pancreatitis.  
ORVOSI HETILAP 149, 873-876  
2008
- 37. Igaz P;** Szücs N; Rettegthy 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; Rác 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; Rác K; Fekete G  
Profilaktikus thyreoidectomia gyermekkorban  
GYERMEKGYÓGYÁSZAT 59, 109-113  
2008
  
42. **Igaz P;** Rác K:  
Carcinoid tumorok: sokszínű megjelenés és kezelési lehetőség  
LEGE ARTIS MEDICINAE, 19, 493-495  
2009
  
43. **Igaz P;** Rác K; Tulassay Z  
Az elhízás gyógyszeres kezelése.  
MAGYAR BELORVOSI ARCHÍVUM 62, 5-8  
2009
  
44. Pregun I; Gergics P; Dabasi G; **Igaz P;** Rác 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; Rác K; Tulassay Z:  
A szomatostatin analóg kezelés eredményei akromegáliában  
ORVOSI HETILAP 150, 1457-1462  
2009
  
46. Reismann P; Likó I; **Igaz P;** Patócs A; Rác 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; Rác 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; Tóke J; Szilágyi Á; 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; Tóke 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 szomatostatin-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  
szomatosztafinanalóg-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 $\beta$  pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas  
PITUITARY, 14, 112-124  
2011 **IF (2010): 2,282**

**Szerkesztőségi hosszászólás**

**Igaz P**, Müllner K, Hargitai B, Igaz I, Tömböl Z, Rácz K, Tulassay Z:  
Marked chromogranin A elevation in a patient with bilateral adrenal incidentalomas, and its rapid normalization after discontinuation of proton pump inhibitor therapy.  
[Letter to the Editor]  
CLIN ENDOCRINOL 67, 805-806.  
2007

**9. Scientometriai mutatók:**

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

**Az összes folyóiratcikk kumulatív impakt faktora ( $\Sigma IF$ ): 92,635**

**A PhD fokozat (1999) megszerzését követően megjelent közlemények  $\Sigma IF$ -e: 87,277**

**Az első szerzős impakt faktoros közlemények száma: 13,  $\Sigma IF$ : 29,749**

**Az utolsó szerzős impakt faktoros közlemények száma: 6,  $\Sigma IF$ : 21,567**

**Az első és utolsó szerzős folyóiratcikkek kumulatív impakt faktora ( $\Sigma IF$ ): 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**

## 10. Az értekezésben hivatkozott közlemények:

1. **Koch CA, Pacak K, Chrousos GP (2002):** The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. J Clin Endocrinol. Metab.; 87: 5367-5384.
2. **Libè R, Fratticci A, Bertherat J (2007):** Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. Endocr Relat Cancer; 14: 13-28.
3. **Karagiannis A, Mikhailidis DP, Athyros VG, Harsoulis F (2007):** Pheochromocytoma: an update on genetics and management. Endocr Relat Cancer; 14: 935-956.
4. **Chrisoulidou A, Kaltsas G, Ilias I, Grossman AB (2007):** The diagnosis and management of malignant phaeochromocytoma and paraganglioma. Endocr Relat Cancer; 14: 569-585.
5. **Bertherat J, Bertagna X (2009):** Pathogenesis of adrenocortical cancer. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. 2009;2-3: 261-271.
6. **He L, Hannon GJ (2004):** MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet, 5: 522-531.
7. **Barbarotto E, Schmittgen TD, Calin GA (2008):** MicroRNAs and cancer: profile, profile, profile. Int J Cancer, 122: 969-977.
8. **Neumann HP, Bausch B, McWhinney SR, Bender BU, Gimm O, Franke G, Schipper J, Klisch J, Althoefer C, Zerres K, Januszewicz A, Eng C, Smith WM, Munk R, Manz T, Glaesker S, Apel TW, Treier M, Reineke M, Walz MK, Hoang-Vu C, Brauckhoff M, Klein-Franke A, Klose P, Schmidt H, Maier-Woelfle M, Peçzkowska M, Szmigielski C, Eng C; Freiburg-Warsaw-Columbus Pheochromocytoma Study Group (2002):** Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. N Engl J Med, 346: 1459-1466.
9. **Fassnacht M, Allolio B (2009):** Clinical management of adrenocortical carcinoma. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab; 23: 273-289
10. **Besedovsky HO, del Rey A (1996):** Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. Endocr Rev ; 17: 64-102.
11. **Haddad JJ, Saadé NE, Safieh-Garabedian B (2002):** Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. J Neuroimmunol; 133: 1-19.
12. **John CD, Buckingham JC (2003):** Cytokines: regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Curr Opin Pharmacol; 3: 78-84.
13. **Morale MC, Gallo F, Tirolo C, L'Episcopo F, Gennuso F, Testa N, Caniglia S, Spina-Purrello V, Avola R, Scoto GM, Marchetti B (2003):** The reproductive system at the neuroendocrine-

immune interface: focus on LHRH, estrogens and growth factors in LHRH neuron-glia interactions. *Domest Animal Endocrinol*; 25: 21-46.

14. **Tomita K, Nakamura E, Okabe S (2005):** Histamine regulates growth of malignant melanoma implants via H2 receptors in mice. *Inflammopharmacology*; 13: 281-289.
15. **Medina V, Croci M, Crescenti E, Mohamad N, Sanchez-Jiménez F, Massari N, Nuñez M, Cricco G, Martin G, Bergoc R, Rivera E (2008):** The role of histamine in human mammary carcinogenesis: H3 and H4 receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment. *Cancer Biol Ther*; 7: 28-35.
16. **Boér K, Helinger E, Helinger A, Pócsa P, Pós Z, Demeter P, Baranyai Z, Dede K, Darvas Z, Falus A (2008):** Decreased expression of histamine H1 and H4 receptors suggests disturbance of local regulation in human colorectal tumours by histamine. *Eur J Cell Biol*; 87: 227-236.
17. **Hoheisel JD (2006):** Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nature Rev Genet*; 7: 200-210.
18. **Császár A, Ábel T (2001):** Receptor polymorphisms and diseases. *Eur J Pharmacol*; 414: 9-22.
19. **Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003):** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*; 115: 787-798.
20. **Turner DJ, Miskulin J (2008):** Management of adrenal lesions. *Curr Opin Oncol*; 21: 34-40.
21. **Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB (2008):** Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *Oncologist*; 13: 548-561.
22. **Volante M, Buttiglierio C, Greco E, Berruti A, Papotti M (2008):** Pathological and molecular features of adrenocortical carcinoma: an update. *J Clin Pathol*, 61: 787-793.
23. **Vezzosi D, Bertherat J, Groussin L (2010):** Pathogenesis of benign adrenocortical tumors. *Best Practice Res Clin Endocrinol Metab*; 24: 893-905
24. **Balogh K, Rácz K, Patócs A, Hunyady L (2006):** Menin and its interacting proteins: elucidation of menin function. *Trends Endocrinol Metab*; 17: 357-364
25. **Waldmann J, Bartsch DK, Kann PH, Fendrich V, Rothmund M, Langer P (2007):** Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1: results of 7 years prospective screening. *Langenbecks Arch Surg*; 392: 437-443.
26. **Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA (2001):** Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 4041-4046.
27. **Bossis I, Stratakis CA (2004):** Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinology*; 145: 5452-5458.
28. **Dumitrescu CE, Collins MT (2008):** McCune-Albright syndrome. *Orphanet J Rare Di*; 3: 12  
doi:10.1186/1750-1172-3-12

29. **Stratakis CA (2003):** Genetics of adrenocortical tumors: gatekeepers, landscapers and conductors in symphony. *Trends Endocrinol Metab*; 14: 404-410
30. **Moule RN, Jhavar SG, Eeles RA (2006):** Genotype phenotype correlation in Li-Fraumeni syndrome kindreds and its implications for management. *Familial Cancer*; 5: 129–133.
31. **Libè R, Groussin L, Tissier F, Elie C, René-Corail F, Fratticci A, Jullian E, Beck-Peccoz P, Bertagna X, Gicquel C, Bertherat J (2007):** Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res*; 13: 844-850.
32. **Coulter CL (2005):** Fetal adrenal development: insight gained from adrenal tumors. *Trends Endocrinol Metab*, 16: 235-242.
33. **Cai X, Cullen BR (2007):** The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA*; 13: 313-316
34. **Cytrynbaum CS, Smith AC, Rubin T, Weksberg R (2005):** Advances in overgrowth syndromes: clinical classification to molecular delineation in Sotos syndrome and Beckwith-Wiedemann syndrome. *Curr Opin Pediatr*; 17: 740-746.
35. **Smith AC, Choufani S, Ferreira JC, Weksberg R (2007):** Growth regulation, imprinted genes, and chromosome 11p15.5. *Pediatr Res*; 61: 43R-47R.
36. **Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JM, Hanash SM (2003):** Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol*; 162: 521-531.
37. **Boulle N, Logié A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y (1998):** Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*; 83: 1713-1720.
38. **Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D (1997):** Insulin like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. *Eur J Endocrinol*; 136: 296-303.
39. **Soon PS, Gill AJ, Benn DE, Clarkson A, Robinson BG, McDonald KL, Sidhu SB (2009):** Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer*; 16: 573-583.
40. **Kikuchi A (2003):** Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci*; 94: 225-229
41. **Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Val P**

- (2010):** Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet*; 19: 1561-1576.
42. **Patalano A, Brancato V, Mantero F (2009):** Adrenocortical cancer treatment. *Horm Res*; 71: 99-104.
  43. **Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, Sanders D, Thomas DG, Doherty G, Hammer G (2009):** Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res*; 15: 668-676
  44. **de Reyniès A, Assié G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, René-Corail F, Dousset B, Bertagna X, Clauser E, Bertherat J (2009):** Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol*; 27: 1108-1115
  45. **Fernandez-Ranvier GG, Weng J, Yeh RF, Khanafshar E, Suh I, Barker C, Duh QY, Clark OH, Kebebew E (2008):** Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling. *Arch Surg*; 143: 841-846.
  46. **Fernandez-Ranvier GG, Weng J, Yeh RF, Shibru D, Khafnashar E, Chung KW, Hwang J, Duh QY, Clark OH, Kebebew E (2008):** Candidate diagnostic markers and tumor suppressor genes for adrenocortical carcinoma by expression profile of genes on chromosome 11q13. *World J Surg*; 32: 873-881.
  47. **Ragazzon B, Assié G, Bertherat J (2011):** Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments. *Endocr Relat Cancer*; 18: R15-R27
  48. **Lefrancois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Gallo-Payet N, Hyndman D, Veyssiere G, Bertagna X, Martinez CJ (2004):** Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors, *J Clin Endocrinol Metab*; 89: 3010-3019.
  49. **Velázquez-Fernández D, Laurell C, Geli J, Höög A, Odeberg J, Kjellman M, Lundeberg J, Hamberger B, Nilsson P, Bäckdahl M (2005):** Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery*; 138: 1087-1094.
  50. **Slater EP, Diehl SM, Langer P, Samans B, Ramaswamy A, Zielke A, Bartsch DK (2006):** Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol*; 154: 587-598.
  51. **de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, Bertherat J, Bertagna X, Plouin PF, Baudin E, Berger F, Gicquel C, Chabre O, Feige JJ (2005):** Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic

Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*; 9: 1819-1829

52. **Bravo EL, Tagle R (2003):** Pheochromocytoma: state-of-the-art and future prospects. *Endocr Rev*; 24: 539-553.
53. **Scholz T, Eisenhofer G, Pacak K, Dralle H, Lehnert H (2007):** Clinical review: Current treatment of malignant pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*; 92: 1217-1225.
54. **Qin Y, Yao L, King EE, Buddavarapu K, Lenci RE, Chocron ES, Lechleiter JD, Sass M, Aronin N, Schiavi F, Boaretto F, Opocher G, Toledo RA, Toledo SP, Stiles C, Aguiar RC, Dahia PL (2010):** Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nat Genet*; 42: 229-233
55. **Comino-Méndez I, Gracia-Aznárez FJ, Schiavi F, Landa I, Leandro-García LJ, Letón R, Honrado E, Ramos-Medina R, Caronia D, Pita G, Gómez-Grana A, de Cubas AA, Inglada-Pérez L, Maliszewska A, Taschin E, Bobisse S, Pica G, Loli P, Hernández-Lavado R, Díaz JA, Gómez-Morales M, González-Neira A, Roncador G, Rodríguez-Antona C, Benítez J, Mannelli M, Opocher G, Robledo M, Cascón A (2011):** Exome sequencing identifies *MAX* mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma. *Nature Gen*; 43: 663-669.
56. **Eisenhofer G, Bornstein SR, Brouwers FM, Cheung NK, Dahia PL, de Krijger RR, Giordano TJ, Greene LA, Goldstein DS, Lehnert H, Manger WM, Maris JM, Neumann HP, Pacak K, Shulkin BL, Smith DI, Tischler AS, Young WF Jr. (2004):** Malignant pheochromocytoma: current status and initiatives for future progress. *Endocr Relat Cancer*; 11: 423-436.
57. **Nativ O, Grant CS, Sheps SG, O'Fallon JR, Farrow GM, van Heerden JA, Lieber MM (1992):** Prognostic profile for patients with pheochromocytoma derived from clinical and pathological factors and DNA ploidy pattern. *J Surg Oncol*; 50: 258-262.
58. **Helman LJ, Cohen PS, Averbuch SD, Cooper MJ, Keiser HR, Israel MA (1989):** Neuropeptide Y expression distinguishes malignant from benign pheochromocytoma. *J Clin Oncol*; 7: 1720-1725.
59. **Salmenkivi K, Arola J, Voutilainen R, Ilvesmäki V, Haglund C, Kahri AI, Heikkilä P, Liu J (2001):** Inhibin/activin betaB-subunit expression in pheochromocytomas favors benign diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 2231-2235.
60. **Salmenkivi K, Haglund C, Ristimäki A, Arola J, Heikkilä P (2001):** Increased expression of cyclooxygenase-2 in malignant pheochromocytomas. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 5615-5619.
61. **Salmenkivi K, Haglund C, Arola J, Heikkilä P (2001):** Increased expression of tenascin in pheochromocytomas correlates with malignancy. *Am J Surg Pathol*; 25: 1419-1423.

62. **Yoshimoto T, Naruse M, Zeng Z, Nishikawa T, Kasajima T, Toma H, Yamamori S, Matsumoto H, Tanabe A, Naruse K, Demura H (1998):** The relatively high frequency of p53 gene mutations in multiple and malignant pheochromocytomas. *J Endocrinol*; 159: 247-255.
63. **van der Harst E, Bruining HA, Jaap Bonjer H, van der Ham F, Dinjens WN, Lamberts SW, de Herder WW, Koper JW, Stijnen T, Proye C, Lecomte-Houcke M, Bosman FT, de Krijger RR (2000):** Proliferative index in pheochromocytomas: does it predict the occurrence of metastases? *J Pathol*; 191: 175-180.
64. **Babinska A, Sworczak K, Wisniewski P, Nałecz A, Jaskiewicz K (2008):** The role of immunohistochemistry in histopathological diagnostics of clinically "silent" incidentally detected adrenal masses. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*; 116: 246-251.
65. **Strong VE, Kennedy T, Al-Ahmadie H, Tang L, Coleman J, Fong Y, Brennan M, Ghossein RA (2008):** Prognostic indicators of malignancy in adrenal pheochromocytomas: clinical, histopathologic, and cell cycle/apoptosis gene expression analysis. *Surgery*; 143: 759-768.
66. **Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJM, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BAJ, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker RV, Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells SA, Marx SJ (2001):** 2001 Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 5658–5671
67. **Marini F, Falchetti A, Del Monte F, Sala SC, Tognarini I, Luzi E, Brandi ML (2006):** Multiple endocrine neoplasia type 2. *Orphanet J Rare Dis*; 1: 45 doi:10.1186/1750-1172-1-45
68. **Kaelin WG Jr. (2002):** Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer*; 2: 673-682.
69. **Ward BA, Gutmann DH (2005):** Neurofibromatosis 1: from lab bench to clinic. *Pediatr Neurol*; 32: 221-228.
70. **Adler JT, Meyer-Rochow GY, Chen H, Benn DE, Robinson BG, Sippel RS, Sidhu SB (2008):** Pheochromocytoma: current approaches and future directions. *Oncologist*; 13: 779-793.
71. **Hao HX, Khalimonchuk O, Schraders M, Dephoure N, Bayley JP, Kunst H, Devilee P, Cremers CW, Schiffman JD, Bentz BG, Gygi SP, Winge DR, Kremer H, Rutter J (2009):** SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science*; 325: 1139-1142.
72. **Dahia PL, Ross KN, Wright ME, Hayashida CY, Santagata S, Barontini M, Kung AL, Sanso G, Powers JF, Tischler AS, Hodin R, Heitritter S, Moore F, Dluhy R, Sosa JA, Ocal IT, Benn DE, Marsh DJ, Robinson BG, Schneider K, Garber J, Arum SM, Korbonits M, Grossman A, Pigny P, Toledo SP, Nosé V, Li C, Stiles CD (2005):** A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet*; 1: 72-80

73. **Eisenhofer G, Huynh TT, Pacak K, Brouwers FM, Walther MM, Linehan WM, Munson PJ, Mannelli M, Goldstein DS, Elkahloun AG (2004):** Distinct gene expression profiles in norepinephrine- and epinephrine-producing hereditary and sporadic pheochromocytomas: activation of hypoxia-driven angiogenic pathways in von Hippel-Lindau syndrome. *Endocr Relat Cancer*; 11: 897-911.
74. **Thouënnon E, Elkahloun AG, Guillemot J, Gimenez-Roqueplo AP, Bertherat J, Pierre A, Ghzili H, Grumolato L, Muresan M, Klein M, Lefebvre H, Ouafik L, Vaudry H, Plouin PF, Yon L, Anouar Y (2007):** Identification of potential gene markers and insights into the pathophysiology of pheochromocytoma malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*; 92: 4865-4872.
75. **Brouwers FM, Elkahloun AG, Munson PJ, Eisenhofer G, Barb J, Linehan WM, Lenders JW, De Krijger R, Mannelli M, Udelsman R, Ocal IT, Shulkin BL, Bornstein SR, Breza J, Ksinantova L, Pacak K (2006):** Gene expression profiling of benign and malignant pheochromocytoma. *Ann N Y Acad Sci*; 1073: 541-556.
76. **Waldmann J, Fendrich V, Holler J, Buchholz M, Heinmöller E, Langer P, Ramaswamy A, Samans B, Walz MK, Rothmund M, Bartsch DK, Slater EP (2010):** Microarray analysis reveals differential expression of benign and malignant pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer*; 17: 743-756.
77. **Anouar Y, Yon L, Guillemot J, Thouënnon E, Barbier L, Gimenez-Roqueplo AP, Bertherat J, Lefebvre H, Klein M, Muresan M, Grouzmann E, Plouin PF, Vaudry H, Elkahloun AG (2006):** Development of novel tools for the diagnosis and prognosis of pheochromocytoma using peptide marker immunoassay and gene expression profiling approaches. *Ann N Y Acad Sci*; 1073: 533-540.
78. **Suh I, Shibru D, Eisenhofer G, Pacak K, Duh QY, Clark OH, Kebebew E (2009):** Candidate genes associated with malignant pheochromocytomas by genome-wide expression profiling. *Ann Surg*; 250: 983-990.
79. **Jutel M, Akdis M, Akdis CA (2009):** Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy*; 39: 1786-1800.
80. **Jones BL, Kearns GL (2011):** Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clin Pharmacol Ther*; 89: 189-197.
81. **Ohtsu H, Tanaka S, Terui T, Hori Y, Makabe-Kobayashi Y, Pejler G, Tchougounova E, Hellman L, Gertsenstein M, Hirasawa N, Sakurai E, Buzás E, Kovács P, Csaba G, Kittel Á, Okada M, Hara M, Mar L, Numayama-Tsuruta K, Ishigaki-Suzuki S, Ohuchi K, Ichikawa A, Falus A, Watanabe T, Nagy A (2001):** Mice lacking histidine decarboxylase exhibit abnormal mast cells. *FEBS Lett*; 502: 53-56.

82. **Kellaway CH, Cowell SJ (1922):** On the concentration of the blood and the effects of histamine in adrenal insufficiency. *J Physiol*; 57:82-99.
83. **Marley PD, Thomson KA, Jachno K, Johnston MJ (1991):** Histamine-induced increases in cyclic AMP levels in bovine adrenal medullary cells. *Br J Pharmacol* 104:839-846.
84. **Traiffort E, Vizuete ML, Tardivel-Lacombe J, Souil E, Schwartz JC, Ruat M (1995):** The guinea pig histamine H2 receptor: gene cloning, tissue expression and chromosomal localization of its human counterpart. *Biochem Biophys Res Commun*; 211:570-577.
85. **Marley PD (2003):** Mechanisms in histamine-mediated secretion from adrenal chromaffin cells. *Pharmacol Ther*; 98: 1-34.
86. **Häppölä O, Soinila S, Päivärinta H, Joh TH, Panula P (1985):** Histamine-immunoreactive endocrine cells in the adrenal medulla of the rat. *Brain Res*; 339: 393-396.
87. **Matsuki Y, Tanimoto A, Hamada T, Sasaguri Y (2003):** Histidine decarboxylase expression as a new sensitive and specific marker for small cell lung carcinoma. *Mod Pathol*; 16: 72-78.
88. **Yoshida T, Mio M, Tasaka K (1997):** Histamine-induced cortisol secretion from bovine adrenocortical cells: co-cultured with bovine adrenomedullary cells. *Inflamm Res*; 46 Suppl 1: S61-62
89. **Orsó E, Szalay KS, Tóth IE, Szabó D, Stark E, Fehér T, Perner F, Hidvégi M (1995):** Effect of histamine on corticosteroid secretion of isolated human and rat adrenocortical cells. *Inflamm Res*; 44: S48-S49
90. **Orsó E, Szalay KS, Fehér T (1997):** Interaction of histamine with adrenocorticotrophic hormone: a local modulatory role for adrenocortical androgen synthesis? *Inflamm Res*; 46: S57-S58
91. **Elenkov IJ (2007):** Neurohormonal-cytokine interactions: Implications for inflammation, common human diseases, and well-being. *Neurochem Int*; 52: 40-51.
92. **Tomaszewska-Zaremba D, Herman A (2009):** The role of immunological system in the regulation of gonadoliberin and gonadotropin secretion. *Reprod Biol*; 9: 11-23.
93. **Hedger MP, Meinhardt A (2003):** Cytokines and the immune-testicular axis. *J Reprod Immunol*; 58: 1-26.
94. **Vinatier D, Dufour Ph, Tordjeman-Rizzi N, Prolongeau JF, Depret-Moser S, Monnier JC (1995):** Immunological aspects of ovarian function: role of the cytokines. *Eur J Obstr Gynecol Reprod Biol*; 63: 155-168.
95. **Melcangi RC, Martini L, Galbiati M (2002):** Growth factors and steroid hormones: a complex interplay in the hypothalamic control of reproductive functions. *Prog Neurobiol*; 67: 421-449.
96. **Wray S (2010):** From nose to brain: development of gonadotropine-releasing hormone 1 neurons. *J Neuroendocrinol*; 22: 743-753.

97. **Salvi R, Castillo E, Voirol MJ, Glauser M, Rey JP, Gaillard RC, Vollenweider P, Pralong FP (2006):** Gonadotropin-releasing hormone-expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogenactivated protein kinase pathway. *Endocrinology*; 147: 816–826.
98. **Mansuy V, Geller S, Rey JP, Campagne C, Boccard J, Poulain C, Prevot V, Pralong FP (2011):** Phenotypic and molecular characterization of proliferating and differentiated GnRH-expressing Gnv-3 cells. *Mol Cell Endocrinol*; 332: 97-105.
99. **Gamba M, Pralong FP (2006):** Control of GnRH neuronal activity by metabolic factors: the role of leptin and insulin. *Mol Cell Endocrinol*; 254-255: 133-139.
100. **Rivier C, Vale W (1990):** Cytokines act within the brain to inhibit luteinizing hormonesecretion and ovulation in the rat. *Endocrinology*; 127: 849-856
101. **Kalra PS, Edwards TG, Xiu B, Jain M, Kalra SP (1998):** The anti-gonadotropic effects of cytokines: the role of neuropeptides. *Domest Anim Endocrinol*; 15: 321-332.
102. **Watanobe H, Hayakawa Y (2003):** Hypothalamic interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , but not interleukin-6, mediate the endotoxin-induced suppressionof the reproductive axis in rats. *Endocrinology*; 144: 4868–4875
103. **Yamaguchi M, Koike K, Yoshimoto Y, Matsuzaki N, Miyake A, Tanizawa O (1991):** Interleukin-6 stimulates gonadotropin-releasing hormone secretion fromrat hypothalamic cells. *Horm Res*; 35: 252–256
104. **Rivest S, Rivier C (1993):** Centrally injected interleukin-1 $\beta$  inhibits the hypothalamic LHRH secretion and circulating LH levels via prostaglandins in rats. *J Neuroendocrinol*; 5:445–450
105. **Yamaguchi M, Yoshimoto Y, Komura H, Koike K, Matsuzaki N, Hirota K, Miyake A, Tanizawa O (1990):** Interleukin 1 $\beta$  and tumour necrosis factor  $\alpha$  stimulate the release of gonadotropin-releasing hormone and interleukin 6 by primary cultured rat hypothalamic cells. *Acta Endocrinol (Copenh)*; 123: 476–480
106. **O'Neill LAJ (2008):** The interleukin-1 receptor/Toll like receptor superfamily: 10 years of progress. *Immunol Rev*; 226: 10-18.
107. **Arend WP, Palmer G, Gabay C (2008):** IL-1, IL-18 and IL-33 families of cytokines. *Immunol Rev*; 223: 20-38.
108. **Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003):** Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*; 374: 1–20
109. **Gaillard RC (1998):** Cytokines int he neuroendocrine system. *Int Rev Immunol*; 17: 181-216.

110. **Murphy M, Dutton R, Koblar S, Cheema S, Bartlett P (1997):** Cytokines which signal through the LIF receptor and their actions in the nervous system. *Prog Neurobiol*; 52: 355–378
111. **Yano H, Readhead C, Nakashima M, Ren SG, Melmed S (1998):** Pituitary-directed leukemia inhibitor factor transgene causes Cushing's syndrome: neuro-immune-endocrine modulation of pituitary development. *Mol Endocrinol*; 12: 1706-1720.
112. **Kass DJ (2011):** Cytokine-like factor 1 (CLF1): Life after development? *Cytokine*; 55: 325-329.
113. **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998):** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*; 391: 806-811.
114. **Chen CZ (2005):** MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*; 353: 1768-1771
115. **Robertson KD (2005):** DNA methylation and human disease. *Nature Rev Genet*; 6: 597-610.
116. **Bartel DP (2004):** MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281-297.
117. **Sevignani C, Calin GA, Siracusa LD, Croce CM (2006):** Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm Genome*, 17: 189-202.
118. **Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008):** Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*; 9: 102-114.
119. **Faller M, Guo F (2008):** MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta*; 1779: 663-667
120. **Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T (2003):** A uniform system for microRNA annotation. *RNA*; 9: 277-279.
121. **Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005):** Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*; 120: 15-20.
122. **Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP (2007):** MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*; 27: 91-105.
123. **Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005):** Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*; 433: 769-773.

124. **Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP (2008):** The impact of microRNAs on protein output. *Nature*; 455: 64-71.
125. **Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N (2008):** Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*; 455: 58-63.
126. **Grosshans H, Filipowicz W (2008):** Proteomics joins the search for microRNA targets. *Cell*; 134:560-562.
127. **Singh SK, Pal Bhadra M, Girschick HJ, Bhadra U (2008):** MicroRNAs-micro in size but macro in function. *FEBS J*; 275: 4929-4944.
128. **Wienholds E, Plasterk RH (2005):** MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett*; 579: 5911-5922
129. **Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP (2005):** Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res*; 33: 1290-1297.
130. **Calin GA, Croce CM (2006):** MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer*, 6: 857-866.
131. **Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M (2004):** A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*; 432: 226-230.
132. **Cuellar TL, McManus MT (2005):** MicroRNAs and endocrine biology. *J Endocrinol*; 187: 327-332.
133. **Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, Tuschl T (2005):** Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 304: 734-736.
134. **Urbich C, Kuehbach A, Dimmeler S (2008):** Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res*; 79: 581-588.
135. **Pandey AK, Agarwal P, Kaur K, Datta M (2009):** MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. *Cell Physiol Biochem*; 23: 221-232.
136. **Luo X, Tsai LM, Shen N, Yu D (2010):** Evidence for microRNA-mediated regulation in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis*; 69: 130-36.
137. **O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D (2010):** Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*; 10: 111-122.
138. **Provost P (2010):** MicroRNAs as a molecular basis for mental retardation, Alzheimer's and prion diseases. *Brain Res*, 1338: 58-66.
139. **Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004):** Human microRNA genes are frequently

located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 2999-3004.

140. **Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM (2006):** MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med*; 12: 580-587.
141. **Zhao H, Wang D, Du W, Gu D, Yang R (2010):** MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function. *Crit Rev Oncol Hematol*; 74: 149-155.
142. **Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI (2007):** MicroRNAs and cancer. *Br J Surg*; 94: 23-30.
143. **Bottoni A, Zatelli MC, Ferracin M, Tagliati F, Piccin D, Vignali C, Calin GA, Negrini M, Croce CM, Degli Uberti EC (2007):** Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*; 210: 370-377.
144. **He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, Calin GA, Liu CG, Franssila K, Suster S, Kloos RT, Croce CM, de la Chapelle A (2005):** The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 19075-19080.
145. **Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C (2006):** A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*; 91: 3584-3591.
146. **Corbetta S, Vaira V, Guarnieri V, Scillitani A, Eller-Vainicher C, Ferrero S, Vicentini L, Chiodini I, Bisceglia M, Beck-Peccoz P, Bosari S, Spada A (2010):** Differential expression of microRNAs in human parathyroid carcinomas compared with normal parathyroid tissue. *Endocr Relat Cancer*; 17: 135-146.
147. **Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM (2006):** MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*; 24: 4677-4684.
148. **Dahiya N, Morin PJ (2010):** MicroRNAs in ovarian carcinomas. *Endocr Relat Cancer*; 17: F77-F89.
149. **Weber F, Eng C (2008):** Update on the molecular diagnosis of endocrine tumors: towards omics-based personalized healthcare? *J Clin Endocrinol Metab*; 93: 1097-1104.
150. **Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T (2004):** Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*; 64: 3753-3756.

151. **Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, Iorio MV, Visone R, Sever NI, Fabbri M, Iuliano R, Palumbo T, Pichiorri F, Roldo C, Garzon R, Sevignani C, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2005):** A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*; 353: 1793-1801.
152. **Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005):** MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*; 435: 834-838.
153. **Xiang CC, Chen Y (2000):** cDNA microarray technology and its applications. *Biotechnology Adv*; 18: 35-46.
154. **Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M (2006):** Microarray data analysis: from disarray to consolidation and consensus. *Nature Rev Genet*; 7: 55-65.
155. **Weeraratna AT, Nagel JE, de Mello-Coelho V, Taub DD (2004):** Gene expression profiling: from microarrays to medicine. *J Clin Immunol*; 24: 213-224.
156. **Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S, Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M (2001):** Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet*; 29: 365-371.
157. **Edgar R, Barrett T (2006):** NCBI GEO standards and services for microarray data. *Nat Biotechnol*; 24: 1471-1472.
158. **Mocellin S, Rossi CR (2007):** Principles of gene microarray data analysis. *Adv Exp Med Biol*; 593: 19-30.
159. **Barabási AL, Albert R (1999):** Emergence of scaling in random networks. *Science*; 286: 509-512.
160. **Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005):** Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 15545-15550.
161. **Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD (2006):** Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing *in vitro*. *Mol Cell*; 22: 553-560.
162. **Clancy JL, Nusch M, Humphreys DT, Westman BJ, Beilharz TH, Preiss T (2007):** Methods to analyze microRNA-mediated control of mRNA translation. *Methods Enzymol*; 431: 83-111.

163. **Papadopoulos GL, Reczko M, Simossis VA, Sethupathy P, Hatzigeorgiou AG (2009):** The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res*; 37: D155-D158.
164. **Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003):** Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*; 115: 787-798.
165. **Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N (2005):** Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*; 37: 495-500.
166. **Grün D, Wang YL, Langenberger D, Gunsalus KC, Rajewsky N (2005):** microRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. *PLoS Comput Biol*; 1: e13.
167. **Griffiths-Jones S (2006):** miRBase: the microRNA sequence database. *Methods Mol Biol*, 342: 129-138.
168. **Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008):** miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*; 36: D154-D158.
169. **Didiano D, Hobert O (2006):** Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nature Struct Mol Biol*; 13: 849-851.
170. **Lee JE, Choi JH, Lee JH, Lee MG (2005):** Gene SNPs and mutations in clinical genetic testing: haplotype-based testing and analysis. *Mut Res*; 573: 195-204.
171. **Bessenyei B, Márka M, Urbán L, Zehner M, Semsei I (2004):** Single nucleotide polymorphisms: aging and diseases. *Biogerontology*; 5: 291-303.
172. **Shastri BS (2005):** Genetic diversity and new therapeutic concepts. *J Hum Genet*; 50: 321-328.
173. **van Rossum EFC, Russcher H, Lamberts SWJ (2005):** Genetic polymorphisms and multifactorial diseases: facts and fallacies revealed by the glucocorticoid receptor gene. *Trends Endocrinol Metab*; 16: 445-450.
174. **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997):** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 25, 3389-3402.
175. **Useche FJ, Gao G (2001):** High-throughput identification, database storage and analysis of SNPs in EST sequences. *Genome Inform. Ser Workshop Genome Inform*; 12: 194-203.
176. **Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H (1995):** Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*; 268: 1766–1769

177. **Bergonzelli GE, Pralong FP, Glauser M, Cavadas C, Grouzmann E, Gaillard RC (2001):** Interplay between galanin and leptin in the hypothalamic control of feeding via corticotropin-releasing hormone and neuropeptide Y. *Diabetes*, 2001; 50: 2666–2672
178. **Livak KJ, Schmittgen TD (2001):** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*; 25: 402-408.
179. **Zhang X, Chen J, Radcliffe T, Lebrun DP, Tron VA, Feilotter H (2008):** An array-based analysis of microRNA expression comparing matched frozen and formalin-fixed paraffin-embedded human tissue samples. *J Mol Diagn*; 10: 513-519.
180. **Burcelin R, Thorens B, Glauser M, Gaillard RC, Pralong FP (2003):** Gonadotropin-releasing hormone secretion from hypothalamic neurons: stimulation by insulin and potentiation by leptin. *Endocrinology*; 2003: 144: 4484–4491
181. **Gergics P, Patócs A, Tóth M, Igaz P, Szűcs N, Likó I, Fazekas F, Szabó I, Kovács B, Gláz E, Rácz K (2009):** Germline VHL gene mutations in Hungarian families with von Hippel-Lindau disease and patients with apparently sporadic unilateral pheochromocytomas. *Eur J Endocrinol*; 161: 495-502.
182. **Patócs A, Karádi E, Tóth M, Varga I, Szűcs N, Balogh K, Majnik J, Gláz E, Rácz K (2004):** Clinical and biochemical features of sporadic and hereditary pheochromocytomas: an analysis of 41 cases investigated in a single endocrine centre. *Eur J Cancer Prev*; 13: 403-409.
183. **Berndt I, Reuter M, Saller B, Frank-Raue K, Groth P, Grußendorf M, Raue F, Ritter MM, Höppner W (1998):** A new hot spot for mutations in the *ret* protooncogene causing familial medullary thyroid carcinoma and multiple endocrine neoplasia 2A. *J Clin Endocrinol Metab*; 83: 770-774.
184. **Ye P, Mariniello B, Mantero F, Shibata H, Rainey WE (2007):** G-protein-coupled receptors in aldosterone-producing adenomas: a potential cause of hyperaldosteronism. *J Endocrinol*; 195: 39-48.
185. **Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Höög A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C, Bäckdahl M (1996):** Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res*; 56: 4219-4223.
186. **Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, Young HM, Haddad BR (1999):** Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab*; 84: 1116-1121.

187. **Russell AJ, Sibbald J, Haak H, Keith WN, McNicol AM (1999):** Increasing genome instability in adrenocortical carcinoma progression with involvement of chromosomes 3, 9 and X at the adenoma stage. *Br J Cancer*; 81: 684-689.
188. **Zhao J, Speel EJ, Muletta-Feurer S, Rütimann K, Saremaslani P, Roth J, Heitz PU, Komminoth P (1999):** Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. *Am J Pathol*; 155: 1039-1045.
189. **Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P (2000):** Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer*; 28: 145-152.
190. **Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, Magarey CJ, Russell CF, Schulte KM, Röher HD, Delbridge L, Robinson BG (2002):** Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*; 87: 3467-3474.
191. **Zhao J, Roth J, Bode-Lesniewska B, Pfaltz M, Heitz PU, Komminoth P (2002):** Combined comparative genomic hybridization and genomic microarray for detection of gene amplifications in pulmonary artery intimal sarcomas and adrenocortical tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002; 34: 48-57.
192. **Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, Papageorgiou T, Bourdeau I, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Gicquel C, Bertagna X, Stratakis CA (2003):** Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res*; 63: 5308-5319.
193. **Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, Zambetti G, DeLacerda L, Rodrigues GA, Haddad BR (2005):** Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*; 90: 615-619.
194. **Stephan EA, Chung TH, Grant CS, Kim S, Von Hoff DD, Trent JM, Demeure MJ (2008):** Adrenocortical carcinoma survival rates correlated to genomic copy number variants. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7:425-31.
195. **West AN, Neale GA, Pounds S, Figueredo BC, Rodriguez Galindo C, Pianovski MA, Oliveira Filho AG, Malkin D, Lalli E, Ribeiro R, Zambetti GP (2007):** Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res*; 67: 600-608
196. **Laurell C, Velázquez-Fernández D, Lindsten K, Juhlin C, Enberg U, Geli J, Höög A, Kjellman M, Lundeberg J, Hamberger B, Larsson C, Nilsson P, Bäckdahl M (2009):**

Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol*; 161: 141-152.

197. **Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E, Houstis N, Daly MJ, Patterson N, Mesirov JP, Golub TR, Tamayo P, Spiegelman B, Lander ES, Hirschhorn JN, Altshuler D, Groop LC (2003):** PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*; 34: 267-273.
198. **Lind U, Greenidge P, Gustafsson JA, Wright AP, Carlstedt-Duke J (1999):** Valine 571 functions as a regional organizer in programming the glucocorticoid receptor for differential binding of glucocorticoids and mineralocorticoids. *J Biol Chem*; 274: 18515-18523.
199. **Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE (2009):** The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecologic Oncology*; 112: 55-59.
200. **Mackay IM, Arden KE, Nitsche A (2002):** Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*; 30: 1292-1305.
201. **Wang Y, Barbacioru C, Hyland F, Xiao W, Hunkapiller KL, Blake J, Chan F, Gonzalez C, Zhang L, Samaha RR (2006):** Large scale real-time PCR validation on gene expression measurements from two commercial long-oligonucleotide microarrays. *BMC Genomics*; 7: 59.
202. **Joglekar MV, Joglekar VM, Hardikar AA (2009):** Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expr Patterns*; 9: 109-113.
203. **El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E (2008):** miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes*; 57: 2708-2717.
204. **Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, Labourier E, Hahn SA (2007):** MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*; 26: 4442-4452.
205. **Tsukamoto Y, Nakada C, Noguchi T, Tanigawa M, Nguyen LT, Uchida T, Hijiya N, Matsuura K, Fujioka T, Seto M, Moriyama M (2010):** MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. *Cancer Res*; 70: 2339-2349.
206. **Mathé EA, Nguyen GH, Bowman ED, Zhao Y, Budhu A, Schetter AJ, Braun R, Reimers M, Kumamoto K, Hughes D, Altorki NK, Casson AG, Liu CG, Wang XW, Yanaihara N, Hagiwara N, Dannenberg AJ, Miyashita M, Croce CM, Harris CC (2009):** MicroRNA

expression in squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the esophagus: associations with survival. Clin Cancer Res; 15: 6192-6200.

207.        **Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Jung K (2010):** Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. Int J Cancer; 126: 1166-1176.
208.        **Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J (2008):** MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. Hepatology; 47: 1955-1963.
209.        **Kim TH, Kim YK, Kwon Y, Heo JH, Kang H, Kim G, An HJ (2010):** Deregulation of miR-519a, 153, and 485-5p and its clinicopathological relevance in ovarian epithelial tumours. Histopathology; 57: 734-743.
210.        **Qiang R, Wang F, Shi LY, Liu M, Chen S, Wan HY, Li YX, Li X, Gao SY, Sun BC, Tang H (2011):** Plexin-B1 is a target of miR-214 in cervical cancer and promotes the growth and invasion of HeLa cells. Int J Biochem Cell Biol; 43: 632-641.
211.        **Zhang XJ, Ye H, Zeng CW, He B, Zhang H, Chen YQ (2010):** Dysregulation of miR-15a and miR-214 in human pancreatic cancer. J Hematol Oncol; 3: 46.
212.        **Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, Pezzetti F, Rubini C, Girardi A, Farinella F, Mazzotta M, Carinci F (2010):** MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. Int J Immunopathol Pharmacol; 23: 1229-1234.
213.        **Yang H, Kong W, He L, Zhao JJ, O'Donnell JD, Wang J, Wenham RM, Coppola D, Kruk PA, Nicosia SV, Cheng JQ (2008):** MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. Cancer Res; 68: 425-433.
214.        **Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, Alder H, Liu CG, Oue N, Yasui W, Yoshida K, Sasaki H, Nomura S, Seto Y, Kaminishi M, Calin GA, Croce CM (2010):** Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. Lancet Oncol; 11: 136-146.
215.        **Sarkar S, Dey BK, Dutta A (2010):** MiR-322/424 and -503 are induced during muscle differentiation and promote cell cycle quiescence and differentiation by down-regulation of Cdc25A. Mol Biol Cell; 21: 2138-2149.
216.        **Forrest AR, Kanamori-Katayama M, Tomaru Y, Lassmann T, Ninomiya N, Takahashi Y, de Hoon MJ, Kubosaki A, Kaiho A, Suzuki M, Yasuda J, Kawai J, Hayashizaki Y, Hume DA, Suzuki H (2010):** Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. Leukemia; 24: 460-466.

217. **Jiang Q, Feng MG, Mo YY (2009):** Systematic validation of predicted microRNAs for cyclin D1. *BMC Cancer*; 9: 194.
218. **Zhao JJ, Yang J, Lin J, Yao N, Zhu Y, Zheng J, Xu J, Cheng JQ, Lin JY, Ma X (2009):** Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis. *Childs Nerv Syst*; 25: 13-20.
219. **Wong TS, Liu XB, Wong BY, Ng RW, Yuen AP, Wei WI (2008):** Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*, 14: 2588-2592.
220. **Lin SL, Chiang A, Chang D, Ying SY (2008):** Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *RNA*; 14: 417-424.
221. **Zhou L, Chen J, Li Z, Li X, Hu X, Huang Y, Zhao X, Liang C, Wang Y, Sun L, Shi M, Xu X, Shen F, Chen M, Han Z, Peng Z, Zhai Q, Chen J, Zhang Z, Yang R, Ye J, Guan Z, Yang H, Gui Y, Wang J, Cai Z, Zhang X (2010):** Integrated profiling of microRNAs and mRNAs: microRNAs located on Xq27.3 associate with clear cell renal cell carcinoma. *PLoS One*; 5: e15224.
222. **Chen Y, Stallings RL (2007):** Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res*; 67: 976-983.
223. **Foley NH, Bray IM, Tivnan A, Bryan K, Murphy DM, Buckley PG, Ryan J, O'Meara A, O'Sullivan M, Stallings RL (2010):** MicroRNA-184 inhibits neuroblastoma cell survival through targeting the serine/threonine kinase AKT2. *Mol Cancer*, 9: 83.
224. **Bernini GP, Moretti A, Bonadio AG, Menicagli M, Viacava P, Naccarato AG, Iaconi P, Miccoli P, Salvetti A (2002):** Angiogenesis in human normal and pathologic adrenal cortex. *J Clin Endocrinol Metab*; 87: 4961-4965.
225. **Roman S (2006):** Adrenocortical carcinoma. *Curr Opin Oncol*; 18: 36-42.
226. **Huang X, Le QT, Giaccia AJ (2010):** MiR-210-micromanage of the hypoxia pathway. *Trends Mol Med*; 16: 230-237.
227. **Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, Yeh MW, Wong SG, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, Sidhu SB (2009):** MiR-195 and miR-483-5p identified as predictors of poor prognosis in adrenocortical cancer. *Clin Cancer Res*; 15: 7684-7692.
228. **Dogman M, El Wakil A, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, Zhao W, Peralta-Del Valle MHC, Figueiredo BC, Zambetti GP, Lalli E (2010):** Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res*; 70: 4666-4675.
229. **Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E (2011):** MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer*; 117:1630-1639

230. **Schmitz KJ, Helwig J, Bertram S, Sheu SY, Suttorp AC, Seggewiß J, Willscher E, Walz MK, Worm K, Schmid KW (2011):** Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. *J Clin Pathol*; 64: 529-535.
231. **Tacon LJ, Soon PS, Gill AJ, Chou AS, Clarkson A, Botling J, Stalberg PL, Skogseid BM, Robinson BG, Sidhu SB, Clifton-Bligh RJ (2009):** The glucocorticoid receptor is overexpressed in malignant adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*; 94: 4591-4599.
232. **Gennarino VA, Sardiello M, Avellino R, Meola N, Maselli V, Anand S, Cuttillo L, Ballabio A, Banfi S (2009):** MicroRNA target prediction by expression analysis of host genes. *Genome Res*; 19: 481-490.
233. **Huang JC, Babak T, Corson TW, Chua G, Khan S, Gallie BL, Hughes TR, Blencowe BJ, Frey BJ, Morris QD (2007):** Using expression profiling data to identify human microRNA targets. *Nat Methods*; 4: 1045-1049.
234. **Molinari M (2000):** Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Prolif*; 33: 261-274.
235. **Bourcigaux N, Gaston V, Logié A, Bertagna X, Le Bouc Y, Gicquel C (2000):** High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*; 85: 322-330.
236. **Lombardi CP, Raffaelli M, Pani G, Maffione A, Princi P, Traini E, Galeotti T, Rossi ED, Fadda G, Bellantone R (2006):** Gene expression profiling of adrenal cortical tumors by cDNA macroarray analysis. Results of a preliminary study. *Biomed Pharmacother*; 60: 186-190.
237. **Brown JW, Prieto LM, Perez-Stable C, Montoya M, Cappell S, Fishman LM (2008):** Estrogen and progesterone lower cyclin B1 and D1 expression, block cell cycle in G2/M, and trigger apoptosis in human adrenal carcinoma cell cultures. *Horm Metab Res*; 40: 306-310.
238. **Cerquetti L, Bucci B, Marchese R, Misiti S, De Paula U, Miceli R, Muleti A, Amendola D, Piergrossi P, Brunetti E, Toscano V, Stigliano A (2008):** Mitotane increases the radiotherapy inhibitory effect and induces G2-arrest in combined treatment on both H295R and SW13 adrenocortical cell lines. *Endocr Relat Cancer*; 15: 623-634.
239. **Mani A, Gelmann EP (2005):** The ubiquitin-proteasome pathway and its role in cancer. *J Clin Oncol*; 23: 4776-4789.
240. **Taylor WR, Stark GR (2001):** Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*; 20: 1803-1815.
241. **Sun F, Fu H, Liu Q, Tie Y, Zhu J, Xing R, Sun Z, Zheng X (2008):** Downregulation of CCND1 and CDK6 by miR-34a induces cell cycle arrest. *FEBS Lett*; 582: 1564-1568.

242. **Medina R, Zaidi SK, Liu CG, Stein JL, van Wijnen AJ, Croce CM, Stein GS (2008):** MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. *Cancer Res*; 68: 2773-2780.
243. **Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE (2008):** Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*; 10: 203-211.
244. **Szafranska AE, Davison TS, Shingara J, Doleshal M, Riggenschach JA, Morrison CD, Jewell S, Labourier E (2008):** Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *J Mol Diagn*; 10: 415-423.
245. **Ribeiro-Silva A, Zhang H, Jeffrey SS (2007):** RNA extraction from ten year old formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer samples: a comparison of column purification and magnetic bead-based technologies. *BMC Mol Biol*; 8: 118.
246. **Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C (2007):** Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*; 8: 166.
247. **Lin M, Chen W, Huang J, Gao H, Ye Y, Song Z, Shen X (2011):** MicroRNA expression profiles in human colorectal cancers with liver metastases. *Oncol Rep*; 25: 739-747.
248. **Mascaux C, Laes JF, Anthoine G, Haller A, Ninane V, Burny A, Sculier JP (2009):** Evolution of microRNA expression during human bronchial squamous carcinogenesis. *Eur Respir J*; 33: 352-359.
249. **Wong CC, Wong CM, Tung EK, Au SL, Lee JM, Poon RT, Man K, Ng IO (2011):** The microRNA miR-139 suppresses metastasis and progression of hepatocellular carcinoma by down-regulating Rho-kinase 2. *Gastroenterology*; 140: 322-331.
250. **Hasseine LK, Hinault C, Lebrun P, Gautier N, Paul-Bellon R, Van Obberghen E (2009):** miR-139 impacts FoxO1 action by decreasing FoxO1 protein in mouse hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*; 390: 1278-1282.
251. **Redell JB, Liu Y, Dash PK (2009):** Traumatic brain injury alters expression of hippocampal microRNAs: potential regulators of multiple pathophysiological processes. *J Neurosci Res*; 87: 1435-1448.
252. **Redell JB, Moore AN, Ward NH 3rd, Hergenroeder GW, Dash PK (2010):** Human traumatic brain injury alters plasma microRNA levels. *J Neurotrauma*; 27: 2147-2156.
253. **Muñoz-Gimeno M, Guidi M, Kagerbauer B, Martín-Santos R, Navinés R, Alonso P, Menchón JM, Gratacòs M, Estivill X, Espinosa-Parrilla Y (2009):** Allele variants in functional MicroRNA target sites of the neurotrophin-3 receptor gene (NTRK3) as susceptibility factors for anxiety disorders. *Hum Mutat*; 30: 1062-1071.

254. **Fanger GR, Jones JR, Maue RA (1995):** Differential regulation of neuronal sodium channel expression by endogenous and exogenous tyrosine kinase receptors expressed in rat pheochromocytoma cells. *J Neurosci*; 15: 202-213.
255. **Gui J, Tian Y, Wen X, Zhang W, Zhang P, Gao J, Run W, Tian L, Jia X, Gao Y (2011):** Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. *Clin Sci (Lond)*; 120: 183-193.
256. **Afanasyeva EA, Mestdagh P, Kumps C, Vandesompele J, Ehemann V, Theissen J, Fischer M, Zapatka M, Brors B, Savelyeva L, Sagulenko V, Speleman F, Schwab M, Westermann F (2011):** MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival. *Cell Death Differ*; 18: 974-984
257. **Lui WO, Chen J, Gläsker S, Bender BU, Madura C, Khoo SK, Kort E, Larsson C, Neumann HP, Teh BT (2002):** Selective loss of chromosome 11 in pheochromocytomas associated with the VHL syndrome. *Oncogene*; 21: 1117-1122.
258. **Edström E, Mahlamäki E, Nord B, Kjellman M, Karhu R, Höög A, Goncharov N, Teh BT, Bäckdahl M, Larsson C (2000):** Comparative genomic hybridization reveals frequent losses of chromosomes 1p and 3q in pheochromocytomas and abdominal paragangliomas, suggesting a common genetic etiology. *Am J Pathol*; 156: 651-659.
259. **Waldmann J, Fendrich V, Holler J, Buchholz M, Heinmöller E, Langer P, Ramaswamy A, Samans B, Walz MK, Rothmund M, Bartsch DK, Slater EP (2010):** Microarray analysis reveals differential expression of benign and malignant pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer*; 17: 743-756.
260. **Björklund P, Cupisti K, Fryknäs M, Isaksson A, Willenberg HS, Akerström G, Hellman P, Westin G (2010):** Stathmin as a marker for malignancy in pheochromocytomas. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*; 118: 27-30.
261. **Juryńczyk M, Selmaj K (2010):** Notch: a new player in MS mechanisms. *J Neuroimmunol*; 218: 3-11.
262. **Adler JT, Hottinger DG, Kunnimalaiyaan M, Chen H (2008):** Histone deacetylase inhibitors upregulate Notch-1 and inhibit growth in pheochromocytoma cells. *Surgery*; 144: 956-961.
263. **Meyer-Rochow GY, Jackson NE, Conaglen JV, Whittle DE, Kunnimalaiyaan M, Chen H, Westin G, Sandgren J, Ståhlberg P, Khanafshar E, Shibru D, Duh QY, Clark OH, Kebebew E, Gill AJ, Clifton-Bligh R, Robinson BG, Benn DE, Sidhu SB (2010):** MicroRNA profiling of benign and malignant pheochromocytomas identifies novel diagnostic and therapeutic targets. *Endocr Relat Cancer*; 17: 835-846.

264. **Faggad A, Darb-Esfahani S, Wirtz R, Sinn B, Sehoul J, Könsgen D, Lage H, Weichert W, Noske A, Budczies J, Müller BM, Buckendahl AC, Röske A, Eldin Elwali N, Dietel M, Denkert C (2009):** Topoisomerase IIalpha mRNA and protein expression in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathological factors and prognosis. *Mod Pathol*; 22: 579-588.
265. **Soucek L, Evan GI (2010):** The ups and downs of Myc biology. *Curr Opin Genetics Dev*; 20: 91–95.
266. **Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV (1999):** MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 1999; 18: 3004-3016.
267. **Crucitti P, Latora V, Marchiori M (2004):** Model for cascading failures in complex networks. *Phys Rev E* 69: 045104
268. **Liu J, Voutilainen R, Kahri AI, Heikkilä P (1997):** Expression patterns of the c-myc gene in adrenocortical tumors and pheochromocytomas. *J Endocrinol*; 152: 175-181.
269. **Liu J, Voutilainen R, Kahri AI, Heikkilä P (1996):** Expression of the c-myc gene in human adrenals: regulation by adrenocorticotropin in primary cultures. *J Endocrinol*; 148: 523-529.
270. **Heikkilä P, Arola J, Salmi A, Kahri AI (1995):** ACTH-induced c-myc proto-oncogene expression precedes antimitogenic effect during differentiation of fetal rat adrenocortical cells. *J Endocrinol*; 145: 379-385.
271. **Larsson LS, Henriksson MA (2010):** The Yin and Yang functions of the Myc oncoprotein in cancer development and as targets for therapy. *Exp Cell Res*; 316: 1429–1437.
272. **Gandarillas A, Watt FM (1997):** c-Myc promotes differentiation of human epidermal stem cells. *Genes Dev*; 11: 2869-2882.
273. **Bettess MD, Dubois N, Murphy MJ, Dubey C, Roger C, Robine S, Trump A (2005):** c-Myc is required for the formation of intestinal crypts but dispensable for homeostasis of the adult intestinal epithelium. *Mol Cell Biol*; 25: 7868–7878.
274. **Watson JV, Stewart J, Evan GI, Ritson A, Sikora K (1986):** The clinical significance of flow cytometric c-myc oncoprotein quantitation in testicular cancer. *Br J Cancer*; 53: 331-337.
275. **Clarke N, Germain P, Altucci L, Gronemeyer H (2004):** Retinoids: potential in cancer prevention and therapy. *Expert Rev Mol Med*; 6: 1-23.
276. **Ferruzzi P, Ceni E, Tarocchi M, Grappone C, Milani S, Galli A, Fiorelli G, Serio M, Mannelli M (2005):** Thiazolidinediones inhibit growth and invasiveness of the human adrenocortical cancer cell line H295R. *J Clin Endocrinol Metab*; 90: 1332-1339.

277. **Haselbeck RJ, Ang HL, Deltour L, Duester G (1997):** Retinoic acid and alcohol/retinol dehydrogenase in the mouse adrenal gland: a potential endocrine source of retinoic acid during development. *Endocrinology*; 138: 3035-3041.
278. **Shimizu M, Takai K, Moriwaki H (2009):** Strategy and mechanism for the prevention of hepatocellular carcinoma: phosphorylated retinoid X receptor  $\alpha$  is a critical target for hepatocellular carcinoma chemoprevention. *Cancer Sci*; 100: 369-374.
279. **Cummins CL, Volle DH, Zhang Y, McDonald JG, Sion B, Lefrançois-Martinez AM, Caira F, Veyssière G, Mangelsdorf DJ, Lobaccaro JM (2006):** Liver X receptors regulate adrenal cholesterol balance. *J Clin Invest*; 116: 1902-1912.
280. **Steffensen KR, Neo SY, Stulnig TM, Vega VB, Rahman SS, Schuster GU, Gustafsson JA, Liu ET (2004):** Genome-wide expression profiling; a panel of mouse tissues discloses novel biological functions of liver X receptors in adrenals. *J Mol Endocrinol*; 33: 609-622.
281. **Nilsson M, Stulnig TM, Lin CY, Yeo AL, Nowotny P, Liu ET, Steffensen KR (2007):** Liver X receptors regulate adrenal steroidogenesis and hypothalamic-pituitary-adrenal feedback. *Mol Endocrinol*; 21: 126-137.
282. **Repa JJ, Mangelsdorf DJ (2000):** The role of orphan nuclear receptors in the regulation of cholesterol homeostasis. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 16: 459-481.
283. **Betz MJ, Shapiro I, Fassnacht M, Hahner S, Reincke M, Beuschlein F, German and Austrian Adrenal Network (2005):** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists suppress adrenocortical tumor cell proliferation and induce differentiation. *J Clin Endocrinol Metab*; 90: 3886-3896.
284. **Zacharowski K, Zacharowski PA, Koch A, Baban A, Tran N, Berkels R, Papewalis C, Schulze-Osthoff K, Knuefermann P, Zähringer U, Schumann RR, Rettori V, McCann SM, Bornstein SR (2006):** Toll-like receptor 4 plays a crucial role in the immune-adrenal response to systemic inflammatory response syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*; 103: 6392-6397.
285. **Ghose R, Zimmerman TL, Thevananther S, Karpen SJ (2004):** Endotoxin leads to rapid subcellular re-localization of hepatic RXR $\alpha$ : A novel mechanism for reduced hepatic gene expression in inflammation. *Nucl Recept*; 2: 4.
286. **Kanczkowski W, Zacharowski K, Wirth MP, Ehrhart-Bornstein M, Bornstein SR (2009):** Differential expression and action of Toll-like receptors in human adrenocortical cells. *Mol Cell Endocrinol*; 300: 57-65.
287. **Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I (2004):** Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol*; 215: 135-141.
288. **Markiewski MM, Lambris JD (2009):** Unwelcome complement. *Cancer Res*; 69: 6367-6370.

289. **Wolkersdörfer GW, Marx C, Brown J, Schröder S, Füssel M, Rieber EP, Kuhlisch E, Ehninger G, Bornstein SR (2005):** Prevalence of HLA-DRB1 genotype and altered Fas/Fas ligand expression in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*; 90: 1768-1774.
290. **Marx C, Bornstein SR, Wolkersdörfer GW (2000):** Cellular immune-endocrine interaction in adrenocortical tissues. *Eur J Clin Invest*; 30: 1-5.
291. **Bussey KJ, Demeure MJ (2011):** Toward a pathway-centered approach for the treatment of adrenocortical carcinoma. *Curr Opin Oncol*; 23: 34-44
292. **Krishnaswamy G, Ajitawi O, Chi DS (2006):** The human mast cell: an overview. *Methods Mol Biol*; 315: 13-34.
293. **Hinson JP, Vinson GP, Kapas S, Teja R (1991):** The relationship between adrenal vascular events and steroid secretion: the role of mast cells and endothelin. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 40: 381-389.
294. **Zhang PJ, Genega EM, Tomaszewsky JE, Pasha TL, LiVolsi VA (2003):** The role of calretinin, inhibin, melan-A, BCL-2, and c-kit in differentiating adrenal cortical and medullary tumors: an immunohistochemical study. *Mod Pathol*; 16: 591-597.
295. **Lefebvre H, Contesse V, Delarue C, Feuilloley M, Hery F, Grise P, Raynaud G, Verhofstad AA, Wolf LM, Vaudry H (1992):** Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin<sub>4</sub> receptor subtype. *Neuroscience*; 47: 999-1007.
296. **de Esch IJ, Thurmond RL, Jongejan A, Leurs R (2005):** The histamine H<sub>4</sub> receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci*; 26: 462-469.
297. **Akdis CA, Simons FE (2006):** Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur J Pharmacol*; 533: 69-76.
298. **Falus A, Hegyesi H, Lázár-Molnár E, Pós Z, László V, Darvas Z (2001):** Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. *Trends Immunol*; 22: 648-652.
299. **Pós Z, Wiener Z, Pócsa P, Rácz M, Tóth S, Darvas Z, Molnar V, Hegyesi H, Falus A (2008):** Histamine suppresses fibulin-5 and insulin-like growth factor-II receptor expression in melanoma. *Cancer Res*; 68: 1997-2005.
300. **Jelinek I, László V, Buzás E, Pállinger E, Hangya B, Horváth Z, Falus A (2007):** Increased antigen presentation and T(h)<sub>1</sub> polarization in genetically histamine-free mice. *Int Immunol*; 19: 51-58
301. **Martinerie C, Gicquel C, Louvel A, Laurent M, Schofield PN, Le Bouc Y (2001):** Altered expression of nov H is associated with human adrenocortical tumorigenesis, *J Clin Endocrinol Metab*; 86: 3929-3940.

302. **Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas LH (1997):** International Union of Pharmacology. XIII. classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev*; 49: 253-278.
303. **Orange PR, Heath PR, Wright SR, Pearson RC (1996):** Allelic variations of the human histamine H2 receptor gene. *Neuroreport* 1996; 7: 1293-1296.
304. **Wang LD, Hoeltzel M, Gantz I (1998):** Characterization of the histamine H2-receptor structural components involved in dual signaling. *J Pharmacol Exp Ther*; 285: 573-578.
305. **Orange PR, Heath PR, Wright SR, Ramchand CN, Kolkewicz L, Pearson RC (1996):** Individuals with schizophrenia have an increased incidence of the H2R649G allele for the histamine H2 receptor gene. *Mol Psychiatry*; 1: 466-469.
306. **Ito C, Morisset S, Krebs MO, Olie JP, Loo H, Poisier MF, Lannfelt L, Schwartz JC, Arrang JM (2000):** Histamine H2 receptor gene variants: lack of association with schizophrenia. *Mol Psychiatry*; 5: 159-164.
307. **García-Martín E, Ayuso P, Martínez C, Blanca M, Agúndez JAG (2009):** Histamine pharmacogenomics. *Pharmacogenomics*; 10: 867-883.
308. **Novotny WF, Chassande O, Baker M, Lazdunski M, Barbry P (1994):** Diamine oxidase is the amiloride-binding protein and is inhibited by amiloride analogues. *J Biol Chem*; 269: 9921-9925.
309. **Mu D, Medzihradszky KF, Adams GW, Mayer P, Hines WM, Burlingame AL, Smith AJ, Cai D, Klinman JP (1994):** Primary structures for a mammalian cellular and serum copper amine oxidase. *J Biol Chem*; 269: 9926-9932.
310. **Schwelberger HG (1999):** Molecular cloning of mammalian diamine oxidase genes and cDNAs. *Inflamm Res; Suppl 1*: S79-S80.
311. **Shah MA, Tayyab S, Ali R (1996):** Probing structure-activity relationship in diamine-oxidase - reactivities on lysine and arginine residues. *Int J Biol Macromol*; 18: 77-81.
312. **Preuss CV, Wood TC, Szumlanski CL, Raftogianis RB, Otterness DM, Girard B, Scott MC, Weinshilboum RM (1998):** Human histamine N-methyltransferase pharmacogenetics: common genetic polymorphisms that alter activity. *Mol Pharm*; 53: 708-717.
313. **Hon YY, Jusko WJ, Spratlin VE, Jann MW (2006):** Altered prednisolone pharmacodynamics in healthy subjects with histamine N-methyltransferase C314T genetic polymorphism. *J Clin Pharmacol*; 46: 408-417.
314. **Merke DP, Bornstein SR (2005):** Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*; 365: 2125-2136.

315. **Beuschlein F, Schulze E, Mora P, Gensheimer HP, Maser-Gluth C, Allolio B, Reincke M (1998):** Steroid 21-hydroxylase mutations and 21-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*; 83: 2585-2588
316. **Andersson S (1995):** Molecular genetics of androgenic 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 55: 533–534.
317. **Long JR, Kataoka N, Shu XO, Wen W, Gao YT, Cai Q, Zheng W (2006):** Genetic polymorphisms of the CYP19A1 gene and breast cancer survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*; 15: 2115-2122.
318. **McNamara DM, Tam SW, Sabolinski ML, Tobelmann P, Janosko K, Taylor AL, Cohn JN, Feldman AM, Worcel M (2006):** Aldosterone synthase promoter polymorphism predicts outcome in African Americans with heart failure: results from the A-Heft trial. *J Am Coll Cardiol*; 48: 1277-1282.
319. **Morel Y, Murena M, Nicolino M, Forest MG (1992):** Molecular genetics of the congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency, in: J.M. Saez, A.C. Brownie, A. Capponi, E.M. Chambaz, F. Mantero (Eds.), *Cellular and Molecular Biology of the Adrenal Cortex*, vol. 222, Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd., pp. 123–136.
320. **Wang L, Salavaggione E, Pellemounter L, Eckloff B, Wieben E, Weinshilboum R (2007):** Human 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: gene sequence variation and functional genomics. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 17: 88-99.
321. **Barr M, MacKenzie S, Wilkinson DM, Holloway CD, Friel EC, Miller S, MacDonald T, Fraser R, Connell JMC, Davies E (2006):** Functional effects of genetic variants in the 11 $\beta$ -hydroxylase (CYP11B1) gene. *Clin Endocrinol*; 65: 816-825.
322. **Tanahashi H, Mune T, Takahashi Y, Isaji M, Suwa T, Morita H, Yamakita N, Yasuda K, Deguchi T, White PC, Takeda J (2005):** Association of Lys173Arg polymorphism with CYP11B2 expression in normal adrenal glands and aldosterone-producing adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*; 90: 6226-6231.
323. **Agarwal AK, Rogerson FM, Mune T, White PC (1995):** Analysis of the human gene encoding the kidney isozyme of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 55: 473-479.
324. **Hsing AW, Chen C, Chokkalingam AP, Gao YT, Dightman DA, Nguyen HT, Deng J, Cheng J, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Stanczyk FZ, Reichardt JKV (2001):** Polymorphic markers in the SRD5A2 gene and prostate cancer risk: a population based case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prevention*; 10: 1077-1087.
325. **Gsur A, Feik E, Madersbacher S (2004):** Genetic polymorphisms and prostate cancer risk. *World J Urol*; 21: 414-423.

326. **Goodarzi MO, Shah NA, Antoine HJ, Pall M, Guo X, Azziz R (2006):** Variants of the 5 $\alpha$ -reductase type 1 and type 2 genes are associated with polycystic ovary syndromes and the severity of hirsutism in affected women. *J Clin Endocrinol Metab*; 91: 4085-4091.
327. **Gross KL, Lu NZ, Cidlowski JA (2009):** Molecular mechanisms regulating glucocorticoid sensitivity and resistance. *Mol Cell Endocrinol*; 300: 7-16.
328. **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 (2010):** Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. *Steroids*; 75: 695-700
329. **Majnik J, Patócs A, Balogh K, Tóth M, Gergics P, Szappanos Á, Mondok Á, Borgulya G, Pánczél P, Prohászka Z, Rácz K (2006):** Overrepresentation of the N363S variant of the glucocorticoid receptor gene in patients with bilateral adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab*; 91: 2796-2799.
330. **Lewis-Tuffin LI, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA (2007):** Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Mol Cell Biol*; 27: 2266-2282.
331. **Bledsoe RK, Montana VG, Stanley TB, Delves CJ, Apolito CJ, McKee DD, Consler TG, Parks DJ, Stewart EL, Willson TM, Lambert MH, Moore JT, Pearce KH, Xu HE (2002):** Crystal structure of the glucocorticoid receptor ligand binding domain reveals a novel mode of receptor dimerization and coactivator recognition. *Cell*; 110: 93-105
332. **Kauppi B, Jakob C, Farnegardh M, Yang J, Ahola H, Alarcon M, Calles K, Engstrom O, Harlan J, Muchmore S, Ramqvist AK, Thorell S, Ohman L, Greer J, Gustafsson JA, Carlstedt D, Carlquist M (2003):** The three-dimensional structures of antagonistic and agonistic forms of the glucocorticoid receptor ligand-binding domain: RU-486 induces a transconformation that leads to active antagonism. *J Biol Chem*; 278: 22748-22754.
333. **Garabedian MJ, Yamamoto KR (1992):** Genetic dissection of the signaling domain of a mammalian steroid receptor in yeast. *Mol Biol Cell*; 3: 1245-1257.
334. **Kang SS, Kim SR, Leonhardt S, Jarry H, Wuttke W, Kim K (2000):** Effect of interleukin-1 $\beta$  on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptorgene expression in castrated male rats. *J Neuroendocrinol*; 12: 421-429.
335. **Tamura S, Morikawa Y, Senba E (2003):** Localization of oncostatin M receptor  $\beta$  in adult and developing CNS. *Neuroscience*; 119: 991-997.
336. **Morikawa Y (2005):** Oncostatin M in the development of the nervous system. *Anat Sci Int*; 80: 53-59.
337. **Schwanzel-Fukuda M, Pfaff DW (1989):** Origin of luteinizing hormone-releasing hormone neurons. *Nature*; 338: 161-164.

338. **Ray DW, Ren SG, Melmed S (1996):** Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates proopiomelanocortin (POMC) expression in a corticotroph cell line. Role of STAT pathway. J Clin Invest; 97: 1852-1859
339. **Ogata I, Shimoya K, Moriyama A, Shiki Y, Matsumura Y, Yamanaka K, Nobunaga T, Tokugawa Y, Kimura T, Koyama M, Azuma C, Murata Y (2000):** Oncostatin M is produced during pregnancy by decidual cells and stimulates the release of HCG. Mol Hum Reprod; 6: 750-757
340. **Hara T, Tamura K, de Miguel MP, Mukouyama Y, Kim H, Kogo H, Donovan PJ, Miyajima A (1998):** Distinct roles of oncostatin M and leukemia inhibitory factor in the development of primordial germ cells and sertoli cells in mice. Dev Biol; 201: 144-153.
341. **Herrera DG, Robertson HA (1996):** Activation of c-fos in the brain. Prog Neurobiol; 50: 83–107.
342. **Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG (1993):** c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. Front Neuroendocrinol; 14: 173–213.
343. **Thiel G, Cibelli G (2002):** Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. J Cell Physiol; 193: 287–292.
344. **Liu J, Shoyab M, Grove RI (1993):** Induction of Egr-1 by oncostatin M precedes up-regulation of low density lipoprotein receptors in HepG2 cells. Cell Growth Differ; 4: 611–616.
345. **Botelho FM, Edwards DR, Richards CD (1998):** Oncostatin M stimulates c-Fos to bind a transcriptionally responsive AP-1 element within the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 promoter. J Biol Chem; 273: 5211–5218.
346. **Grove RI, Eberhardt C, Abid S, Mazzucco C, Liu J, Kiener P, Todaro G, Shoyab M (1993):** Oncostatin M is a mitogen for rabbit vascular smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci USA; 90: 823–827.
347. **Vairapandi M, Balliet AG, Hoffman B, Liebermann DA (2002):** GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress. J Cell Physiol; 192: 327-338.
348. **Chung HK, Yi YW, Jung NC, Kim D, Suh JM, Kim H, Park KC, Song JH, Kim DW, Hwan Yoon SH, Bae YS, Kim JM, Bae I, Shong M (2003):** CR6-interacting factor 1 interacts with Gadd45 family proteins and modulates the cell cycle. J Biol Chem; 278: 28079–28088.
349. **Nakayama K, Hara T, Hibi M, Hirano T, Miyajima A (1999):** A novel oncostatin M-inducible gene OIG37 forms a gene family with MyD118 and GADD45 and negatively regulates cell growth. J Biol Chem; 274: 24766–24772.

350. **Ensoli F, Fiorelli V, DeCristofaro M, Santini Muratori D, Novi A, Vannelli B, Thiele CJ, Luzi G, Aiuti F (1999):** Inflammatory cytokines and HIV-1-associated neurodegeneration: oncostatin-M produced by mononuclear cells from HIV-1-infected individuals induces apoptosis of primary neurons. *J Immunol*; 162: 6268–6277.
351. **Keyse SM (2000):** Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol*; 12: 186-192
352. **Bourguignon JP, Gerard A, Alvarez Gonzalez ML, Franchimont P (1993):** Control of pulsatile secretion of gonadotrophin releasing hormone from hypothalamic explants. *Hum Reprod*; 8(Suppl 2): 18-22.
353. **Gómez-Lechon MJ (1999):** Oncostatin M: signal transduction and biological activity. *Life Sci*; 65: 2019-2030.
354. **Repovic P, Benveniste EN (2002):** Prostaglandin E2 is a novel inducer of oncostatin-M expression in macrophages and microglia. *J Neurosci*; 22: 5334-5343.
355. **Ruprecht K, Kuhlmann T, Seif F, Hummel V, Kruse N, Bruck W, Rieckmann P (2001):** Effects of oncostatin M on human cerebral endothelial cells and expression in inflammatory brain lesions. *J Neuropathol Exp Neurol*; 60: 1087–1098.
356. **Chen SH, Benveniste EN (2004):** Oncostatin M: a pleiotropic cytokine in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev*; 15: 379-391.
357. **Schuurman B (2001):** Unusual clinical presentation of a patient with multiple endocrine neoplasia type 2A. *Neth J Med*; 58: 236-240.
358. **Siggelkow H, Melzer A, Nolte W, Karsten K, Höppner W, Hüfner M (2001):** Presentation of a kindred with familial medullary thyroid carcinoma and Cys611Phe mutation of the RET proto-oncogene demonstrating low grade malignancy. *Eur J Endocrinol*; 144: 467-473.
359. **Kinlaw WB, Scott SM, Maue RA, Memoli VA, Harris RD, Daniels GH, Porter DM, Belloni DR, Spooner ET, Ernesti MW, Noll WW (2005):** Multiple endocrine neoplasia 2A de to a unique C609S RET mutation presents with pheochromocytoma and reduced penetrance of medullary thyroid carcinoma. *Clin Endocrinol*; 63: 676-682.
360. **Quayle FJ, Fialkowski EA, Benveniste R, Moley JF (2007):** Pheochromocytoma penetrance varies by RET mutation in MEN2A. *Surgery*; 142: 800-805.
361. **Munnes M, Fanaei S, Schmitz B, Muiznieks I, Holschneider AM, Doerfler W (2000):** Familial form of Hirschprung disease: nucleotide sequence studies reveal point mutation in the RET proto-oncogene in two of six families but not in other candidate genes. *Am J Med Genet*; 94: 19-27.

362. **Gimm O, Neuberg DS, Marsh DJ, Dahia PLM, Hoang-Vu C, Raue F, Hinze R, Dralle H, Eng C (1999):** Over-representation of germline RET sequence variant in patients with sporadic medullary thyroid carcinoma and somatic RET codon 918 mutation. *Oncogene*; 18: 1369-1370.
363. **Patócs A, Valkusz Z, Igaz P, Balogh K, Tóth M, Majnik J, Varga I, Rácz K (2003):** 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.
364. **Shifrin AL, Ogilvie JB, Stang MT, Fay AM, Kuo YH, Matulewicz T, Xenachis CZ, Vernick JJ (2010):** Single nucleotide polymorphisms act as modifiers and correlate with the development medullary and simultaneous medullary/papillary thyroid carcinomas in 2 large, non-related families with the RET V804M proto-oncogene mutation. *Surgery*; 148: 1274-1281.
365. **Evans CO, Brown MR, Parks JS, Oyesiku NM (2000):** Screening for MEN1 suppressor gene mutations in sporadic pituitary tumors. *J Endocrinol Invest*; 23: 304-309.
366. **Lemos MC, Thakker RV (2008):** Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mut*; 29: 22-32.
367. **Thakker RV (2010):** Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*; 24: 355-370.
368. **Agarwal SK, Kester MB, Debelenko LV, Heppner C, Emmert-Buck MR, Skarulis MC, Doppman JL, Kim YS, Lubensky IA, Zhuang Z, Green JS, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Liotta LA, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ (1997):** Germline mutations of the MEN1 gene in familial multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *Hum Mol Genet*; 6: 1169-1175.

## 11. Köszönetnyilvánítás

Első helyen **Dr. Rácz Károly Professor Úrnak** tartozom köszönettel azért, hogy a Semmelweis Egyetem II. Belgyógyászati Klinika Endokrin Munkacsoportjának vezetőjeként, majd a Klinika igazgatójaként kutató- és gyógyító munkámban 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 témavezetőként 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, aki lausanne-i kutatásaimban volt témavezetőm, és azóta is több közös tudományos munkában működünk együtt.

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

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.