

henriettbutz_199_24

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**Új összefüggések a tumorbiológiában:
epigenetikai eltérések, mint jelátviteli módosítók**

Dr. Butz Henriett



Budapest, 2024.

henriettbutz_199_24

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés.....	6
I.1. Daganat, mint (epi)genetikai megbetegedés	6
I.2. Epigenetikai szabályozó mechanizmusok	7
I.2.1. miRNS-ek	7
I.2.2. Metiláció-demetiláció.....	11
I.3. Jelátviteli útvonalak eltérései daganatokban	15
I.3.1. Sejtciklus	15
I.3.2. AHR jelátvitel	16
I.3.3. Wnt jelátvitel.....	18
I.3.4. TGFβ jelátvitel	19
I.4. Világossejtes veserák, hipofízis és hasnyálmirigy neuroendokrin tumorok. Előfordulás, hiányzó láncszemek a patomechanizmusban és diagnosztikában.....	20
I.4.1. Világossejtes veserák.....	20
I.4.2. Hipofízis neuroendokrin tumorok	22
I.4.3. Hasnyálmirigy neuroendokrin tumorok	25
II. Célkitűzések	27
II.1. miRNS-ek általi szabályozó mechanizmusok feltárása különböző daganatokban.....	27
II.2. miRNS-ek, mint potenciális extracelluláris biomarkerek vizsgálata.....	27
II.3. A DNS metiláció-demetiláció, mint epigenetikai módosító mechanizmus vizsgálata hipofízis neuroendokrin tumorok viselkedésében	27
III. Módszerek	28
III.1 Felhasznált humán minták.....	28
III.1.1 Daganatszövetminták és mintaelőkészítés.....	28
III.1.2. Szérum, plazma, vizeletminták és mintaelőkészítés	29
III.1.3. In silico felhasznált minták	30
III.2. Molekuláris genetikai módszerek.....	31
III.2.1. Nukleinsav (DNS, RNS, miRNS) izolálás	31
III.2.2. Exoszóma preparálás, validálás és exoszómális RNS jelölés	32
III.2.3. Reverz transzkripció és valós idejű PCR.....	33
III.2.4 DNS szekvencia meghatározás módszerei.....	35
III.2.5. Gén és miRNS expressziós profil meghatározásához alkalmazott módszerek.....	36
III.3 Alkalmazott sejtvonalak és in vitro funkcionális vizsgálatok.....	38
III.3.1 Felhasznált sejtvonalak, tenyésztési módszerek és alkalmazott kezelések	38

III.3.2. Géntechnológiai és nukleinsav beviteli módszerek.....	40
III.3.3. In vitro funkcionális vizsgálatok	42
III.4. In vivo állatkísérletes módszerek	45
III.4.1. PitNET xenograft modell létrehozása	45
III.4.2. ccRCC xenograft létrehozása, szunitinib rezisztenciamodell vizsgálata.....	45
III.4.3. HCC xenograft létrehozása, szorafenib rezisztenciamodell vizsgálata	46
III.5. Fehérje alapú vizsgálati módszerek	46
III.5.1. Fehérje extrakció és western blot.....	46
III.5.2. Szöveti microarray blokkok készítése és kiértékelése.....	47
III.5.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok és kiértékelésük	48
III.6. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia-tandem tömegspektrometriás (HPLC-MS/MS) mérések	49
III.6.1. 5-metilcitozin és 5-hidroximetilcitozin mérése HPLC-MS/MS technikával	49
III.6.2. Szteroid hormonok mérése HPLC-MS/MS technikával.....	49
III.7. Bioinformatikai elemzések.....	50
III.7.1. A microarray adatok analízise.....	50
III.7.2. Szövetspecifikus miRNS target predikció.....	50
III.7.3. Génontológia, útvonal- és hálózatelemzés	50
III.7.4. Statisztikai analízis.....	52
IV. Eredmények és Megbeszélés.....	54
IV.1. Epigenetikai eltérésekhez kötődő mechanizmusok és jelátviteli zavarok	54
IV.1.1. A miRNS-ek és általuk befolyásolt mechanizmusok világossejtes veserák patogenezisében: aril-hidrokarbon receptor (AHR) jelátvitel, sejtprolifерáció, migráció, invázió	54
IV.1.2. A miRNS-ek szerepének vizsgálata az antiangiogén terápiával szemben kialakult rezisztenciamechanizmusokban: epithelialis-mezenchimális átmenet és tumorsejtek általi érbefogás (kooptálás).....	68
IV.1.3. A szöveti miRNS-ek sejtciklusban és mitokondriális funkcióban betöltött szerepének analízise hipofízis neuroendokrin tumorokban.....	80
IV.1.4. A glükokortikoid receptor-miRNS-Wnt szabályozás működésének vizsgálata hormonérzékeny daganatokban	88
IV.2. miRNS-ek, mint potenciális extracelluláris biomarkerek vizsgálata	94
IV.2.1. Vizelet exoszomális miRNS-ek azonosítása, mint diagnosztikus biomarkerek és parakrin mediátorok világossejtes veserákban.....	94

henriettbutz_199_24

<i>IV.2.2. A keringő (plazma és exoszómális) miRNS-ek mint potenciális tumormarkerek elemzése PitNET daganatokban.....</i>	<i>101</i>
<i>IV.2.3. A diagnosztikus pontosság növelése keringő miRNS-ek segítségével metasztatikus hasnyálmirigy neuroendokrin tumorokban.....</i>	<i>109</i>
IV.3. A DNS metiláció-demetiláció, mint epigenetikai módosító mechanizmus vizsgálata hipofízis neuroendokrin tumorok viselkedésében	118
<i>IV.3.1. A DNS metilációs-demetilációs eltérések és azok klinikopatológiai paraméterekkel való összefüggéseinek vizsgálata hipofízis neuroendokrin tumorokban</i>	<i>118</i>
<i>IV.3.2. Az epigenetikai módosítók hatásmechanizmusa és potenciális terápiás alkalmazása hipofízis neuroendokrin tumorokban</i>	<i>123</i>
V. Összefoglalás: epigenetikai mechanizmusok és potenciális alkalmazásuk.....	135
V.1. Az aril-hidrokarbon receptor jelátvitel, a sejtciklus, az EMT és a TGFβ jelátvitel miRNS-ek általi szabályozása világossejtes veserákban.....	135
V.2. miRNS-ek jelentősége a szunitinib és szorafenib rezisztencia hátterében – migrációs fenotípus, EMT-szerű molekuláris folyamatok és a környező szövetek ereinek befogása	136
V.3. Szöveti miRNS-ek, mint sejtciklus és mitokondriális funkció szabályozók hipofízis neuroendokrin tumorokban	137
V.4. miRNS-ek potenciális alkalmazása folyadékbiopsziából, mint diagnosztikus biomarkerek	138
V.5. A DNS metiláció-demetiláció ciklus eltéréseinek összefüggése hipofízis neuroendokrin tumorsejtek biológiai viselkedésével	139
VI. Következtetések	141
VII. Eredeti megfigyelések, új megállapítások	142
VIII. Irodalomjegyzék	144
IX. Köszönetnyilvánítás	165
X. Saját közlemények és tudománymetria adatok	167
X.1. Az értekezés alapját képező, a PhD fokozat elnyerése után született közlemények	167
<i>X.1.1. Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények</i>	<i>167</i>
<i>X.1.2. Lektorált magyar nyelvű közlemények</i>	<i>168</i>
<i>X.1.3. Könyvfejezetek.....</i>	<i>168</i>
X.2 Egyéb, a PhD fokozat elnyerése után született közlemények.....	169
<i>X.2.1. Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények</i>	<i>169</i>
<i>X.2.2. Lektorált magyar nyelvű közlemények</i>	<i>172</i>
<i>X.2.3. Könyvfejezetek.....</i>	<i>172</i>
X.3. A PhD fokozat elnyerése előtt született közlemények	172

henriettbutz_199_24

<i>X.3.1. Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények.....</i>	<i>173</i>
<i>X.3.2. Lektorált magyar nyelvű közlemények.....</i>	<i>173</i>
X.4. Tudománymetriai adatok (MTMT2, 2024.05.19).....	173

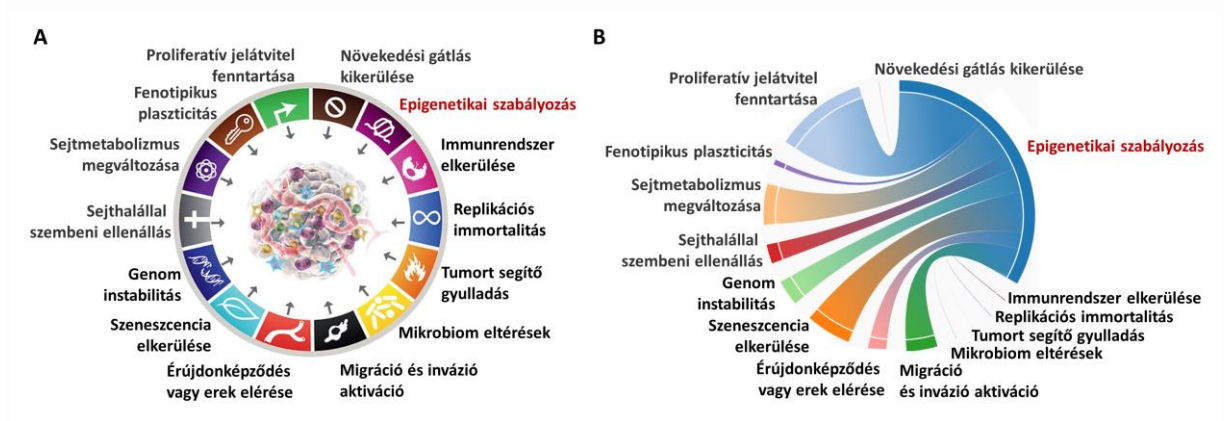
I. Bevezetés

I.1. Daganat, mint (epi)genetikai megbetegedés

Régóta ismert, hogy a daganatok kialakulásában a DNS szekvenciájának megváltozása („mutáció”) alapvető szereppel bír, elsőként a kutatások a daganatok genetikai alapjaira összpontosítottak. Nem véletlen, hiszen, funkciónyerő mutációk az ún. proto-onkogénekben, vagy funkcióvesztő genetikai elérések tumorsuppresszor génekben elindíthatják a daganatkialakulás folyamatát és/vagy támogatják a progressziót [1].

Az 1990-es éveket követően egyre nagyobb figyelem irányult arra a felismerésre, hogy az epigenetikai változások is kritikusak lehetnek a tumorigenezisben, és daganatok nemcsak elromlott funkciójú gének, hanem kóros génexpresszió következtében is kialakulhatnak, amelyben a többséjtű szervezetek homeosztázisát szabályozó komplex hálózatok működése zavart szenved, lehetővé téve a sejtek növekedését anélkül, hogy a szervezet egészének igényeit figyelembe vennék [2]. Az a felismerés, hogy különböző sejt szabályozási útvonalak számos daganattípusban érintettek kulcsfontosságú koncepció, amelyet elsőként Hanahan és Weinberg fogalmazott meg 2011-ben [3]. Az általuk leírt daganatok alapvető jellemzőinek száma („cancer hallmarks”) azóta nő, a 2022-ben megjelent közleményben már 14 olyan tumor sejtek által szerzett funkcionális jellemzőt foglaltak össze, amelyek elengedhetetlenek a rosszindulatú daganatok kialakulásához, mivel lehetővé teszik az egészséges állapotból a neoplasztikus/növekedési állapotba való transzformációt [4]. Ezek között a tulajdonságok között szerepel immár az epigenetikai eltérések jelenléte, amely komplex szabályozó mechanizmusként hatással van az összes többi daganatjellemzőre is (1. ábra). Valóban az utóbbi években számos összefoglaló közlemény jelenik meg a daganatok epigenetikai eltéréseiről, amelyeket ma már terápiás célpontoknak is tekintenek [5].

1. ábra. Daganatok jellemzői. (A) Daganat jellemzők Hanahan 2022-ben megjelent közleménye alapján [4]. (B) Publikált közlemények számának megoszlása az epigenetika és daganat jellemzők között. Az epigenetikai mechanizmusok legnagyobb mértékben a daganatsejtek proliferációját, metabolizmusát, szénescenciát és migrációját/invázióját befolyásolják. (A kördiagram a „epigenetika” és egyéb daganatjellemzők, mint kulcsszavak keresési eredményeinek számát ábrázolja 2023. 10. 16-i NCBI PubMed keresés során)



Összegezve ezen eredményeket, kijelenthető, hogy a daganatokat ma már olyannyira epigenetikai betegségnek, mint amennyire genetikai betegségnek tekintjük. Az epigenetikai változások ellentétben

pl. egy DNS mutációval, könnyen változnak, így egyfelől ezt a daganatos sejtek adaptív mechanizmusként használják, de ugyanennek köszönhetően kiváló terápiás célpontok is egyben, hiszen potenciálisan reverzibilisek és epigenetikai terápiával visszaállíthatók normál állapotukba [6, 7].

I.2. Epigenetikai szabályozó mechanizmusok

A kromatin nukleosómák ismétlődő egységeiből áll, amelyek négy hiszton fehérje (H3, H4, H2A és H2B) oktamerje köré csavardott, nagyjából 140-150 bázispár DNS-ből állnak [8]. A kromatin szerkezetét módosító epigenetikai mechanizmusokat négy fő kategóriába sorolják: i) DNS-metiláció, ii) kovalens és iii) nem kovalens hiszton módosulások, valamint iv) nem kódoló RNS-ek, beleértve a mikroRNS-eket (miRNS) [8]. Ezek a módosító tényezők együttesen regulálják a genom működését, a gének kifejeződését (génexpressziós mintázatot) a kromatin helyi szerkezeti dinamikájának megváltoztatásával, elsősorban annak hozzáférhetőségét és tömörségét szabályozva. A metilációs és kromatin állapotok finom szerveződése szabályozza a génexpressziós minták normál homeosztázisát, melyet a miRNS-ek által képviselt finomhangoló szabályozás (ún. „fine tuning”) egészít ki. Ezeknek a módosításoknak az összessége meghatároz egy epigenetikai tájképet (epigenetic „landscape”), amely jellemző fajra és szövettípusra, különböző fejlődési szakaszokra és betegségállapotokra, beleértve a daganatokat [9].

Az epigenetikai szabályozás tehát különböző szinteken valósul meg. Kezdve a DNS citozin bázisok metilációjával a gének promoter régiójában található a CpG szigeteken. Emellett poszttranszlációs változások jelennek meg a hiszton fehérjéken, a hisztonmódosító enzimek működésében, a fehérje hisztonjelek olvasásában, a kromatinhoz való kötődésben, vagy a nukleosóma-remodelling-ben [2]. Végül a génexpressziót a poszttranszkripcionális szinten szabályozó nem kódoló pl. miRNS-ek is befolyásolják. Ezek közül vizsgálatainkban a miRNS-ek által közvetített géncsendesítési mechanizmusokat és a DNS metiláció/demetiláció folyamatát vizsgáltuk részletesebben.

I.2.1. miRNS-ek

A humán genom, megközelítőleg 1%-a kódol fehérjét. A nagy áteresztőképességű RNS-szekvenálási technológiák széles körben történő alkalmazásával kiderült, hogy az emberi genom ~90%-a nem-kódoló RNS-ekre (ncRNS) íródik át kisebb-nagyobb mennyiségben [10]. Ennek megfelelően az összes transzkriptumnak csak 1-2%-a származik fehérjekódoló génekből [11]. Korábban a fehérjét nem kódoló transzkriptumokat „szemétnek” vagy transzkripció zajnak tekintették [12]. Mára azonban bebizonyosodott, hogy a nem kódoló RNS-ek fontos szerepet játszanak a sejt- és RNS-homeosztázisban. Az ncRNS-ek családját sokféleképpen osztályozzák, többek között genomi pozíció, hatásmechanizmus vagy méret alapján [13]. Méret alapján megkülönböztetik a kis (<200 nukleotid, (nt)) és hosszú (>200 nt) ncRNS-eket. A kis ncRNS-ek közé tartoznak a miRNS-ek, amelyek a ncRNS-ek legelterjedtebben vizsgált osztálya [13]. Ezek rövid (kb. 19-25 nt hosszú) nem kódoló RNS molekulák, melyek epigenetikai módosítóként poszttranszkripcionális módon szabályozzák a génexpressziót.

1.2.2.1. Biogenezis és funkció

A miRNS-eket kódoló gének a fehérjekódoló gének intronjain belül vagy intergenikusan helyezkedhetnek el. Előfordulnak individuálisan vagy a genomban csoportosulva (klaszterben), amikor hosszú transzkriptumok részeként átíródva, több koordináltan kifejeződő miRNS-t foglalnak magukban. Az RNS-polimeráz II általi átírást követően érési folyamaton mennek keresztül a sejtmagban és a citoplazmában (2. ábra) [14]. A sejtmagban a primer miRNS-transzkriptumokat (pri-miRNS) egy RNáz III (Drosha) tartalmú komplex hasítja, melynek eredményeként egy ~60-70 nt hosszú prekursor-miRNS (pre-miRNS) keletkezik, amelyet hajtű-szerű másodlagos szerkezet jellemez. A pre-miRNS molekulák ezután az Exportin-5 segítségével jutnak a citoplazmába, ahol egy másik RNáz III enzim (Dicer) ezeket ~21 nt hosszúságú érett (kettős szálú) miRNS-ekké hasítja (2. ábra) [14]. Ezt a folyamatot nevezik kanonikus biogenezisnek, de emellett több, nem-kanonikus folyamatot is leírtak. Vannak miRNS-ek, amelyek kikerülve a Drosha vagy Dicer enzimeket processzálódnak, pl. gének intronjaiból kiasítva (ún. miRtron-okból splicing mechanizmussal) vagy az Dicer helyett az Argonauta 2 fehérje által hasítva (Drosha vagy Dicer független biogenezis). Emellett a kis magi RNS-ekből és transzfer RNS-ekből is képződhetnek érett miRNS-ek (snoRNA-derived RNAs: sdRNAs; tRNA-derived RNAs: tdRNAs), melyek ugyanúgy a miRISC (miRISC, miRNA induced silencing complex) komplexben fejtik ki csendesítő hatásukat [15, 16].

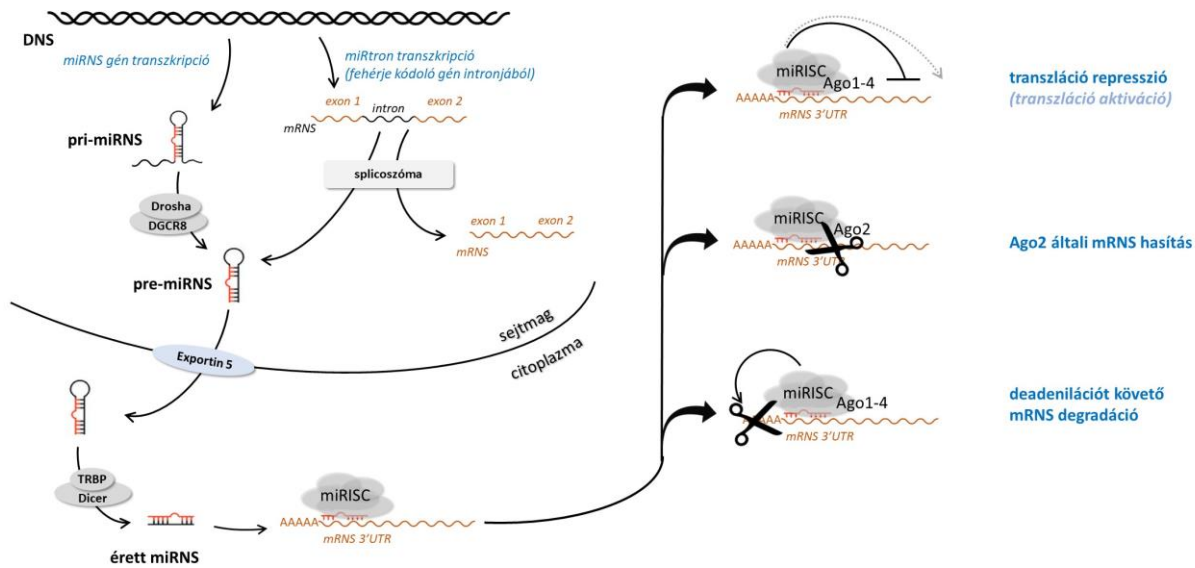
Az érett miRNS duplex egyik szála (vezető szál vagy érett miRNS) beépül a miRNS-indukált csendesítő komplexbe (miRISC), míg a másik szál (utas vagy „passanger” szál, vagy a korábbi nomenklaturában *-gal jelölt szál) általában lebomlik. A miRISC-komplexben a miRNS bázispárosodás szabályainak többé-kevésbé megfelelően – mivel a lötyögés megengedett – interakcióba lép az hírvivő RNS (messenger vagy mRNS) molekulák 3' nem-átíródo régiójával (3'UTR, 3' untranslated region), és három fő folyamaton keresztül: az mRNS hasítása, az mRNS degradációja deadenilációval vagy a transláció beindulásának gátlása révén (2. ábra) elnyomja az mRNS expressziót. Egyes különleges esetekben a miRNS-ek a génexpressziót is fokozhatják [17, 18].

A miRNS-ek szerepe elsősorban a génexpressziós szintek optimalizálásában (ún. "finomhangoló" szerep) és az adaptív génexpressziós szabályozás biztosításában rejlik. Becslések szerint az összes fehérjekódoló gén körülbelül 30-50%-át szabályozhatják miRNS-ek. Mivel egy miRNS potenciálisan több transzkriptet céloz meg, és egy-egy gén expresszióját számos miRNS szabályozhatja, a nettó expressziós eredmény a vonatkozó miRNS-mRNS (miRNS-target) hálózat eredménye [19–21].

2. ábra. miRNS biogenezis és funkció (részleteket lásd a szövegben)

DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene 8, a Drosha mikroprocesszor komplex tagja;

TRBP: TAR-RNA binding protein, a Dicer RNáz kofaktora



1.2.2.2. miRNS-ek szerepe daganatokban

Attól függően, hogy mi a célmolekulájuk (target), elősegíthetik vagy elnyomhatják a daganatok fejlődését és progresszióját, így megkülönböztetünk onkomiR-eket és tumorszupresszor hatású miRNS-eket. A miRNS-ek felfedezését követően 2002-ben Calin és munkatársai elsőként írtak le kapcsolatot a miRNS-ek és humán daganatok között [22]. Kimutatták, hogy B-sejtes krónikus limfocitás leukémiában egy gyakran deléciót szenvedő kromoszómarégióban (13q14) a miR-15 és miR-16 csökkent expressziója meghatározó szereppel bír a daganatkialakulás szempontjából. Azóta számos egyéb tumorszupresszor és onkomiR került leírásra, melyek hatását funkcionális vizsgálatokkal igazolták [23].

A daganatokban kimutatható miRNS eltérések hátterében az esetek felében kromoszómális vagy DNS szintű eltérések mutathatók ki, úgymint genomi deléciók, amplifikációk. Emellett azonban a Drosha és Dicer enzim funkcióinak eltéréseit is leírták, pl. petefészek, húgyhólyag, gyomor vagy méhnyakrák esetében [23].

A daganat stádiuma a betegség diagnosziskor jelentősen befolyásolja a kiújulás, a progresszió és a halál kockázatát. Számos daganattípus esetében jelenleg hiányoznak a korai felismerési módszerek vagy szűrővizsgálatok, így a korai felismerés kérdése ígéretes terület a miRNS-alapú diagnosztika számára. Mivel miRNS expressziós mintázat rendkívül jellemző a sejtípusra és a miRNS-ek eltérően fejeződnek ki a normál és a rákos sejtek között, így a miRNS-ek segítséget nyújthatnak pl. olyan daganattípusok beazonosításában, ahol a szövettan nehézségekbe ütközik. Például amikor a biopsziával vagy citológiai kenettel gyűjtött daganatos sejtek kis mennyisége megnehezíti a szövettani diagnózist, és jelentősen növeli a vizsgálok közötti variabilitást. Tüdőrák esetén több ilyen vizsgálatban bizonyították a miRNS-ek hasznosságát [24–26]. Emellett a szövettani altípusok miRNS-alapú vizsgálatokkal történő osztályozásának képességét sikeresen bizonyították veserák, mellhártya

(mesothelioma) és más daganattípusok esetében is [27, 28]. A szövetspecifitás nagy potenciállal rendelkezik az ismeretlen elsődleges eredetű (cancer of unknown primary, CUP) vagy bizonytalan eredetű rák diagnosztizálásában is, mivel a tumorszövet eredete kulcsfontosságú a megfelelő kezelési terv kiválasztásához [24]. A diagnosztika mellett a prognózis meghatározása szintén fontos feladat. Olyan daganatok esetében, ahol a malignitás nehezen vagy nem ítéltető meg a szövettani vizsgálatokkal (pl. feokromocitóma) a miRNS-eknek szintén fontos szerep juthat.

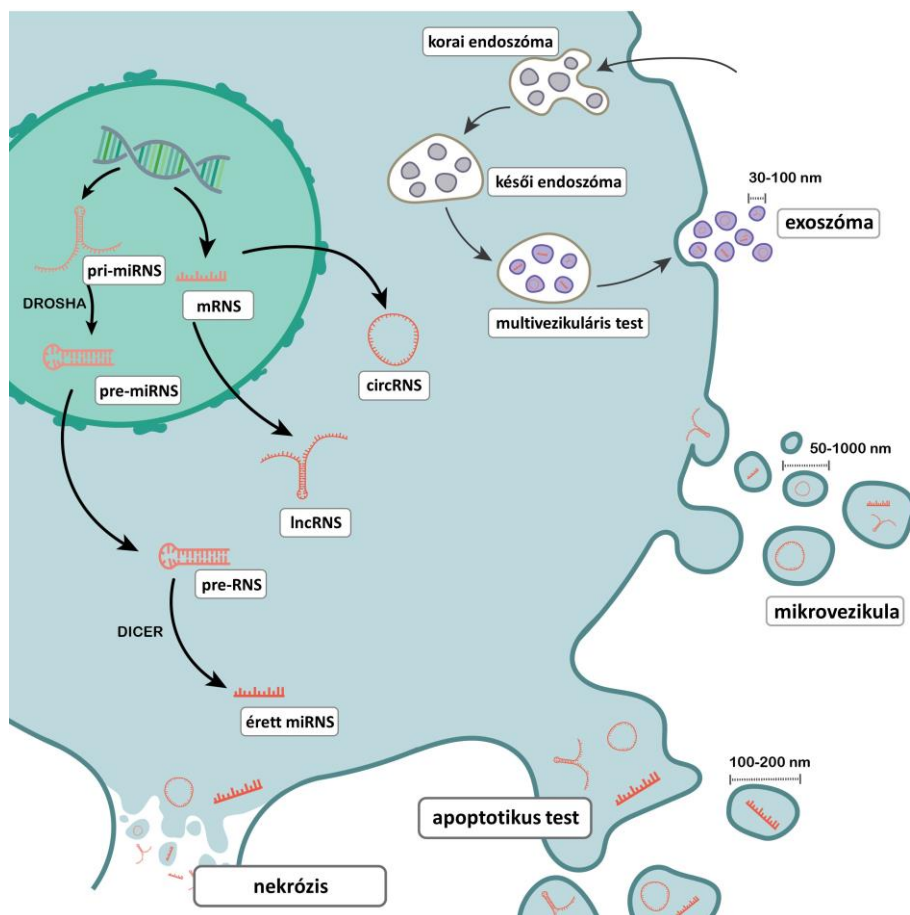
1.2.2.3. Extracelluláris miRNS-ek, mint potenciális biomarkerek

Az miRNS-ek extracelluláris térben való jelenlétének felfedezése korábban fel nem ismert új miRNS funkciók létezésére hívta fel a figyelmet. Valóban, a miRNS-ek kimutathatók a legkülönbözőbb folyadékbiopsziás mintákban, többek között a szérumban, a plazmában, a nyálban és a vizeletben [29]. Emellett a testnedvek különböző (sejtes és sejtmentes) kompartmentjei is tartalmazhatnak ncRNS-eket [30]. Bár az extracelluláris tér nagy mennyiségben tartalmaz RNáz-okat, a miRNS-ek viszonylag ellenállóak a nukleolitikus degradációval szemben [31, 32]. Az extracelluláris tér miRNS-ei szerepet játszanak a sejtek közötti kommunikációban, mivel hormonszerű molekulaként működhetnek, és parakrin vagy endokrin módon befolyásolják a különböző sejtek viselkedését [33].

A miRNS-ek az extracelluláris térben membránvezikulákban (exoszómák, mikrovezikulák és apoptotikus testek), RNS-kötő fehérjékhez vagy lipoprotein komplexekhez (nagy sűrűségű lipoprotein, HDL) kötve találhatóak [18, 32]. Az exoszómák kis méretű vezikulák (30-100 nm), amelyek endoszómákból származnak, és az intraluminális vezikulákat tartalmazó multivezikuláris testek plazmamembránnal való összeolvadásával szabadulnak fel a sejtől. A mikrovezikulák nagyobb méretűek (100-1000 nm), és a plazmamembránból történő lefűződéssel keletkeznek. Az apoptotikus testek (500-2000 nm) az apoptózisban lévő sejtekből szabadulnak fel, és szintén tartalmaznak többek között miRNS-eket is (3. ábra). Míg a mikrovezikulák és az apoptotikus testek citoplazmatikus tartalmat tükröznek, addig az exoszómák miRNS-profilja eltér a szülősejtétől, és egy szelektív szortírozás eredményeként alakul ki. Az extracelluláris vezikulák a sejtek közötti kommunikáció egy formáját jelentik, mivel miRNS tartalmuk valószínűleg membránreceptorokon keresztül felvehető a befogadó sejtekbe, és a hormonokhoz hasonlóan autokrin, parakrin és esetleg endokrin módon fejtik ki hatásukat [18, 34].

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) mellett a keringő miRNS-ek jelentős része ribonukleoproteinekhez (RNS kötő fehérjékhez) vagy protein komplexekhez kapcsolódik [32]. RNS-kötő fehérjéket azonosítottak, amelyek a miRNS-ekkel együtt szabadulnak fel, például az ArgonAUTA 2 (Ago2), amely az RNS-indukált csendesítő komplex működésében és a miRNS-mediált géncsengesítésben játszik szerepet, valamint a nukleofoszmin 1 (NPM1) és a nukleolin, amelyek a riboszómák nukleáris exportját szabályozzák. [38]. Ezek a fehérjék megvédik a miRNS-eket az RNáz-közvetített degradációtól, és stabilizálják a keringő miRNS-eket. Ezenkívül az extracelluláris miRNS-eket alacsony (LDL) és magas sűrűségű lipoproteinekben (HDL) is kimutatták [18, 35, 36].

3. ábra. miRNS-ek kikerülése az extracelluláris térbe (részleteket lásd a szövegben)



Bár számos tanulmány kiemeli az miRNS-ek sejtek közötti kommunikációban betöltött funkcióját, pontos biológiai jelentőségük a mai napig nem tisztázott [18]. Mindazonáltal a miRNS-ek testfolyadékokban történő expressziós mintázata nagymértékben korrelál bizonyos fiziológias és patofiziológiai állapotokkal, ezért gyakran felvetődik szerepük, mint potenciális biomarkerek [13, 37]. Ezt magyarázza az is, hogy az extracelluláris miRNS-ek stabilak a hőmérséklettel, a szélsőséges pH-változásokkal vagy az ismételt fagyasztási-olvasztási ciklusokkal szemben kis méretük, vagy az EV-k által védett jellegük miatt [13, 31, 38].

1.2.2. Metiláció-demetiláció

1.2.2.1. Metiláció-demetilációs ciklus és annak szabályozása

A DNS-metiláció talán a legszélesebb körben tanulmányozott epigenetikai szabályozó mechanizmus emlősekben és emberben. Stabil géncsendesítő mechanizmust közvetít, amely fontos szerepet játszik a génexpresszió és a kromatin architektúra szabályozásában a többi epigenetikai mechanizmussal karöltve [9]. Az emlősekben a DNS-metiláció elsősorban a citozin bázison valósul meg kovalens módosulással, a bázis 5-ös pozíciójában, az ún. CpG dinukleotidokon. Kísérletes adatok alapján az összes citozin körülbelül 3-4% -a metilált a normál emberi DNS-ben. A CpG dinukleotidok azonban nem egyenletesen oszlanak el az emberi genomon, hanem rövid DNS-szakaszokban, úgynevezett "CpG-szigetekben" (CGI: CpG island) és nagy ismétlődő szekvenciák régióiban koncentrálnak (pl. centromer ismétlődések, retrotranszpozon elemek, rDNS stb.) [39, 40]. A CpG-

henriettbutz_199_24

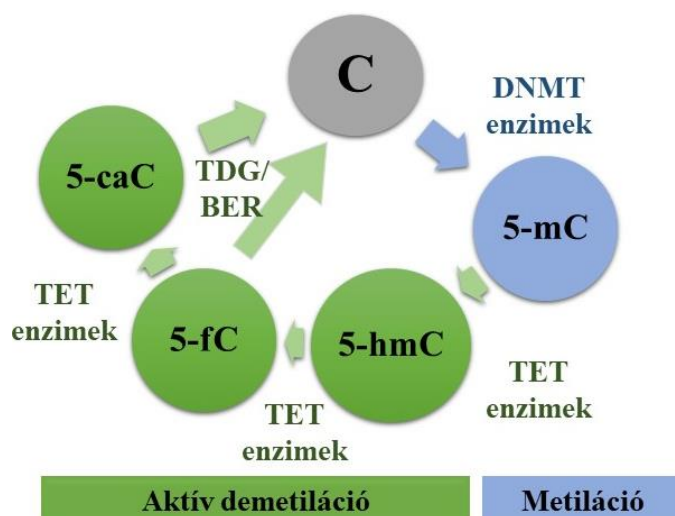
szigetek elsősorban a gének 5' végén helyezkednek el, és az emberi génpromóterek ~60% -át foglalják el [41]. Az itt található CpG-szigetek szövettípustól függően metiláltak, vagy nem metiláltak és meghatározzák a sejtspecifikus génkifejeződést. Emlősök esetében a CpG szigetek 70-80%-a metilált és körülbelül 21%-a változik dinamikusan a sejt típusától és funkciójától függően. A nem-promoter régiókban található CpG szigetek általában nem az aktív gének működését befolyásolják, hanem feladatuk pl. nagy repetitív szekvenciák, pszeudogének, transzpozonok és endogén retrovírus szekvenciák elnémítása. Emellett szerepet játszanak az imprintált génkifejeződés, az X-kromoszóma inaktiváció és a csíravonal-specifikus gének szabályozásában is [42].

A DNS metilációjának kialakításában az 'író' funkciót a DNMT (DNA methyltransferase) enzimsalád végzi (emberben a DNMT1, DNMT3A és DNMT3B), ahol a metildonor szerepét az S-adenozilmetionin (SAM) tölti be [43]. A DNMT1 a sejtosztódás során a replikációt követően aktív. A hemimetilált DNS-hez kötve a metilációs mintázat másolásával a sejtmemória fenntartásáért felelős. A SAM mellett a DNMT1 fontos kofaktora az UHRF1 (Ubiquitin Like With PHD and Ring Finger Domains 1), amely a DNS molekulához való kötésért, a hemimetilált régiók felismeréséért felelős. A kofaktor hiánya a genom 5-metilcitozin (5mC) mennyiségének csökkenéséhez vezet [44]. A DNMT3A és DNMT3B *de novo* metilációért felelős fehérjék aktivitása általános, nem CGI szelektív, és az egyedi metilációs mintázat kialakítását biztosítja. A DNMT enzimek aktivitása poszttranszlációs szinten szabályozott, különböző pozíciókban történő metiláció és foszforiláció által [43, 45].

A DNS metilációja nem egyirányú folyamat, dinamikusan változik a sejtciklus és a sejt differenciálódás során. A demetiláció aktív vagy passzív módon is történhet. Passzív módon az 5mC amino csoportját elvesztve timinné alakul, amit a DNS hibajavító enzimek (TDG: a timin-DNS glikoziláz és BER: báziskivágásos hibajavítás) eliminálnak. Az aktív, enzimatis demetiláció több lépcsős oxidációt követően valósul meg (**4. ábra**). Az első lépéseket a 2-oxoglutarát függő dioxigenáz család tagjai a TET (Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenases) enzimek katalizálják, így ezek a metilcsoportok 'törlői'. 5mC-ből első lépésben 5-hidroximetilcitozin (5hmC), majd 5-formilcitozin (5fC), végül 5-karboxicitozin (5caC) keletkezik (**4. ábra**). Az 5fC és 5caC citozinra történő cseréjét a TDG/BER enzimek végzik. A TET enzimsalád oxidációs aktivitásához az UHRF2 kofaktor jelenléte szükséges, feladata az 5hmC nukleotidok felismerése. Az 5mC oxidált formáinak mindegyikéhez köthetők specifikus 'olvasók', melyek önálló epigenetikai jellegként befolyásolják a génkifejeződést [46].

Az 5mC mellett a másik stabil, nagyobb mennyiségben jelenlevő citozin intermedier az 5hmC. Mennyisége a sejtciklus során számottevően nem változik, azonban nagyban eltér a különböző szövettípusokban [47]. Általában a genom teljes citozin mennyiségének kevesebb, mint egy százalékát teszi ki, de mennyisége szövettípus függő (pl. agy: 0,7%; vese: 0,4%; szív: <0,1%) [48]. Magas CpG tartalmú helyeken, mint a promoter vagy enhancer régiók nagy mennyiségben van jelen [47].

4. ábra. Metiláció-demetiláció ciklus (részleteket lásd a szövegben). DNMT: DNS N-methyl transferase; TET: Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenases; TDG: thymine DNA glycosylase; BER: base excision repair; 5mC: 5-metil citozin; 5hmC: 5-hidroximetil citozin; 5fC: 5-formil citozin; 5caC: 5-karboxil citozin



A TET enzimek szabályozása poszttranszlációs szinten foszforilációval, illetve glikozilációval történik. Működésüket kompetitív inhibitoroként gátolják a citrát kör onkometabolikus hatással is rendelkező intermedierei (szukcinát, fumarát), valamint a daganatokra jellemző oxigén hiányos közeg. A citrát kör köztitermékeinek érintettsége miatt a résztvevő enzimek hatással vannak a DNS demetilációjára, így azok genetikai eltérései (szukcinát-dehidrogenáz, fumarát-hidroláz, izocitrát-dehidrogenáz gének mutációi) nagyban befolyásolhatják a DNS metilációs/demetilációs státuszát [49].

1.2.2.2 Metiláció-demetiláció szerepe daganatokban

A néha 5. bázisnak is nevezett 5-metilcitozin (5mC) eloszlási mintázata más a daganatokban a normál sejtekhez képest, legalább három aspektusban [2]. Az első különbség a daganatos sejtek genomjának általános hipometilációja. Emellett fokális hipermetiláció detektálható a TSG promótereiben. A harmadik fontos szerep pedig az 5mC-ok közvetlen mutagenezise dezaminációval (spontán vagy környezeti hatásra). Mindhárom változás általában egyidejűleg fordul elő és járul hozzá a daganatok kialakulásához, ami arra utal, hogy a DNS metiláció megváltozott homeosztázisa központi szerepet játszik a tumorigenezis folyamatában [2].

Az elmúlt évek kutatásai alapján elmondható, hogy az 5mC mellett annak oxidált formáinak, főként az 5hmC megváltozott mennyisége a karcinogenezis korai jele közé tartozik. Míg általánosságban az 5mC mennyiségének növekedése, addig az 5hmC csökkenése társul rosszabb prognózissal. Ennek lehetséges okaként a citrátkör IDH (Isocitrate Dehydrogenase) enzimeinek megváltozott aktivitását, így az onkometabolitok felhalmozódását, vagy a katalizáló enzimek defektusát említik [50]. A DNMT3A mutációja akut mieloid leukémia, mielodiszpláziás szindróma, mielofibrózis és krónikus mielomonocitás leukémia kialakulásához, a TET1 mutációja kevert vonalú leukémia, a TET2 defektusa akut mieloid leukémia, mieloproliferatív neopláziák, szisztémás masztocitózis, mielodiszpláziás szindrómához és krónikus mielomonocitás leukémia hátterében állhat [51]. Az

úgynevezett metilált CpG sziget fenotípus (CIMP) megjelenése mögött a TET enzimek csökkent mennyisége révén csökkent demetilációt feltételeznek vastagbél daganatok kapcsán végzett vizsgálatokban [51, 52].

1.2.2.3. Demetilációs intermedierek, mint tumormarkerek

Míg a DNS metiláció gyakran vizsgált epigenetikai eltérés, a DNS demetilációjára vonatkozó irodalmi adatok szegényesek, illetve ellentmondásosak, melynek oka a mechanizmus összetettsége mellett a citozin intermedierek elkülönítésének nehézsége és az eltérő mérési technikák felhasználása [53]. A DNS metilációjának kimutatási módszerei három alapelven működnek: restrikciós enzimek specifikus metilált motívumok felismerése és hasítása, a fehérjék affinitásbéli különbsége immunoprecipitációban, vagy a kémiai reakción alapuló nem-metilált citozinok biszulfid konverziós módosítása. E módszerek valamelyikének kombinációja DNS szekvenálással vagy microarray technikával a DNS metiláció legelterjedtebb vizsgálómódszerei közé tartoznak [54].

A kisebb genomi szakaszok vizsgálatánál leggyakoribb, arany standardnak számító technika a biszulfid konverziót követő Sanger szekvenálás, míg a teljes genomi vizsgálatokhoz a biszulfid konverziót követő új generációs szekvenálás (WGBS). Hátránya, hogy alapja a nem metilált citozin nukleotidok konverziója uracillá (U), melyek polimeráz láncreakciós (PCR) sokszorozást követően timinként (T) jelennek meg a szekvenciában, tehát citozin nukleotidként csak az 5mC-ok olvashatók. Ez a jelenség a DNS fragmentálódása mellett szintén nehézséget okoz a szekvencia illesztésében, mely kifejezetten nehézkes az alacsony komplexitású DNS szakaszokon. A nagy áteresztőképességű technika hátránya a célzott DNS szakasz vizsgálatához képest a DNS szakaszok csökkent és nem homogén lefedettsége, valamint a technika komplexitása és magas költsége [53, 54].

A különböző (gyöngyös vagy array) hibridizációs technikák jól definiált, specifikus régiók (promoter, enhancer és 3' át nem íródó régiók) vizsgálatára alkalmasak biszulfid konverziót követően. Ez is nagy áteresztő képességű technika, azonban költséghatékonyabb a WGBS-nél, és a mérés precíz végrehajtása sem kíván kiemelkedő szaktudást, mint az új generációs szekvenálási technika [53, 54]. Hátrányát az előre kijelölt próbaszetek képviselik, melyek meghatározzák a vizsgálható régiókat. Sajnos a biszulfid konverzió alapuló technikák nem képesek megkülönböztetni a különböző metilációs-demetilációs intermediereket, így például az 5hmC-t is 5mC-ként mérik be.

A nagy nyomású folyadék kromatográfiával összekötött tömegspektrometriás (HPLC-MS/MS) mérés előnye a többi klasszikus analitikai vizsgálattal szemben, hogy alacsony a szükséges DNS mennyiség (50 ng), és rossz minőségű DNS minták (pl. FFPE minták) vizsgálatára is alkalmas [53]. Emellett minden más technikához képest pontosabb kvantifikációt tesz lehetővé. A fenti technikák közül egyedülként a HPLC-MS/MS alkalmas egy lépésben az 5mC és 5hmC elkülönítésére. Kimondottan az 5hmC kimutatása ezen kívül vagy specifikus antitesttel, vagy az 5hmC-t szelektíven felismerő enzimés átalakításokat felhasználó kitekkel lehetséges [53, 55].

I.3. Jelátviteli útvonalak eltérései daganatokban

A genetikai és epigenetikai eltérések a daganatokban intracellulárisan jelátviteli útvonalak megváltozott működéséhez vezetnek, amelyek végső soron meghatározzák a tumorsejtek viselkedését. Az újgenerációs szekvenálás és a multiomikai elemzések terén elért közelmúltbeli eredmények rámutattak, hogy a jelátviteli útvonalak szorosan összefonódnak, és olyan komplex hálózatokat alkotnak a sejten belül, amelyek teljesebb feltérképezése segítheti a pontosabb célzott terápiák kiválasztását. Így a daganatsejtek molekuláris változásai és a kapcsolódó jelátviteli útvonalak a daganatellenes „precíziós” terápia felé nyitnak kapukat (pl. kis molekulájú inhibitorokkal vagy monoklonális antitestek az EGFR, VEGF vagy RET jelátvitel gátlására) [56].

Az legfontosabb onkogének (például *MYC*, *RAS*, *BRAF* és *KIT*) és tumorsuppresszor gének (például *TP53*, *BRCA1* és *PTEN*) felfedezése óta számos intracelluláris jelátviteli út megváltozott működését írták le a daganatokkal összefüggésben, amelyek fontos szereppel bírnak a túlélést és növekedést elősegítő sejtfolymatok végrehajtásában és szabályozásában, egyetértésben a Hanan és Weinberg által leírt daganattulajdonságokkal. Amellett, hogy önmagukban fontos szerepet töltenek be a tumorigenezisben, számos ponton egymással interakcióba lépnek, szabályozva egymás működését. A számos jelátviteli útvonal közül részletesen a sejtciklus, az Aril-hidrokarbon receptor (AHR), a Wnt és TGF β jelátviteli útvonalat érdemes részletesebben áttekinteni az eredmények bevezetéséhez.

I.3.1. Sejtciklus

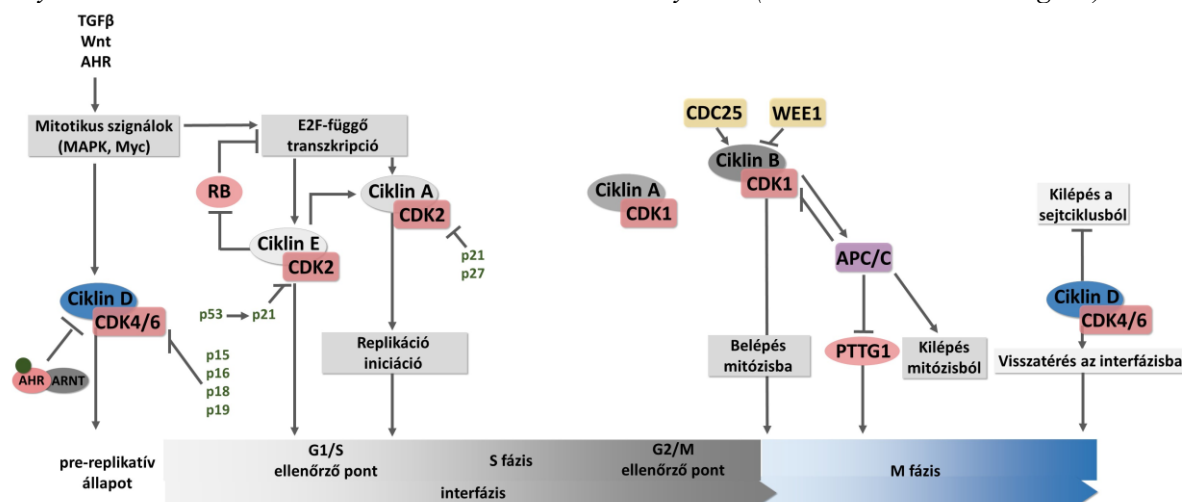
Az egyik legalapvetőbb funkció a sejtciklus szinte mindig érintett a daganatsejtekben közvetlenül vagy indirekten a genomi stabilitást szabályozó gének által, amelyet terápiásan is kihasználnak pl. CDK4/6 gátlók vagy *BRCA1/2* mutációt hordozó sejtek célzott kezelésével (poli-ADP ribóz polimeráz – PARP – inhibitorok). Végső soron minden növekedési és túlélési szignál ide konvergál, hiszen a daganat egyik fő jellemzője a sejtciklus zavart működése következtében kialakuló sejtszaporulat [57].

A sejtciklus előrehaladását a ciklinfüggő kináz (CDK) aktiváció határozza meg az interfázis és az M fázis (mitózis) során. Ennek az aktivitásnak az elvesztése a G1 fázisban és a mitózis során az APC/C (anaphase promoting complex) komplexeken keresztül a ciklinek lebomlásához vezet, következményesen a sejt visszatér az interfázisba. Az E2F-függő transzkripció mind a Ciklin E, mind a Ciklin A felhalmozódását eredményezi, amely, mintegy elköteleződést jelent az S fázisba való belépéshez (G1/S ellenőrzési pont) (5. ábra). A ciklin E-CDK2 aktivitása tovább aktiválja az E2F-függő transzkripciót, pozitív visszacsatolási hurkot hozva létre és ciklin A-CDK2 komplex kialakulását is eredményezi. Ezzel a sejt belép az S fázisba és a DNS replikáció megkezdődik. A ciklin A/B-CDK1 komplex ezt követő felhalmozódása egy második ellenőrzési ponthoz (G2/M) vezet az S fázis befejeződését követően. A CDC25 foszfatáz és WEE1 kinázok koordinált működése eredményeképp a sejt beléphet a mitotikus fázisba. A mitotikus kilépéshez az APC/C-CDC20 komplex aktiválása és a ciklinek célzott lebomlása szükséges a sejtciklus befejezéséhez. Amennyiben a növekedési/túlélési szignálok fennállnak, a ciklin D-CDK4/6 komplex felhalmozódása és aktivációja lehetővé teszi a sejtek

henriettbutz 199 24

számára, hogy újra belépjenek a sejtciklusba, illetve megakadályozza a sejtciklusból való kilépést [57, 58] (**5. ábra**).

5. ábra. A sejtciklus szabályozása. A sejtciklust a ciklinek ciklin-dependens kinázokkal (CDK) alkotott komplexei szabályozzák. A gátló molekulák p15, p16, p18, p19, p21, p27 és p53 zölddel jelöltek. APC/C: anaphase promoting complex, PTTG1: Pituitary-tumor transforming gene által kódolt fehérje, szekurin, mely a mitózisban a testvér kromatidák szétválását szabályozza. (részleteket lásd a szövegben)



I.3.2. AHR jelátvitel

Az aril-hidrokarbon receptor (AHR) egy ligand-aktivált transzkripció faktor, amely a klasszikusan ismert xenometabolizmusban betöltött szerepe mellett a daganatok kialakulására is hatással van. Az AHR tumorokban betöltött szerepe komplex, daganat serkentő és tumorelles aktivítását is leírták [59, 60]. A képet színesíti, hogy az AHR ligandok különböző osztályai, sőt az ugyanazon osztályba tartozó ligandok is eltérően modulálhatják az AHR-mediált biológiai folyamatokat. Ligand hiányában az AHR a sejt citoplazmájában található, komplexet képezve egy hőshock és ko-chaperon proteinekkal (heat shock protein 90: HSP90 és X-associated protein 2 vagy arylhydrocarbon receptor interacting protein: XAP2 vagy AIP). Agonista kötésakor, az AHR komplex transzlokálódik a sejtmagba, heterodimert képezve az AHR nukleáris transzlokátorral (ARNT). Ez a heterodimer képes kötödni a DNS molekulán található dioxin-érzékeny elemhez (DRE), ami sokféle gén átíródását eredményezi. Az AHR célgének közül a citokróm P450 1A1 (CYP1A1) közvetíti a xenometabolikus funkciót azáltal, hogy semlegesíti a prokarcinogén anyagokat [59] (6. ábra).

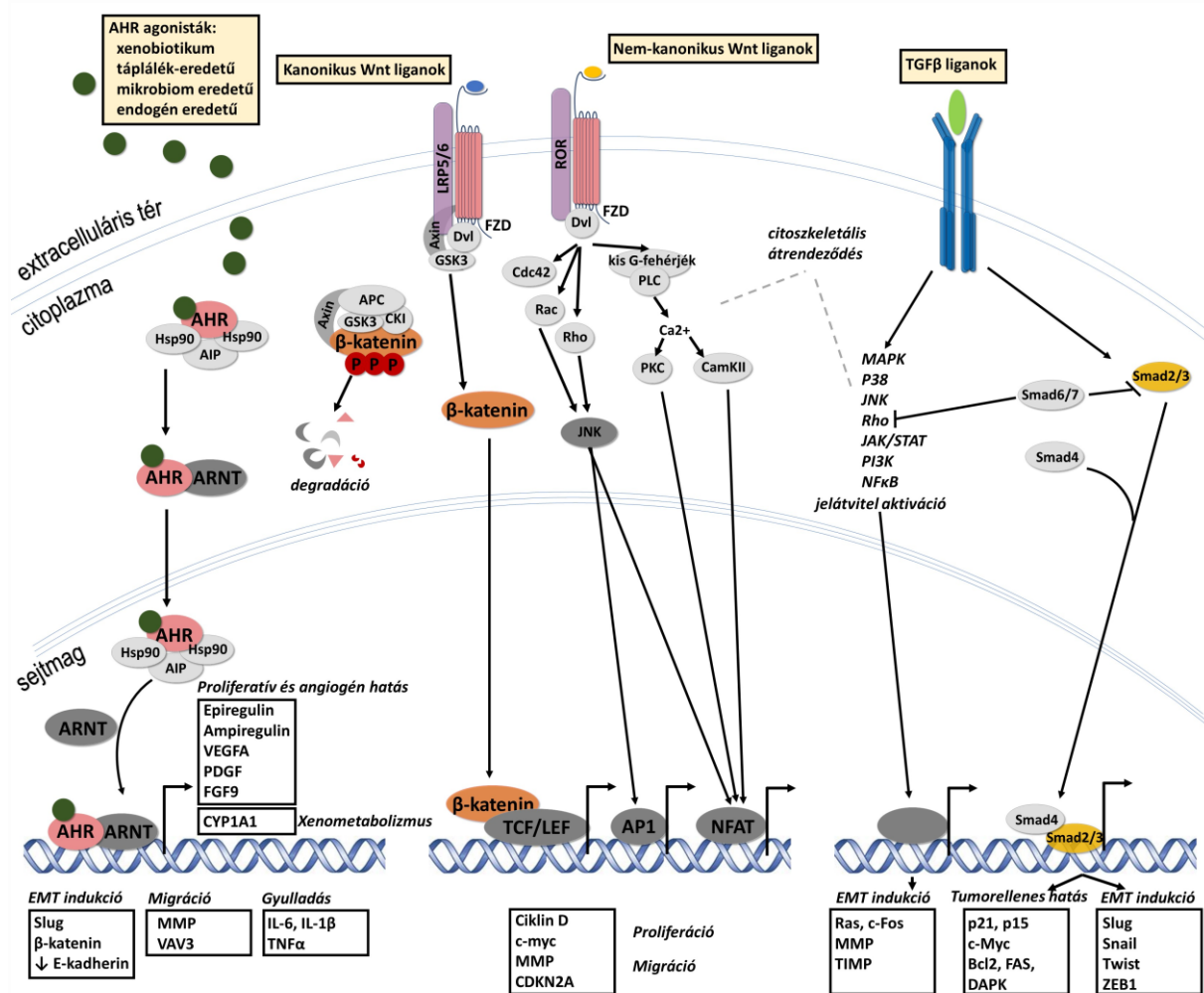
A daganatban és annak mikrokörnyezetében, amely számos sejtípusból áll, endogén AHR ligandumok termelődnek, amelyek autokrin vagy parakrin módon tartós AHR aktivációhoz vezet a daganatokban (**6. ábra**). Az AHR funkció a tumorsejtek proliferációja tekintetében függ a sejtípustól és a vizsgált mechanizmustól is. A sejt kultúra modellekben a gyulladásozó ingerek és az AHR agonisták szinergista módon indukálják az AHR célgéneket [59].

Az AHR aktivitást a daganatokban és a környező nem rosszindulatú és stromális sejtekben emelkedettnek találták, valamint endogén AHR agonista ligandokat mind a tumor, mind a stromális sejtek termelnek. Az AHR aktiváció és a gyulladásos citokin jelátvitel, amely a daganatok közös

henriettbutz_199_24

jellemzője, a gyulladásokeltő faktorok, köztük az interleukin 6 (IL6) szinergista indukcióját eredményezi, súlyosbítja a gyulladást, miközben egyidejűleg elősegíti az immunszuppresszív szabályozó T sejtek (T_{Reg}) differenciálódását az IL10 fokozott expressziója, a transzformáló növekedési faktor β (TGF β) és a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGFA) révén (6. ábra). Az AHR ligandok szisztémás és tumorlokalizált generációja, valamint a fokozott AHR expresszió és aktivitás gyulladásokeltő, mégis immunszuppresszív tumor mikrokörnyezetet hozhat létre, amely elősegíti a tumor túlélését és az immunrendszer kikerülését, s ezáltal a tumor progresszióját eredményezi [59].

6. ábra. AHR, Wnt és TGF β jelátvitel. (részleteket lásd a szövegben)



Több mechanizmus felmerült az AHR aktiváció proliferatív és antiproliferatív hatásának magyarázatára. Az AHR a mitogén növekedési faktorokat kódoló gének – például a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGFA), a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF), az epiregulin, az amphiregulin és a fibroblaszt növekedési faktor 9 (FGF9) – közvetlen transzkripciós aktivátoraként működik azáltal, hogy promótereikben kötődik a DNS-en az AHR válaszlemekhez (AHR response elements, ARE). Erős mitogénekként ezek a növekedési faktorok hozzájárulnak a tumor proliferációjához azáltal, hogy serkentik az M fázisba való belépést, és megmagyarázhatják az AHR agonista által közvetített tumorsejt-proliferációt. Ligand hiányában az AHR komplexet képez a ciklin D-vel és ciklinfüggő kinázokkal 4 (CDK4) mely elnyomja a Retinoblasztoma fehérje (RB)

foszforilációját, ami az E2F-mediált G1/S fázis progresszióját gátolja. Az AHR agonistának való kitettség kedvez az AHR-ciklin D-CDK komplex disszociációjának, lehetővé téve a sejtciklus progresszióját és a tumorsejt proliferációt [59] (**5. ábra**).

Emellett egyre több bizonyíték utal arra, hogy az AHR szerepet játszik a sejtadhézió és a migrációs potenciál modulációjában is. Érdekes módon, a sejt-sejt adhézió elvesztésével párhuzamosan fokozott átmeneti AHR nukleáris transzlokációt és aktivitást mutattak ki Jun kináz (JNK) aktiváción keresztül, amely fokozott migrációt eredményezett. Így az AHR aktiváció, akár a sejtadhézió elvesztéséből, akár agonista stimulációból ered, elősegítheti a metasztázis képzést. Úgy tűnik, hogy az AHR transzkripciós aktivitása számos pro-migrációs faktor expresszióját megváltoztatja, beleértve adhézis fehérjéket, jelátviteli adaptereket és transzkripciós faktorokat. Az AHR aktiváció epiteliális-mezenchimális átmenet (EMT) beindításához is vezet (pl. *SLUG* (*SNAI2*) expresszió, amely következményesen csökkenti az E-cadherin expressziót és a sejtadhéziót). A citoskeletális átrendeződést elősegítő mátrix metalloproteinázok (MMP-k) és intracelluláris jelátviteli faktorok (például VAV3) AHR-függő expressziója fokozza a tumorsejtek migrációs képességét (**6. ábra**). A tumorral összefüggő gyulladásos citokin jelátvitel jelenléte önfenntartó szinergikus hurkot eredményez az AHR aktiválással kombinálva, ami tovább fokozza a sejtek motilitását. Emellett az AHR célgének között növekedési és proangiogén faktorok transzaktivációja következik be, valamint az AHR agonisták tumorhoz kapcsolódó immunsejtek általi termelése elősegíti az immunuszuppresszív szabályozó T sejtek (T_{Reg}) differenciálódását, ami csillapítja az izolált mozgó tumorsejtekre adott immunválaszt, ezáltal lehetővé teszi a távoli másodlagos daganatok kialakulását [59].

1.3.3. Wnt jelátvitel

A kanonikus Wnt jelátvitelben a Wnt ligandumok hiánya (Wnt jelátvitel inaktív állapota) a β -katenin foszforilációjához vezet az ún. destruktív komplexben (Axin, APC, GSK3 β kinázok, kazein kináz (CK1 α)), amely végső soron a β -katenin ubiquitinációját és degradációját eredményezi. Amennyiben szekretált Wnt ligandumok (például Wnt3a és Wnt1) Wnt receptorokhoz (Fzd) és koreceptorokhoz (LRP5/6) kötődnek, a Wnt jelátvitel aktiválódik [61] (**6. ábra**). Ennek hatására a destruktív komplex inaktiválódik, a β -katenin stabilizálódik, majd a sejtmagba transzlokálódik, ahol aktív komplexet képez a LEF (lymphoid enhanced factor) és a TCF (T-cell factor) transzkripciós faktorokkal és számos gén átíródását eredményezi, többek között, ciklinek, c-myc, mátrix metalloproteinázok transzaktivációját, valamint gátolja a *CDKN2A* transzkripcióját). A nem kanonikus Wnt jelátvitelt (β -katenin-független) a nem-kanonikus Wnt ligandumok (pl. Wnt5a) indítják el (**6. ábra**). Az egyik nem-kanonikus Wnt útvonal az ún. Wnt/PCP (planar cell polarity) jelátvitel esetén a nem-kanonikus Wnt ligandok a ROR-Fzd receptor komplexhez kötődnek, amely kis GTPáz aktivációt követően Rho és Jun kinázokat aktiválnak. A másik nem-kanonikus Wnt útvonalban (Wnt/Ca $^{2+}$) a jelátvitelt a kis G fehérjék által indukált foszfolipáz C aktivitás indítja el, ami intracelluláris kalciumáramláshoz és következményes kalciumfüggő citoskeletális és/vagy transzkripciós válaszokat vált ki [62]. Így mindkét nem-kanonikus Wnt jelátvitel a Rac1, RhoA, PLC aktiváció, Aurora kináz A,

valamint számos egyéb transzaktivált célmolekulán keresztül a citoszkeleton átrendeződéséhez vezet, szabályozza a sejtpolaritást és a migrációt [63, 64] (6. ábra). A Wnt útvonal eltérései szinte minden daganattípusban fontos szereppel bírnak, így a hipofízis neuroendokrin tumorok, mellékvese vagy veserák esetében is kiemelik patogenetikai szerepét a proliferációban és a tumor sejtek migrációjában, inváziójában [62, 65, 66].

1.3.4. TGF β jelátvitel

A transzformáló növekedési faktor β (TGF β) jelátvitel számos sejtfunkciót szabályoz, beleértve a proliferációt, az apoptózist, a differenciálódást, az epiteliális-mezenchimális átmenetet (EMT) és a migrációt [67]. A TGF β útvonal aktivációt a receptor ligandok (TGF β , aktivin, inhibin, csontmorfogén fehérjék: BMP (bone morphogenetic factor) receptorhoz való kötődése indítja el. Ezek mindegyike a megfelelő TGF β receptorokhoz kötődik. Eddig hét TGF β RI (más néven aktivinszerű receptor kináz, ALK1–7), öt TGF β RII (TGFB2, BMP2, ACVR2, ACVR2B és AMHR2) és két TGF β RIII (betaglikán és endoglin) receptort azonosítottak. A kanonikus útvonalon a TGF β receptor-ligand kötődés indukálja az intracelluláris effektorok, a Smad molekulák foszforilációját (6. ábra). Ezeket receptor-Smad-oknak (R-Smad: Smad-1, -2, -3, -5 és -8;) nevezik, amelyek felelősek a jelátvitelért. Az R-Smad fehérjék transzlokálódnak a sejtmagba, és a TGF β célgének transzkripcióját vezénylik. A TGF β jelátvitel aktivitását befolyásolja a közös mediátor Smad (Co-Smad: Smad-4), amely szükséges a jelátvitelhez, és a gátló Smad-ok (I-Smads: Smad-6 és -7), amelyek a TGF β jelátvitel negatív visszacsatolású szabályozóiként működnek [68].

A TGF β számos egyéb jelátviteli utat is stimulál, amelyek függetlenek a Smad fehérjétől. A nem-kanonikus útvonalon az aktivált TGF β receptor komplex számos fehérjén keresztül közvetíti a jeleket, mint például tumor nekrosis faktor (TNF) receptor asszociált faktor 4 (TRAF4), TRAF6, TGF β -aktivált kináz 1 (TAK1), p38 mitogén aktivált protein kináz (p38 MAPK), p42/p44 MAPK, Rho, foszfatidilinozitol 3-kináz PI3K/AKT, extracelluláris jel szabályozott kináz (ERK), JUN N-terminális kináz (JNK) vagy nukleáris faktor-kB (NF-kB) [69] (6. ábra).

A TGF β diszregulációja jelentős szerepet játszik a karcinogenezisben. A daganatképződés korai stádiumában a TGF β tumorsuppresszív hatást fejt ki azáltal, hogy gátolja a sejtciklus progresszióját és elősegíti az apoptózist. A kanonikus útvonalon keresztül a TGF β gátolja a sejtciklus progresszióját a ciklinfüggő kináz (CDK) inhibitorok, a p21 és p15 aktiválásával. Emellett elnyom egy fontos onkogént, a c-Myc-t, amely serkenti a proliferációt és gátolja a p21 és p15 transzkripció aktiválását. Ezenkívül a TGF β apoptózist is indukál antiapoptotikus molekulák modulálásával (pl. B-sejtes limfóma-2 (Bcl-2), halálreceptor fibroblaszt asszociált antigén (FAS), növekedés gátló és DNS-károsodás-indukáló molekula (GADD45 β), sejthalállal összefüggő kináz (DAK) és kaszpázok révén). A nem-kanonikus TGF β jelátvitel szintén segíti a tumorsuppresszor hatást a p38 MAPK útvonalon keresztüli kaszpáz-8-függő programozott sejthalál aktivációjával [68, 69].

A daganatos betegségek későbbi stádiumában azonban a TGF β tumort elősegítő hatást fejt ki, növeli a tumorsejtek invazivitását és metasztatizálás képességét. A TGF β stimulálja az epiteliális-

mezenchimális átmenetet (EMT), a sejtprolifерációt, az inváziót, a metasztázist, az angiogenezist és az immunfelügyelet elkerülését [68].

Az egyik kulcsfontosságú mechanizmus, amellyel a TGF β elősegíti a sejtek migrációját, invázióját és metasztázisát, az EMT indukciója. Ez egy többlépcsős folyamat, amelyben a sejtek elveszítik az apikális-bazális sejt polaritást, és orsó alakú, fibroblasztszerű morfológiát vesznek fel, amely a mezenchimális sejtekre jellemző. Az EMT jellemzője a daganatokban az E-cadherin elvesztése és a Vimentin, Slug, Snail és a Fibronectin fehérjék fokozott expressziója, amelyek kritikusak a sejt motilitás és az invazív tulajdonságok eléréséhez, mivel lehetővé teszik a sejtek számára, hogy az extracelluláris mátrixon keresztül vándoroljanak és metasztázisokat képezzenek távoli helyeken. Az EMT indukáló jelek a tumorhoz kapcsolódó strómából származnak, amiért elsősorban a hepatocita növekedési faktor (HGF), az epidermális növekedési faktor (EGF), a vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF) és a TGF β felelősek. Ezek olyan molekulákat aktiválnak, mint a Slug, Snail, Twist, és ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1). A TGF β azonban nem-kanonikus úton is indukálja az EMT-t, pl. a b1 integrinen keresztül a p38 MAPK-val és RhoA-val együtt. Ezek a transzkripciós faktorok együttesen koreografálják az EMT-t együtműködésben egyéb útvonalakkal, mint pl. ERK, MAPK, PI3K, AKT, RhoB, β -katenin, limfoid enhancer kötő faktor (LEF), Ras, c-Fos és sejt felszíni fehérjéken (b4 integrinek, a5b1 integrin és aVb6 integrin) keresztül [69]. Mindezek mellett a TGF β elősegíti a mátrix metalloproteázok (MMP)-2 és -9 szekrécióját is, és gátolja az MMP-k szöveti inhibitorainak (TIMP-k) aktivitását is, ezzel is elősegítve a metasztázis képzést [68].

A TGF β jelátviteli útvonal szinergikus vagy antagonisztikus módon kommunikál más jelátviteli útvonalakkal is [67]. A Wnt és a TGF β útvonalak több szinten is befolyásolják egymás működését, például egymás ligand termelésének szabályozásával. A Smad7 és a β -katenin közötti fehérje-fehérje interakciót funkcionális kísérletekkel bizonyították. Kimutatták a β -katenin és a LEF Smad-okkal való együtműködését az EMT indukcióban. A TGF β és a Wnt szinergikusan elősegítette a tumorogenezist olyan géneken (*ANKRD1*, *CCND1*, *CTGF*, *GPC1*, *HS6ST2*, *IL11*, *INHBA*, *MMP14* és *ROBO1*) keresztül, amelyek nem expresszálódtak az egy liganddal kezelt sejtekben, kizárólag csak mindkét útvonal ligandjának jelenlétében [69].

A TGF β kettős szerepe közötti váltás háttérében álló mechanizmusok nem teljesen feltártak. Ok lehet a sejt ciklus pozitív szabályozóinak abnormális expressziója, például a ciklinek és ciklinfüggő kinázok (CDK), vagy a negatív szabályozók, például a CDK-gátlók, a TGF β jelátviteli inhibitorok fokozott expressziója, a *TGF β RI*, *TGF β RII*, *SMAD2* és *SMAD4* gének funkcióvesztése vagy csonkító mutációi, vagy a Ras onkogén és annak következtében fellépő ERK aktiváció, mely Smad2/3 foszforilációjához vezet a linker régióban, aminek következtében a Smad-ok a citoplazmában maradnak és ubiquitináción keresztül lebomlanak [69].

I.4. Világossejtes veserák, hipofízis és hasnyálmirigy neuroendokrin tumorok. Előfordulás, hiányzó láncszemek a patomechanizmusban és diagnosztikában

I.4.1. Világossejtes veserák

henriettbutz_199_24

Előfordulás és általános jellemzők. A veserák gyakori urológiai rosszindulatú daganatos megbetegedés, amely az összes felnőttkori rosszindulatú daganat mintegy 3% -át teszi ki. Előfordulása évente 2-4%-kal folyamatosan nő [70]. A felnőttkori veserákok túlnyomó többsége vesesejtes karcinóma (RCC), melyek 70-85%-a szövettanilag a világossejtes altípusba tartozik (ccRCC, clear cell renal cell carcinoma) [71]. A betegek legfeljebb 10%-ánál jelentkeznek jellegzetes klinikai tünetek (hematuria, hátfájás, tapintható hasi terime), többségében véletlenül kerül kimutatásra egyéb okból végzett képalkotó vizsgálat során. A betegek mintegy 30%-a már a diagnózis felállításakor áttétes stádiumban van, még klinikai tünetek hiányában is. Az áttétes betegek medián túlélési ideje 13 hónap, az 5 éves túlélési arány pedig 10% alatt van. A nefrektómián átesett betegek több mint 20%-ánál metasztázisok alakulnak ki a nyomonkövetés során. Az áttétes betegségben szenvedők esetében a prognózis rendkívül rossz a multimodális kezelési módok fejlődésének ellenére is [70, 72, 73].

Patogenezis. A sporadikus ccRCC esetek több mint 90%-a a 3. kromoszóma rövid karjának tipikus citogenetikai elváltozásait mutatja (teljes vesztés, transzlokáció, delécio), amelyek jellemzően *VHL* gén inaktiválódáshoz vezetnek, mely hatására a hipoxia jelátviteli út vonal aktiválódik. A hipoxia indukálta faktor (HIF) stabilizálódása miatt a ccRCC erősen vaszkularizált, mivel a HIF felhalmozódása az angiogenezisben részt vevő molekulák, köztük a VEGFA (Vascular Endothelial Growth Factor A) és a PDGFA (Platelet Derived Growth Factor Subunit A) transzaktivációjához vezet [73]. A miRNS-ek szerepét széles körben vizsgálták ccRCC-ban is [74]. Sajnálatos módon azonban a miRNS-expressziós profilok meghatározására irányuló különböző tanulmányok eredményei jelentős eltéréseket mutattak [75].

Célzott terápia és rezisztencia. A közelmúltban célzott terápiák (multikináz-gátlók, antivaszkuláris endotél növekedési faktor (anti-VEGF) antitestek, valamint mTOR-gátlók) váltak elérhetővé ccRCC-ben szenvedő betegek részére. Az angiogenezis-gátló szunitinib az első vonalbeli terápia volt az áttétes RCC-ben vizsgálatunk induláskor. Ez a kismolekula multi-tirozinkináz-inhibitor gátolja a VEGFR-1, -2, -3, PDGFR- α és PDGFR- β , az Fms-szerű tirozinkináz 3 (FLT3), az őssejtfaktor-receptor (KIT), a kolóniastimuláló faktor 1-es típusú receptor; és a gliasejtvonalból származó neurotrópikus faktor receptorát [76]. A szunitinib-kezelés meghosszabbította mind a progressziómentes, mind a teljes túlélést, és a szunitinibre adott válaszok aránya magasabb volt az interferonhoz képest [77–79]. A betegek körülbelül 70%-a mutatott pozitív kezdeti válaszreakciót a terápiára, de sajnos 6-12 hónap alatt a daganat rezisztenssé válik és a betegség progressziója jelentkezik [80, 81]. A szunitinib kezelésre a klinikai gyakorlatban alkalmazott prediktív marker jelenleg sem áll rendelkezésre, valamint vizsgálatunk indulásakor a rezisztencia mögött álló mechanizmusok nagyrészt feltáratlanok voltak.

A szorafenib egy másik multi-tirozinkináz és ezáltal angiogenezis gátló molekula, amely támadáspontja a VEGFR, PDGFR, valamint blokkolja a daganatsejtekben a Ras-Raf-MAPK útvonalat is [82]. A nagyon hasonló hatásmechanizmus ellenére, bár veserákban is alkalmazták, csak kis számú ccRCC-ben szenvedő beteg számára volt hatékony a szorafenib terápia, és a szorafenib rezisztencia gyakori előfordulása egyre nagyobb gátjává vált a kezelésnek [83]. Ennek ellenére előrehaladott hepatocelluláris karcinómában (HCC) a szorafenib meghosszabbította a teljes túlélést [84]. Bár a HCC

betegek 35-43%-ánál hatékony a kezelés, végül ezekben a betegekben is kialakul a szorafenib rezisztencia [84, 85]. Az angiogenezis gátlásával szembeni rezisztencia magyarázatának több elmélete létezik [85, 86]. Egyik ilyen a VEGF-független angiogenezis, amelyet számos pro-angiogén növekedési faktor és gyulladáskeltő citokinek vezérelnek, amelyek az anti-VEGF terápiával szembeni rezisztencia során szabályozódnak. Ennek a mechanizmusnak az igazolása még várat magára. Az antiangiogén terápiával szembeni rezisztencia másik lehetséges mechanizmusa az erek „koopciója”, vagyis a szövetekben már meglévő erek „befogása” a tumorsejtek által. Ezt a mechanizmust kimutatták már máj, nem kissejtes tüdő és egyéb metasztázisokban. Azonban a tumorsejtek általi érbefogás szerepéről az antiangiogén terápiával szemben szerzett rezisztencia közvetítésében vizsgálatunkat megelőzően még nem rendelkezünk információval. A ccRCC betegeknél progresszióban visszaadott szunitinib vagy szorafenib terápia („rechallenge”) meghosszabbította a progressziómentes túlélést [87]. Ez a hatás a két molekula nem teljesen átfedő kinázprofiljából, vagy az antiangiogén TKI-kkal szembeni rezisztencia reverzibilis voltából eredhet [85, 86].

Hiányzó láncszemek. Az ccRCC patogenezisét vizsgáló különböző tanulmányok eredményei olykor jelentős diszkrepanciát mutatnak. A probléma leküzdése a kísérletes megközelítés mellett több tanulmány több szintű adatainak kombinálása informatívabb lehet, mint azok egyenkénti figyelembevétele [88]. Minél több vizsgálat adatait integráljuk, az annál inkább növeli az analízisünk robusztusságát, korlátozza a nemkívánatos hatásokat és az expressziós profilok torzítását, különösen a különböző platformok összehasonlításakor [89]. Az utóbbi időben az "integrált genomika" és a rendszer szintű szemlélet, amely a molekuláris változások több szintjéről származó információkat gyűjti össze, hozzásegíthet ahhoz, hogy jobban megértsük a daganatok kialakulásának molekuláris hátterét és mintegy genomikai tájképet fest ezekről az eltérésekről [90]. Ez a megközelítés segítséget nyújthat abban, hogy tisztább képet kaphassunk a ccRCC patogenezisééről és ebbe integráljuk a miRNS-ek komplex funkcionális hatását.

A célzott terápiákkal szemben kialakuló rezisztencia mechanizmusok feltárása rendkívül fontos, mely hozzásegíthet új, adjuváns kiegészítő kezelések felismeréséhez, vagy teljesen más terápia alkalmazása felé terelhet. Ehhez megfelelő *in vitro* és *in vivo* modellek kialakítására van szükség, melyek alkalmasak nemcsak a rezisztenciamechanizmusok feltárására, hanem az új, potenciális terápiák tesztelésére is. Az invazív biopszián kívül, amely szövődményekkel járhat, jelenleg nem áll rendelkezésre olyan diagnosztikai eszköz, amely megerősítené a vesében képződővel azonosított terimék kilétét [91], és esetenként a nefrektómiát kizárólag radiológiai bizonyítékok alapján végzik el. Ezért nem invazív vizelet- vagy szérumalapú biomarkerek nagyban segítenék a ccRCC diagnózisát, és esetleg helyettesítené a biopsziát. Ebben a tekintetben az extracelluláris miRNS-ek ígéretes jelöltek lehetnek.

I.4.2. Hipofízis neuroendokrin tumorok

Előfordulás és általános jellemzők. Az agyalapi mirigy daganatai (hipofízis neuroendokrin tumorok, PitNET) az intrakraniális tumorok 10-25%-át alkotva a leggyakoribb agydaganatok közé

henriettbutz_199_24

tartoznak, előfordulási gyakoriságuk a populációban metaanalízisek alapján 1:1064 [92, 93]. Egy boncoláson és radiográfiai vizsgálatokon alapuló metaanalízis becslése szerint a lakosság körülbelül 16,7%-ánál alakulnak ki, melyek túlnyomó része feltehetően incidentaloma, amely nem okozva klinikai tüneteket, és egészen a boncolásig diagnosztizálatlan marad [94]. Bár általában jóindulatúak térfoglalásuk révén látásromlást, látótérkiesést és egyéb kompressziós tüneteket okoznak. Általában sporadikus megjelenésűek, mindössze 4-5%-ban fordul elő familiáris formájuk [95]. A PitNET daganatok csoportosíthatók méretük, hormontermelésük és agresszivitásuk alapján. Az 1 cm átmérőjűnél kisebb adenomákat mikro-, míg az ennél nagyobbakat makroadenomáknak nevezzük. Funkcionális alapon elkülönítjük a hormont termelő és nem-funkcionáló daganatokat. A PitNET-ek nagyjából fele prolaktinoma, harmada pedig nem-funkcionáló daganat. A növekedési hormont termelő (szomatotróp) tumorok kb. 10%-ot, az ACTH termelők (kortikotróp) 1-2%-ot tesznek ki. Az FSH-t, LH-t (gonadotróp), vagy TSH-t termelő (thyrotrop) PitNET-ek ennél is ritkábbak. Egyes tumorok többféle hormont is termelhetnek (plurihormonális PitNET) [96]. Nem-funkcionáló PitNET-ről akkor beszélünk, amikor a tumor választ el hormonokat a véráramba, vagy az nem okoz klinikai tüneteket, ám a szövettani vizsgálat alapján ezek jó részében immunhisztokémia pozitivitás igazolható valamelyik hormonra, ami sejteti a tumor eredetét. A morbiditás fő oka PitNET-ek esetében a térfoglalás mellett az endokrin rendszerre gyakorolt hatás. A korábban egyszerűen adenomáknak nevezett daganatok elnevezése 2017-ben a WHO ajánlására a hisztológiai és klinikai jellemzőiknek köszönhetően megváltozott, és ma már a hivatalos terminológia szerint hipofízis neuroendokrin tumorként (PitNET, pituitary neuroendocrine tumour) nevezzük őket [97]. A WHO klasszifikáció nemcsak az elnevezésben, hanem a diagnosztikában is előrelépést hozott, mivel nemcsak az elülsőlebeny hormonok, hanem transzkripciós faktorok immunhisztokémiai meghatározása is szükséges a sejtvonalak beazonosításához és a korrekt besoroláshoz (SF1 – gonadotóp vonal, Pit1 – szomatomammotóp vonal, Tpit – kortikotróp vonal). Az úgynevezett „null-cell” daganat diagnózisa, csak ezen festődések hiányában mondható ki [97]. Ez a klasszifikáció váltás és a daganatok sokfélesége a kutatási eredmények összevetésében hatalmas nehézséget eredményezett, mivel a legtöbb közleményben nincsenek korrekten meghatározva sem a különböző altípusok, sem pedig a sejtvonalak így az eredmények nehezen összevethetők.

Patogenezis. Gyakoriságuk ellenére a sporadikusan előforduló daganatok kialakulásának molekuláris mechanizmusa kevésbé feltárt. A PitNET daganatok monoklonális tumorok, ennek ellenére jóindulatúak, lassan növekednek és csak nagyon ritkán képeznek áttétet, bár lokálisan invazív viselkedést mutathatnak [96]. A neuroendokrin tumorokban vagy egyéb szolid tumorokban megtalálható gyakori génmutációk (pl. *PKC*, *RAS*, *TP53*, *RB*, *KRAS*, *EGFR*, *VEGFR*) nem jellemzőek rájuk. Mindössze a szomatotróp daganatokban szöveti szinten *GNAS1* aktiváló mutációt 27-43%-ban, valamint *USP8* mutációt a kortikotóp daganatok 38-67%-ában mutattak ki [95]. A nem funkcionáló, gonadotróp daganatok kialakulása mögött nem találtak génmutációkat. A kromoszómarendellenességeket tekintve az agyalapi mirigy daganatok 21-53% -ában írtak le kariotípus eltérést, melyek azonban egyszerűek, általában egy daganatban egyfélék, legtöbbször számbeliek [96]. A klasszikus genetikai eltérések hiánya mellett azonban az epigenetikai szabályozás (hipermetiláció,

miRNS-ek) szerepe gyakran igazolt PitNET daganatok kialakulásában. Ezek alapján úgy vélik, az hipofízis daganatok kialakulásához több eltérés együttes jelenléte vezet [96]. Kimutatták pl. a fent említett gének mutációi (pl. *GNAS1*, mely a cAMP útvonal konstitucionális aktivációját eredményezi) mellett számos tumorsuppresszor hipermetilációját vagy elvesztését (pl. p16, *RB1*), valamint a *PTTG1* (Pituitary Tumor-Transforming 1) onkogén fokozott kifejeződését [95, 96].

Diagnózis és terápia. A potenciálisan hipofízis daganattal rendelkező betegek kivizsgálásának alapja a perifériás hormonvizsgálatok és a célzott hipofízis képalkotó diagnosztika (MRI) elvégzése [98]. A hormontúltermelés mellett a hipopituitarizmus endokrin vizsgálata is szükséges makroadenomában szenvedő betegeknél. A nem-funkcionáló PitNET betegek esetében sajnos a laboratóriumi vizsgálatok nem segítenek, sem a diagnózis felállításában, sem pedig a betegkövetésben. A terápiát illetően a daganatok transzszfenoidális eltávolítása az elsőként választandó terápia a prolaktinómákat kivéve, melyek hatékonyan kezelhetők dopaminagonisták segítségével. Ha azonban a daganatok invazívak, a környező szinuszokat infiltrálják, a sebészeti eltávolítás sikere kevésbé garantált. Irodalmi adatok alapján a PitNET kiújulás a betegek 5-15%-ánál fordul elő műtéti eltávolítás után [98]. Néhány kis, nem-funkcionáló PitNET (NF-PitNET) beteg, akiknél a daganat nem veszélyezteti a látóidegkereszteződést sorozatos MRI-vel nyomon követhető [98]. Gyógyszeres kezelés prolaktinómáknál az elsődleges dopamin agonistákkal. A növekedési hormont termelő daganatok esetében elsősorban szomatosztatin analógok, kortikotróp daganatok esetében szteroidogenezis inhibitorok, dopamin agonisták, szomatosztatin analógok és glükokortikoid receptor antagonisták szóba jöhetnek, amennyiben a sebészeti beavatkozás után szükséges [98]. A sugárterápia PitNET-ek esetében második vagy harmadik vonalbeli választás olyan esetekben, ahol a műtét után a daganat kiújul. A benignus szövettan ellenére ez a daganattípus jelentős morbiditást jelent a betegek számára mind a hormonális zavarok, mind a térfoglalás következtében [99, 100]. Kimutatták, hogy a PitNET betegek 75%-a orvosi okokból munkaképtelenné válik vagy nyugdíjba vonult legalább 1 évvel a diagnózis után [101].

Hiányzó láncszemek. Az agresszív PitNET-ekre jellemző a tipikus daganatoknál magasabb proliferatív aktivitás és invazív viselkedés, amelyet a standard terápiákkal szembeni rezisztencia és a gyakori recidívák kísérnek. A cerebrospinális vagy távoli metasztázisok hiánya mellett ezek az összes PitNET körülbelül 10% -át teszik ki [102]. A legtöbb agresszív PitNET betegnek több sebészeti beavatkozásra és sugárterápiára, és több egymást követő vagy kombinált gyógyszeres kezelésre van szüksége. Előrehaladt esetekben alkilező szerekre (temozolomid önmagában vagy kombinációban), molekuláris célzott terápiákra vagy peptidreceptor radionuklid terápiára is szükség lehet. A patogenezis jobb megértése tehát rendkívül fontos, amely magába foglalja a daganatok molekuláris biológiájának pontosabb ismeretét.

A PitNET tumorokban a sejtciklus érintettsége jól ismert az irodalomban [95, 96]. Érdekes módon ezekben a tanulmányokban elsősorban a G1/S átmenetben részt vevő molekulák vizsgálatáról számoltak be, de a G2/M átmenet tagjainak funkciójáról ismereteink hiányosak voltak a publikációinkat megelőzően. Korábban vizsgáltuk a sejtciklus WEE1 kináz miRNS-ek általi regulációját, a teljes G2/M

átmenetet szabályozó molekulák komprehenzív elemzése azonban vizsgálatunk előtt még váratott magára [103]. A hipofízis onkocitoma az agyalapi mirigydaganatok rendkívül ritka, hátsó lebenyből (neurohipofízisből) kiinduló formája, mely ritkaságnak köszönhetően kialakulásuk patogenezisééről alig rendelkezünk információval. MiRNS expressziós mintázatok pedig vizsgálatunkat megelőzően nem volt ismert.

Fontos tehát, új terápiás célpontok azonosítása elsősorban az NF-PitNET daganatokban, ahol a műtét és a sugárterápia az egyetlen terápiás lehetőség, mivel az invazív, terápiareszisztens esetekben a kezelési opciók kimerülnek. Emellett elsősorban a nem-funkcionáló (NF-PitNET) daganatok esetén lenne fontos olyan keringő biomarkerek azonosítása, mely segítségével szolgál mind a diagnosztikában, mind a betegkövetésben [104].

I.4.3. Hasnyálmirigy neuroendokrin tumorok

Előfordulás, általános jellemzők. A hasnyálmirigy neuroendokrin tumorai (pNET) ritka daganatok heterogén csoportját képviselik, amelyek incidenciája növekszik [105, 106]. A hasnyálmirigy endokrin szöveteiből erednek, a kiindulási sejtípustól függően termelhetnek pl. inzulint, glukagont, vazóaktív intesztinális peptidet (VIP), melyek egyértelműen meghatározzák a beteg klinikai tüneteit. Általánosságban a pNET-ek jól differenciált daganatok, de a NET-ekre jellemző grádus beosztás alkalmazandó, mely a Ki-67 proliferációs indextől függően kerül meghatározásra [106]. Hormontermelésüktől függően funkcionáló és nem-funkcionáló (NF) csoportokat különböztetnek meg. A diagnosztikai eszközök fejlődése ellenére a betegek körülbelül 20-40%-ánál áll fenn metasztatikus betegség a diagnóziskor [106]. Leggyakrabban spontán módon alakulnak ki ismeretlen etiológia eredményeként, azonban ritkán familiáris szindrómák részjelenségeként is megjelenhetnek/kialakulhatnak (pl. multiplex endokrin neoplázia szindróma 1-es vagy 4-es típusa).

Diagnosztika. A diagnózis képalkotó vizsgálatokon (komputer tomográfia, MRI és endoszkópos ultrahang) alapul. A hagyományos modalitások mellett a szomatosztatin-receptor képalkotás is része a pNET diagnosztikának, mivel ez elősegítheti az anatómiai képalkotóval nem látható betegségek kimutatását, és jelezheti a szomatosztatin-receptor (SSTR) expresszió jelenlétét vagy hiányát (PET/CT) [106]. A hormontermelő daganatokat a megfelelő szérumszintekkel követhetjük (pl. inzulin, glukagon). A nem-funkcionáló daganatok esetében nem specifikus biomarkerek használata merül fel, pl. a kromogranin A (CgA). A kromograninok polipeptid prohormonok, amelyek a neuroendokrin sejtek magas denzitású szekréciós granulumainak fő alkotóelemei, és peptidhormonokkal és aminokkal együtt szekretálódnak [107].

Hiányzó láncszemek. A pNET-ek legnagyobb csoportját alkotó, nem funkcionáló (NF) pNET-ek tünetmentesek, ami késleltetett diagnózist eredményez, és a diagnózis felállításakor gyakran áttétnek bizonyulnak, ami jelentősen befolyásolja a prognózist és a túlélést [108, 109].

A keringő CgA emelkedett szintjét a neuroendokrin rendszer szinte valamennyi tumortípusával összefüggésbe hozták [107], de az érzékenysége a tumortípustól függően 47-100% között változik (100% gasztrinomákban, ~89% feokromocitómákban és ~69% nem-funkcionális pNET-ekben) [107,

henriettbutz_199_24

110, 111]. Ezenkívül számos onkológiai és nem onkológiai állapot, beleértve a veseelégtelenséget, a nem endokrin tumorokat (pl. prosztatata, emlő, thymus, méh, vastagbél), a krónikus gyomorhurutot és protonpumpa-gátló terápiát (PPI), emeli a keringő CgA szintet, amely részben magyarázhatja a nem túl magas szenzitivitást és specifitást [110, 112]. Ennek ellenére a CgA az egyetlen rutinszerűen mért keringő marker a pNET-ben. A miRNS-ek pNET-ben korábban leírt expresszióváltozásai felvetik potenciális hasznosságukat keringő biomarkerként [113, 114]. Mindezek fényében NF-pNET betegekben rendkívül fontos lenne megbízható biomarkert azonosítani, mely nemcsak a betegség diagnózisában, hanem a betegek követésében is segítséget nyújthatna.

II. Célkitűzések

A korábban megfogalmazottaknak megfelelően célkitűzéseim a következők voltak:

II.1. miRNS-ek általi szabályozó mechanizmusok feltárása különböző daganatokban

- II.1.1. A miRNS-ek és általuk befolyásolt mechanizmusok elemzése világossejtes veserák patogenezisében: aril-hidrokarbon receptor jelátvitel, sejtprolifерáció, migráció, invázió vizsgálata
- II.1.2. A miRNS-ek szerepének vizsgálata az antiangiogén terápiával szemben kialakult rezisztenciamechanizmusokban: tumorsejtek általi érbefogás és epithelialis-mezenchimális tranzíció elemzése
- II.1.3. A szöveti miRNS-ek által regulált molekuláris folyamatok analízise hipofízis neuroendokrin tumorokban: sejtciklus és mitokondriális funkció elemzése
- II.1.4. A glukokortikoid receptor-miRNS-Wnt szabályozás működésének vizsgálata hormonérzékeny daganatokban

II.2. miRNS-ek, mint potenciális extracelluláris biomarkerek vizsgálata

- II.2.1. Vizelet exoszomális miRNS-ek azonosítása, mint diagnosztikus biomarkerek és parakrin mediátorok világossejtes veserákban
- II.2.2. A keringő (plazma és exoszomális) miRNS-ek, mint potenciális tumormarkerek elemzése hipofízis neuroendokrin tumorokban
- II.2.3. A diagnosztikus pontosság növelése keringő miRNS-ek segítségével metasztatikus hasnyálmirigy neuroendokrin tumorokban

II.3. A DNS metiláció-demetiláció, mint epigenetikai módosító mechanizmus vizsgálata hipofízis neuroendokrin tumorok viselkedésében

- II.3.1. A DNS metilációs-demetilációs eltérések és azok klinikopatológiai paraméterekkel való összefüggéseinek vizsgálata hipofízis neuroendokrin tumorokban
- II.3.2. Az epigenetikai módosítók hatásmechanizmusa és potenciális terápiás alkalmazása hipofízis neuroendokrin tumorokban

III. Módszerek

III.1 Felhasznált humán minták

III.1.1 Daganatszövetminták és mintaelőkészítés

Világossejtes veserák (ccRCC) minták. A világossejtes veserák molekuláris adatainak integratív elemzéséhez felfedező kohorszként 593 ccRCC és 389 normál vesemintából származó nagy áteresztőképességű gén-, miRNS- és fehérjeexpressziós adatokat használtunk [115]. Az első validációs kohorsz a The Cancer Genome Atlas (TCGA) 470 ccRCC és 69 normál vese (mRNS-szekvenálási adatok) és 499 ccRCC és 66 normál minta (miRNS-szekvenálási adatok) adataiból állt. A második validációs kohortként 383 primer ccRCC és 85, a daganatszövet mellől származó normál szövetekből szöveti microarray-t (TMA) készítettünk **(1. táblázat)** [115].

A szövetspecifikus miRNS targetpredikciókhoz 593 ccRCC és 389 normál veseminta gén és miRNS expressziós adatait használtuk [116]. Validációhoz 62 ccRCC beteg formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) tumormintáját szereztük be és elemeztük retrospektíven. Emellett 6 primer daganat és metasztatikus párjuk vizsgálatát is elvégeztük FFPE blokkok felhasználásával. Kiegészítésként 23-23 párosított normál vese és ccRCC minta friss szövetét is begyűjtöttük fehérjeelemzés céljából [116] **(1. táblázat)**.

PitNET minták. A friss fagyasztott és formalin-fixált paraffinba ágyazott (FFPE) hipofízis neuroendokrin tumorszöveteket 2007-2017 között a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikán kezelt és az Országos Idegsebészeti Tudományos Intézetben operált betegtől gyűjtöttük be **(1. táblázat)**. A rutin szövettani és immunhisztokémiai elemzést (elülső lebeny hormonok: GH, PRL, ACTH, FSH, LH, TSH és Ki-67) a Semmelweis Egyetem I. Patológiai és Kísérletes Rákkutató Intézetben végezték. A pontos WHO klasszifikáció meghatározásához transzkripciós factor immunhisztokémiai vizsgálatot állítottunk be, melyet anti-SF1 (N1665, ThermoFisher), anti-Pit1 (NBP1-92273, Novus Biologicals) és anti-T-Pit (CL6251, Atlas Antibodies) antitestekkel végeztünk 1:500; 1:5000 és 1:2000 hígításban. A friss, fagyasztott normál hipofízis mintákat kollaboráció keretében (University Clinical Centre, Belgrád, Szerbia) kaptuk, melyek a halált követő 6 órán belül kerültek begyűjtésre olyan személyektől, akiknél endokrin betegség nem állt fenn [117, 118]. A normál minták esetében az elülsőlebeny hormonok és Pit1 transzkripciós factor mérésével zártuk ki a normál szövetek hipofízis hátsólebennyel való kontaminációját [119].

Minden eltávolított daganatszövet vagy azonnali fagyasztásra került folyékony nitrogénben vagy RNA later (#AM7020, ThermoFisher Scientific) stabilizáló reagensben került fixálásra a gyártói leírásnak megfelelően. Ezt követően a minták további felhasználásig -80 °C-on kerültek tárolásra.

henriettbutz_199_24

1. táblázat. Felhasznált kísérletes mintaszámok és mintatípusok. A dolgozathoz felhasznált 1260 kísérletes minta összesítése. A különböző vizsgálatokhoz tartozó részletes minta és betegadatokat (életkor, nem, hisztológiai jellemzők, tumor grádus, metasztatikus/recidív betegség, genetikai háttér stb.) megtalálhatók az eredeti közleményekben.

*: Egészséges kontrol (n=51) és benignus veseeltérés (n=25)

Minta típus:	FF	FFPE	Plazma	Szérum	Vizelet	PBMC
ccRCC	23	508	-	-	108	-
Kontrol (veseszövet/vizelet*)	23	85	-	-	76*	-
NF-PitNET	102	62	121	-	-	18
GH-PitNET	47	9	28	-	-	12
Plurihormonális PitNET	10	-	-	-	-	-
Hipofízis onkocitoma		7	-	-	-	-
Kontrol (hipofízis szövet/plazma/PBMC)	10	11	2	-	-	2
pNET	-	-	-	25	-	-
PPGL	-	-	-	20	-	-
Kontrol (szérum egészséges személyektől)	-	-	-	29	-	-
Összesen:	215	682	151	74	108	30

ccRCC: világossejtes veserák; NF-PitNET: nem-funkcionáló hipofízis neuroendokrin tumor, GH-PitNET: növekedési hormont termelő hipofízis neuroendokrin tumor, pNET: hasnyálmirigy neuroendokrin tumor, PPGL: feokromocitoma-paraganglióma; FF: friss fagyasztott; FFPE: formalin-fixált paraffinba ágyazott; PBMC: perifériás vérből izolált mononukleáris sejt

III.1.2. Szérum, plazma, vizeletminták és mintaelőkészítés

Szérumminták. A hasnyálmirigy nem-funkcionáló neuroendokrin tumorban (pNET), feokromocitoma-paragangliómában (PPGL) szenvedő betegek és egészséges személyek keringő miRNS vizsgálatához szérum mintákat vizsgáltunk. Összesen 74, egymást követő, a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetbe kromogranin A (CgA) mérésre 2017-2019 között küldött szérummintát válogattunk össze retrospektív módon (**1. táblázat**) [120]. A 29 kontrollminta közül 10 esetben a mintagyűjtés 5 egészséges önkéntestől történt protonpumpa-gátló (PPI) kezelést követően vagy és anélkül. A PPI kezelést követő mintavétel nagy dózisu, minimum 2 hétig történő PPI szedést követően történt. A klinikai információkat (életkor, CgA szint, tumor grádus, metasztatikus betegség, kétoldali megjelenés, genetikai státusz) laboratóriumunk archívumából, valamint a Semmelweis Egyetem orvosi információs rendszeréből szereztük be [120]. A minták beérkezésekor a szérumok szétválasztását azonnal elvégeztük, 10 percig tartó 3000 g-s centrifugálással, 4° C-on. Ezután a mintákból aliquotokat készítettünk, melyeket további feldolgozásig -20° C-on tartottunk. A klinikai CgA mérést követően az RNS-izoláláshoz szükséges mintákat 16 000 g-vel, 4° C-on 15 percig tartó, 16 000 g-vel történő centrifugálással dolgoztuk fel a vérlemezkék eltávolítása érdekében.

A szérummintákból a CgA méréseket a rutin diagnosztika részeként végezték IVD minősített kompetitív radioimmunassay módszerrel (Chromogranin A kit; REF: CGA-RIACT; Cisbio Bioassays) a gyártó utasításait követve RIA-mat-280 gammaszámlálón (Byk-Sangtec Diagnostica).

Plazma minták. A hipofízis neuroendokrin tumoros betegek keringő miRNS vizsgálatához 45 betegből és két kontroll személytől összesen 149 plazmamintát gyűjtöttünk be a daganat eltávolítása előtt és után (**1. táblázat**) [121]. A kontrollként használt plazmamintákat egészséges, ismert betegséggel nem

henriettbutz_199_24

rendelkező önkéntes személytől nyertünk a munkavállalási engedélyhez szükséges rendszeres egészségügyi szűrővizsgálat során. A plazmamintákat preoperatív (1-2 nappal a műtét előtt), korai posztoperatív (1-3 nappal a műtét után, a sebészeti osztályról való elbocsátáskor) vagy késői posztoperatív (legkorábban 3 hónappal a műtét után) időablakokban gyűjtöttük. A "késői" posztoperatív minták levétele a betegek a rendszeres endokrinológiai ellenőrzésre érkezésekor történt. A hipofízis rutinszerű képalkotó vizsgálatát (MRI) a műtétet követő 6-9 hónap elteltével végzik, mivel az ödéma, a posztoperatív vérzés és az operációkor használt tömőanyag anyag jelenléte, mint differenciáldiagnosztikai kihívások bizonytalanná teszik a reziduális/visszatérő adenóma mágneses rezonanciás képalkotáson történő kimutatását [122]. A mintavételhez azonos típusú EDTA vércsőveket használtunk. A vérvételre reggel, éjszakai koplalást követően került sor. A vérvételt követően a plazmamintákat a további feldolgozásig azonnal 4° C-on tároltuk. A plazma szétválasztása minden esetben egy órán belül megtörtént. A vérvételt és a különböző helyekre történő szállítást személyesen felügyeltük, hogy a vérvétel és a centrifugálás között maximum 1 óra teljen el. A centrifugálást 2 két lépésben végeztük: először 2500 g-nél 20 percig 4°C-on a plazma előkészítéséhez, majd 16 000 g-nél 15 percig 4°C-on a vérlemezke-mentes plazma kinyeréséhez. A többszöri fagyasztási-felolvasztási ciklusok elkerülése érdekében a plazmamintákat aliquotáltuk és -80 °C-on tartottuk az RNS-kivonásig. Az RNS extrakció előtt a mintákat jégen olvasztottuk fel, majd ismét 16 000 g-n és 4°C-on 15 percig centrifugáltuk [121].

Vizeletminták. A vizelet miRNS vizsgálatokhoz a felfedezési kohorszban 28 műtét előtti vizeletmintát gyűjtöttünk szövettanilag igazolt ccRCC-vel rendelkező betegektől és 18 egészséges személytől. A validációs csoportban 81 független vizeletmintát használtunk ccRCC betegektől, 24 jóindulatú vesedaganatos betegtől és 33 egészséges személytől (**1. táblázat**). Minden esetben 30-50 ml vizeletet gyűjtöttünk, melyet 10 percig 2000xg-vel 4°C-on centrifugáltuk, és további felhasználásig -80°C-on tároltuk [34].

A vizsgálatainkat minden esetben az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága, valamint a Nemzeti Népegészségügyi Központ hagyta jóvá, a mintákat az összes beteg és kontroll személy írásos beleegyezését követően nyertük (ETT-TUKEB 0618/15 és 4457/2012/EKU; Nemzeti Népegészségügyi Központ NPHC: 41189-7/2018/EÜIG; 67/PI/2012).

III.1.3. In silico felhasznált minták

A kísérletes minták mellett nyilvánosan hozzáférhető adatbázisokban (The Cancer Genome Atlas – TCGA, NCBI Gene Expression Omnibus – GEO) elhelyezett mérési eredményeket is felhasználtunk, újraanalizáltunk a saját adatok validációjához vagy azok előzményének, felfedező kohorszként.

A ccRCC vizsgálatoknál összesen 1562 daganatszövet és 524 egészséges veseszövet (lásd fenn) gén és miRNS expressziós adatait elemeztük kiegészítve túlélési adatokkal a The Cancer Genome Atlas adatbázisból (letöltve 2013.04.21-én) [115, 116].

henriettbutz_199_24

A PitNET daganatok jellemzéséhez összesen 76 PitNET és 34 egészséges kontrol hipofízis minta nagyáteresztőképességű (5 transzkriptom, 2 protein array) vizsgálatának adatait elemeztük újra és összesítettük (NCBI GEO: GSE2175, GSE26966, GSE51618, letöltve 2022.01.07-én) [123]. Emellett öt független vizsgálat 177 PitNET szöveten végzett összehasonlító genomhibridizációs array (cCGH, comparative genome hybridization) méréseit integráltuk komprehenzív kópiaszámanalízis céljából [118]. A *DNMT1* és a *TET* (ten-eleven transzlokáz) enzimek *in silico* analíziséhez 33 PitNET-szövet microarray gén expressziós adatait (NCBI GEO: GSE26966; GSE51618) használtuk (2019.06.26-én letöltve) [124]. A hipofízis orsósejtes onkocitómák vizsgálatához 3 onkocitóma és 3 normál szövet transzkriptóm adatait töltöttük le (2018.08.28-án, GSE51618) és analizáltuk újra [125].

A glükokortikoid miRNS expresszióra gyakorolt hatásának elemzéséhez 139 különféle: 82 kontrol és 57 glukokortikoid expozíciónak kitett szövet (csont, mellékvesekéreg, szinoviális fibroblaszt, zsírszövet, epidermális keratinocita, hipokampusz és hipotalamusz) génexpressziós adatainak reanalízisét végeztük el a GEO adatbázisban elhelyezett mérések segítségével (GSE30159, GSE14922, GSE64826, GSE21727, GSE10311, GSE37520, GSE88966, GSE88966, GSE26487, 2021.10.11-én letöltve) [126].

A 14q32 lókuszon kódolt miRNS-ek funkciójának elemzéséhez és az adatok szintéziséhez 70 nagyáteresztőképességű (microarray, TaqMan array, NanoString, NGS) módszert alkalmazó kísérletes vizsgálat mérési adatait használtuk fel (2021.02.08-án letöltve), ahol minden vizsgálatot egyenértékűnek értékeltünk mintaszámtól függetlenül [127]. Ebben, összesen 14 NET, 5 PPGL, 4 ACC, 22 PitNET és 25 pajzsmirigydaganat miRNS profilját vizsgáló tanulmány adatai kerültek reanalízisre.

A keringő miRNS-ek szöveti eredetének keresztvalidálásához komprehenzív miRNS elemzést végeztünk. Hipofízis neuroendokrin tumorok esetében 31 normál, 40 GH termelő és 70 nem-funkcionális daganat miRNS profilját összesítettük összesen hét tanulmányból [121]. Hasnyálmirigy neuroendokrin daganatok (pNET) esetében 244 pNET és 65 környező egészséges kontrolszövet, valamint 217 feokromocitóma szöveti miRNS expressziós profilját szintetizáltuk [120].

III.2. Molekuláris genetikai módszerek

III.2.1. Nukleinsav (DNS, RNS, miRNS) izolálás

DNS izolálás. A teljes DNS-t a szövetekből, sejtekből és vérmintákból a QIAamp Fast DNA Tissue Kit (#51404, Qiagen), illetve a QIAamp DNA Mini Kit (#51106, Qiagen) segítségével vontuk ki. A DNS koncentrációt és tisztaságot NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (ThermoFisher Scientific) határoztuk meg, a DNS integritását hagyományos agaróz gél elektroforézissel ellenőriztük.

RNS extrakció. PitNET szövetekből a teljes RNS-t Machery Nagel NucleoSpin miRNS kit (#740971.50, Machery Nagel) segítségével izoláltuk. Sejt-lizátumból, tumor/xenograft lizátumokból, exoszóma pelletből, exoszóma-mentesített médiumból RNS-t miRNeasy vagy RNeasy kitek (#217004 és #74104, Qiagen) segítségével vontuk ki a gyártó protokollja szerint. Az FFPE minták esetében az RNS izolálást a ccRCC és metasztázisok tumoros területeinek hat 1 mm-es területéből végeztük miRNeasy FFPE Kit (#217504, Qiagen) vagy RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (#AM1975,

henriettbutz_199_24

Thermo Fisher Scientific) segítségével. Sejtmentes vizelet miRNS, szérum, valamint plazma miRNS izoláláshoz a Urine Exosome RNA Isolation Kit-et (#47200, Norgen Biotek) és a miRNeasy Serum/Plasma Kit-et (#217184 Qiagen) alkalmaztunk a gyártói előírásoknak megfelelően. Minden egyes plazmamintából 200 μ L-t használtunk a kis RNS frakciót tartalmazó teljes RNS extrakcióhoz a miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen, Cat #217184) alkalmazásával. Az egyedi cel-miR-39 spike-in kontrollt (#219610, Qiagen) a gyártó utasításai szerint adtuk a mintákhoz az RNS extrakció során. Az RNS tisztaságát és mennyiségét NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (ThermoFisher Scientific) vizsgáltuk. Az RNS integritásának ellenőrzését TAE/formamid gélelektroforézis módszerrel Biotinum GelGreen festékkel (#41004, Biotinum) vagy Bioanalyzer RNA 6000 Nano és Small RNA Kit (#50671511, #50671548 Agilent Technologies) segítségével ellenőriztük. Az RNS integritást RIN (RNA integrity number) >7 esetben tekintettük intaktnak. Az izolált RNS minták koncentrációját 2100 Bioanalyzer segítségével mértük a fenti kettek használatával.

III.2.2. Exoszóma preparálás, validálás és exoszómális RNS jelölés

Az extracelluláris vezikulák izolálását és jellemzését a Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles 2018 irányelvet követve végeztük [128]. Plazmából való kinyeréshez az extracelluláris vezikulákat 300 μ L mintából extraháltuk a Total Exosome Precipitation Reagent From Plasma (#4484450, Invitrogen) a gyártó utasításai szerint, fehérjék Proteináz K-val történő emésztését követően. Az elválasztott vezikulákat 200 μ L szűrt PBS-ben reszuszpendáltuk, majd a miRNeasy Serum/Plasma Kit (#217184, Qiagen) segítségével RNS izoláláshoz tovább dolgoztuk fel. Az RNS extrakció során egyedi cel-miR-39 spike-in kontrollt alkalmaztunk (#219610, Qiagen). A vizelet és sejttenyészet felülszóból exoszómákat az ExoQuick TC-kittel (#EXOTC10A1, System Biosciences), végeztük 1 mL kiindulási mintából.

Az exoszómák szerkezetét és méretét elektronmikroszkópiával ellenőriztük. Ehhez a sejttörmelékmentes felülszót 4 mL foszfát-pufferelt sóoldatba (PBS) hígítottuk, és az exoszómákat egy éjszakán át tartó centrifugálással, Beckman SW60 rotorral 100 000 g-nél üleptítettük. Az exoszómákat ezután 2%-os PFA-ban egy éjszakán át fixáltuk, elektronmikroszkópia segítségével képeket készítettünk. Emellett méreteloszlás-méréseket és áramlási citometriát is végeztünk az exoszóma markerek jelenlétének bizonyítására.

A kivont extracelluláris vezikulák (EV-k) méreteloszlását tunable resistive pulse sensing (TRPS) analízisnek vetettük alá qNano műszerrel (Izon Science) [129]. Az adatelemzéshez az Izon Control Suite (v3.1, Izon Science) szoftvert használtuk.

Az áramlási citometriához 20 μ g fehérjetartalmú exoszóma mintát 1 μ L aldehid/szulfát-latex gyöngyökkel (4% w/v, 4 μ m; Thermo Fisher Scientific) inkubáltunk 15 percig RT-n. A gyöngyökkel összekapcsolt exoszómákat pelletáltuk, majd 20 μ L EV kiürített FCS-ben reszuszpendáltuk és kétszer mostuk. A pelletet ezután anti-CD9-APC (#341648, M-L13, BD Biosciences), anti-CD63-PE (#SAB4700218, MEM-259, Sigma), anti-CD81-PerCP (#565430, JS-81, BD Biosciences) antitestekkel és annexin V-FITC-vel (#640906, Biolegend) együtt inkubáltuk 45 percig szobahőmérsékleten. A

henriettbutz_199_24

hátterhez exoszóma-gyöngy komplexeket EV-mentes (exoszóma-mentes) borjúsérummal (#A2720801, Fetal Bovine Serum, exosome-depleted, ThermoFisher Scientific) inkubáltuk és ugyanezzel a módszerrel festettük. A mock kontroll mintát az aldehid/szulfát-latex gyöngyök csak a fluorokróm monoklonális antitestekkel történő inkubálásával végeztük. Az adatokat hagyományos áramlási citométerrel (FACSCalibur, BD Biosciences) vettük fel, és az adatokat a CellQuest Pro szoftver (BD Biosciences) segítségével elemeztük. A konfokális mikroszkópiához az exoszómákat Exo-Red festékekkel (#EXOR100A-1, System Biosciences) jelöltük a gyártó protokollja szerint.

III.2.3. Reverz transzkripció és valós idejű PCR

Teljes RNS-ből (350-500 ng) cDNS-t készítettünk High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher #: 4368814, Life Technologies, Grand Island, NY, USA), vagy Superscript III First Strand Synthesis Kit (Life Technologies) segítségével. A miRNS átírást TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit (#4366596), illetve TaqMan Advanced miRNA cDNS Synthesis Kit (#A28007, Thermo Fisher Scientific) használatával végeztük.

A génexpressziós mérésekhez két módszert használtunk: SyBR Green master mixet (#A25742, PowerUp SYBR Green Master Mix, ThermoFisher Scientific) egyedi tervezésű primerekkel, vagy TaqMan master mixet (#4440040, #4440043) TaqMan assay-ekkel alkalmaztunk (**2. táblázat**). A qPCR reakciókat minden esetben triplikátumokban futtatuk 384-well plateken, 7900 HT RealTime PCR System, Viia 7 Real-Time PCR System vagy Quant Studio 7 Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) készülékeken.

A génexpressziós mérések belső kontroljaként világossejtes veserák szövetek esetében peptidilprolil izomeráz A (*PPIA*) és Tubulin- α (*TUBA1A*) [115], humán hepatocelluláris carcinoma xenograft minták esetében hipoxantin foszforiboziltranszferáz 1 (*HPRT*) és gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*GAPDH*) [85], PitNET minták esetében béta aktin (*ACTB*) és *GAPDH* kombinációját (geometrikus átlagát) alkalmaztuk [117]. A miRNS-ek belső kontroljaként (háztartási génként) világossejtes veserák daganatszövetben az *RNU44* és *RNU48* [116], PitNET minták esetében a *RNU44*, *RNU48* és *U6 snRNA* geometriai átlagát használtuk [119]. A vizelet exoszómális miRNS-ek esetében a NormFinder algoritmus segítségével azonosítottuk a miR-16-5p és a miR-106a-5p geometriai átlagát, mint a legstabilabb belső kontrollt [34]. Az exoszómákban lévő miRNS expressziót az exoszóma-mentesített médiumra normalizáltuk.

A gén és miRNS expresszió változást a ddCT módszerrel elemeztük ($\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$), az eredményeket $\log_2(\text{fold change})$, azaz $\log_2 RQ$ (RQ : relatív mennyiség) formában adjuk meg.

2. táblázat. Alkalmazott qPCR primerek és TaqMan próbák.

qPCR primerek	
Gén	F: forward primer, R: reverz primer
<i>hsa-CAV1</i>	F-5'CCGCGACCCCTAAACACCTC-3', R-5'GCCTTCCAAATGCCGTCAA-3'
<i>hsa-CDH1</i>	F 5'-CACAGTCACTGACACCAACGATAA-3', R 5'-CTCAGGCACCTGACCCTTGTA-3'
<i>hsa-CDH2</i>	F 5'-TGGGAATCCGACGAATGG-3', R 5'-TGCAGATCGGACCGGATACT-3'
<i>hsa-FLOT1</i>	F-5'ACATTGCCCTGGAGACGTTAG-3', R-5'ACACTGATGCCCCATGTTGAC-3'

henriettbutz_199_24

<i>hsa-GAPDH</i>	F 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', R 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'		
<i>hsa-HPRT</i>	F 5'-TTGCTGACCTGCTGGATTAC-3', R 5'-TCTCCACCAATTACTTTTTATGTCC-3'		
<i>hsa-KIAA0101</i>	F-5'-AGGTTGTCCCCTAAAGATTCTG-3', R-5'-CAGGTTGCCAAAGGACATGC-3'		
<i>hsa-PPIA</i>	F-5'-ATGCTGGGGCCCCCAACACAA-3', R-5'-CCCTCTCTTTCACCTTGCCACC-3'		
<i>hsa-SNAI1</i>	F 5'-TCGGAAGCCTAACTACAGCGA-3', R 5'-AGATGAGCATTGGCAGCGAG-3'		
<i>hsa-SNAI2</i>	F 5'-AAGCATTTCAACGCCTCCAAA-3', R 5'-GGATCTCTGGTTGTGGTATGACA-3'		
<i>hsa-TUBA1A</i>	F-5'-TCTTCCACCCTGAGCAACTT-3', R-5'-CTCCAGCTTGGACTTCTTGC-3'		
<i>hsa-VIM</i>	F 5'-GACAATGCGTCTCTTGGCTTT-3', R 5'-TCCTGCAGGTTTTTGGCAGCCA-3'		
<i>hsa-ZEB1</i>	F 5'-CGGCGCAATAACGTTACAA -3', R 5'-GGCAGGTCATCCTCTGGTACA-3'		
<i>hsa-ZEB2</i>	F 5'-TCTCCCATTTCTGGTTCCTACA-3', R 5'-TTCTCATTCGGCCATTTACAG-3'		
<i>rno-Actb</i>	F 5'-AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT-3', R 5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3'		
<i>rno-Ccna2</i>	F 5'-GGATGGTAGTTTTGAATCACCCC-3', R 5'-GGATGGCCCCGATACTGTTA-3'		
<i>rno-Cdk2</i>	F 5'-GCTTATCAACGCAGAGGGGT-3', R 5'-GGGTCACCATTTCCGGCAAAG-3'		
TaqMan próbák			
Gén	TQM Assay ID	Gén	TQM Assay ID
<i>hsa-18S</i>	Hs99999901_s1	<i>hsa-TET3</i>	Hs00896441_m1
<i>hsa-ACTB</i>	Hs99999903_m1	<i>hsa-UHRF1</i>	Hs01086727_m1
<i>hsa-ACTB</i>	Hs01060665_g1	<i>hsa-UHRF2</i>	Hs00380204_m1
<i>hsa-BIRC5</i>	Hs04194392_s1	<i>rno-Birc5</i>	Rn00574012_m1
<i>hsa-CDC25A</i>	Hs00947994_m1	<i>rno-Dnmt1</i>	Rn007009664_m
<i>hsa-CDC25C</i>	Hs00156411_m1	<i>rno-Gapdh</i>	Rn01775763_g1
<i>hsa-CDK1</i>	Hs00938777_m1	<i>rno-Pttg1</i>	Rn00574373_m1
<i>hsa-DNMT1</i>	Hs00945875_m1	<i>rno-Tet1</i>	Rn01428192_m1
<i>hsa-GAPDH</i>	Hs99999905_m1	<i>rno-Tet2</i>	Rn01522037_m1
<i>hsa-GAPDH</i>	Hs02758991_g1	<i>rno-Tet3</i>	Rn01425643_m1
<i>hsa-PTTG1</i>	Hs00864094_g1	<i>rno-Tp53</i>	Rn00755717_m1
<i>hsa-TET1</i>	Hs04189344_g1	<i>rno-Uhrf1</i>	Rn02346366_m1
<i>hsa-TET2</i>	Hs00325999_m1	<i>rno-Uhrf2</i>	Rn01502134_m1
miRNS	TQM Assay ID	miRNS	TQM Assay ID
cel-miR-39-3p	478293_mir	hsa-miR-203a-3p	478316_mir
hsa-126-5p	477888_mir	hsa-miR-20a	4373286
hsa-143-3p	477912_mir	hsa-miR-21	000397
hsa-148b-3p	477824_mir	hsa-miR-25	000403
hsa-150-5p	477918_mir	hsa-miR-30a-5p	000417
hsa-26b-5p	478418_mir	hsa-miR-30d-5p	478606_mir
hsa-6514-3p	480214_mir	hsa-miR-34b	000427
hsa-6867-5p	480488_mir	hsa-miR-383	4373018
hsa-let-7b-5p	478575_mir	hsa-miR-422a	4395408
hsa-let-7i-5p	478375_mir	hsa-miR-424	001149, 4373201
hsa-miR-1	000385	hsa-miR-449	001030
hsa-miR-106a	002169	hsa-miR-451a	478107_mir
hsa-miR-1183	002841	hsa-miR-486	001278
hsa-miR-124-3p	001182	hsa-miR-486-3p	4395204
hsa-miR-126	002228	hsa-miR-486-5p	478128_mir
hsa-miR-126*	000451	hsa-miR-503	001048, 4373228
hsa-miR-128a	4395327	hsa-miR-516a-3p	4373183
hsa-miR-135a	4373140	hsa-miR-542-3p	4378101
hsa-miR-135b	4395372	hsa-miR-543	4395487
hsa-miR-140-5p	4373374	hsa-miR-582-3p	4395510

henriettbutz_199_24

hsa-miR-143-3p	477912_mir	hsa-miR-582-5p	4395175
hsa-miR-150	000473	hsa-miR-663a	479445_mir
hsa-miR-155	4395459	hsa-miR-93	4373302
hsa-miR-15a	4373123	hsa-miR-98	4373009
hsa-miR-16	000391, 4373121	RNU44	001094, 4373384
hsa-miR-17	002308	RNU48	001006, 4373383
hsa-miR-17-5p	4395419	U6 snRNA (RNU6)	001973, 4395470
hsa-miR-200c-3p	002300		

hsa: homo sapiens, rno: rattus norvegicus

III.2.4 DNS szekvencia meghatározás módszerei

III.2.4.1. Sanger szekvenálás

A mitokondriális variánsok vizsgálatát és vektorkonstrukciók ellenőrzését hagyományos Sanger szekvenálással végeztük. A mitokondriális fragmensek kizárólagos amplifikációjához és a nukleáris DNS együttes amplifikációjának elkerülése érdekében Ramos és munkatársai által publikált speciális primereket alkalmaztuk [130]. Az ampliconokat tisztítottuk Clean Sweep PCR tisztító kit segítségével (#A29895, Thermo Fisher Scientific). A Sanger szekvenálást Applied Biosystems 3130 genetikai analizátoron (Thermo Fisher Scientific) végeztük BigDye™ Direct Cycle Sequencing Kit (#4458687, Thermo Fisher Scientific) segítségével.

III.2.4.2. Mitokondriális DNS analízis újgenerációs szekvenálással, szekvenálási adatok értékelése, variáns interpretáció és validálás

A mitokondriális DNS-könyvtárat a VariantPro™ Mitochondrion Panel Library Preparation Kit (#VP-MIT-0048, LC Sciences) segítségével készítettük el követve a gyártói utasításokat. A kívánt fragmensek jelenlétét és az indexelt könyvtárak tisztaságát az High-Sensitivity DNA Analysis Kit (#5067-4626, Agilent Technologies) segítségével ellenőriztük Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) készüléken. A könyvtárak koncentrációját Qubit fluorométerrel (Thermo Fisher Scientific) mértük. A 45 indexelt könyvtárat mintánként ekvimoláris mennyiségben kevertük, majd denaturálás és további hígítás után 10 pM könyvtárkeveréket töltöttünk a szekvenáló kazettába (Illumina MiSeq Reagent v2 kit, 500 cycles, #MS-102-2003, Illumina) és Illumina MiSeq készüléken (Illumina) futtatuk.

Az adatfeldolgozásban a Genome Analysis Toolkit (GATK) Best Practices guideline ajánlását követtük. Röviden, trimmelést és a rossz minőségű bázisok (Phred<20) eltávolításához a Trim Galore (Babraham Bioinformatics, http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) és cutadapt algoritmusokat használtuk. A readok illesztése a Burrows–Wheeler Alignerrel (BWA) történt. A read-ek rendezéséhez Picard tool algoritmust (<http://broadinstitute.github.io/picard>), használtunk. A variánshíváshoz mintánként a MuTect2 (tumor_only_mode)-t, a VCF (Variant Call Format) file-ok összeolvasztásához a CombineVariant algoritmusokat használtuk. A variáns hatásokat SnpEff segítségével vizsgáltuk. Mitokondriális referencia szekvenciaként a humán mitokondriális DNS felülvizsgált Cambridge referenciaszekvenciáját (rCRS) (NC_012920.1 gi:251831106) alkalmaztuk. A

variánsok annotációhoz a MITOMAP mtDNA Coding Region and RNA Sequence Variants adatbázist használtuk. A referencia allélokat 0-nak, a variáns allélokat 1-nek kódoltuk, a heteroplazmia arányát pedig az egyes variánsok és minták leolvasási (read) száma/totál read szám alapján számítottuk ki. 3%-os vágóértéket használtunk a heteroplazmia azonosítására a korábban leírtak szerint [131].

III.2.5. Gén és miRNA expressziós profil meghatározásához alkalmazott módszerek

III.2.5.1. Génexpressziós microarray

Kétszáz nanogramm teljes RNS-t az Illumina TotalPrep-96 RNA Amplification kit (#4393543, Ambion Life Technologies) segítségével jelöltünk meg az amplifikációs protokoll szerint. 750 ng cRNS-t készítettünk és hibridizáltuk egy Human HT-12 V4 BeadChipbe (#HumanHT-12 v4, Illumina) [116]. A BeadChipet 58°C-on, 5-ös fordulatszámon 18 órán át inkubáltuk a hibridizációhoz. A BeadChipet az Illumina protokoll szerint mostuk és festettük, majd az iScan (Illumina) készülékkel szkenneltük. A génexpressziós microarray-ek adatelemzését a Genespring GX 12 szoftver (Agilent Technologies) segítségével végeztük. A nyers adatokat percentilis alapján szűrtük (alsó határérték: 20). A fold change szűrőt 2-szeresre állítottuk, majd párosítatlan t-próbát használtunk a szignifikáns ($p < 0,05$) génexpressziós változások azonosítására többszörös tesztelési korrekcióval (Benjamini-Hochberg) a hamis felfedezési arány ellenőrzése és statisztikailag megbízható eredmények elérése érdekében.

III.2.5.2. Génexpressziós profil készítése humán TaqMan Array segítségével

Célzott gének expressziós eltéréseinek vizsgálatához a kiválasztott génekre specifikus TaqMan assay-kból álló paneleket terveztem. A G2/M útvonal transzkriptomikai vizsgálatához 46 gént tartalmazó [118], az apoptózis útvonal vizsgálatához 96 gént tartalmazó [117] egyedi készítésű TaqMan Low Density Array-k (TLDA) (Life Technologies) terveztünk. A génexpresszió méréseket az átfordított cDNS-ek felhasználásával 7900 HT Fast RealTime PCR System (Life Technologies) készüléken futtattuk.

III.2.5.3. Génexpressziós profil meghatározása újgenerációs szekvenálás segítségével

Az RNS-szekvenáláshoz a könyvtárakat a TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit (#RS-122-2101, Illumina) [132] vagy NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina with Purification Beads (#E7760S/L, New England Biolabs) [123] segítségével készítettük el. A poliA-t tartalmazó mRNA-molekulákat 4 µg teljes RNS-ből ($RIN > 7$) tisztítottuk mágneses gyöngyökhöz kapcsolt poli-T oligók segítségével. Az mRNA ezután ~300 bp-os szakaszokra fragmentáltuk. A cDNS szintézist SuperScript II kit segítségével végeztük (#18064-014, Invitrogen). A cDNS-t ezután 3' végén adenilizáltuk, majd az indexelő adapterek ligálása következett. Az adapterligált DNS-t 15 PCR-ciklussal dúsítottuk. Minden tisztítási és méretválasztási lépést AMPure XP SPRI gyöngyökkel végeztünk (#A63881, Beckman Coulter Genomics). A könyvtárakat az Agilent Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit (#5067-4626, Agilent Technologies) alkalmazásával ellenőriztük, majd kvantifikáltuk (KAPA Illumina Library Quantification Kit, #KK4835, KAPA Biosciences; Illumina Eco RealTime PCR

henriettbutz_199_24

készülékkel (Illumina). A klaszterek (paired-end cluster generation) létrehozását és 2×150 ciklusos szekvenálást (#PE-401-3001, Illumina) Illumina Hi-Seq 2000/2500 és Novaseq (#20028400, NovaSeq 6000 SP 300 cycles, Illumina) készülékeken végeztük [123, 132]. A leolvasásokat (read-eket) 75bp-ra vágtuk. A leolvasásokat a hg19 referencia genomhoz igazítottuk a tophat (v2.0.3) algoritmus segítségével, majd a transzkriptek összefűzését követően és az expressziós szintek becslését (fpkm) végeztük el cufflinks (v2.0.2) algoritmus segítségével. A csoportok közötti expressziós eltéréseket a cufflinks cuffdiff moduljával [132] és Bioconductor package edgeR [123] segítségével határoztuk meg.

III.2.5.4. miRNS expressziós profil meghatározás microarray segítségével

A miRNS expressziós elemzéséhez a GeneChip® microRNS Galaxy Array v1-et (Affymetrix, CA, USA) használtuk (1015 humán érett miRNS próbakészlettel) [119]. Kiindulásként mintánként 500 ng totál RNS-t használtunk, a könyvtárkészítés poly(A) (#703095, FlashTag Biotin HSR RNS Labeling Kit, Affymetrix) dúsítás segítségével végeztük a gyártó utasításait követve. Ezután a jelölt és biotinilált RNS-t és hibridizációs kontrollokat (#900454, Gene Chip Eukaryote Hybridization Control Kit, Affymetrix) a miRNS array-hez hibridizáltuk 16 órán keresztül 48 °C-on. A hibridizációt és festést a GeneChip Hybridization, Wash, and Stain Kit (#702731, Affymetrix) segítségével végeztük, és minden array-t GeneChip Fluidics 450 állomáson (Affymetrix) mostunk és festettünk, majd GeneChip® 3000 szkennelvel (Affymetrix) szkenneltünk [119]. Az adatok analízisét, a génexpressziós microarray-ekhez a Genespring GX 12 Software (Agilent Technologies) segítségével végeztük, standard beállításokkal. Röviden, a nyers adatokat percentilis alapján szűrtük (alsó vágóérték: 20). A fold change filter-t 2-re állítottuk, majd párosítatlan t-tesztet használtuk a szignifikáns eltérések azonosítására Benjamini-Hochberg többszörös tesztelési korrekcióval [119].

III.2.5.5. miRNS expressziós profil készítése humán TaqMan Array segítségével

A miRNS expressziós vizsgálatokhoz qPCR alapú TaqMan® Array Human MicroRNA Card Set v.2 (A#:4398965, B#4398966), v.3 (#4444913, Life Technologies) vagy saját tervezésű array-eket [34, 116] használtunk. Minta típustól függően 2000 pg – 500 ng RNS reverz transzkripcióját végeztük Megaplex Primer Pools (Human Pools Set v3.0, #4444750) és TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit ((#4366596; #4366597, Life Technologies) segítségével. Második lépésben preamplifikációt végeztünk Megaplex Preamp Primer szettet (#4399233) és TaqMan PreAmp Master Mix-et (#4391128) alkalmazva. A miRNS array-eket azután 7900 HT Fast RealTime PCR System vagy ViiA7 Real Time PCR rendszeren (Life Technologies) futtattuk.

III.2.5.6. miRNS expressziós profil meghatározása újgenerációs szekvenálás segítségével

A miRNS expresszió újgenerációs szekvenálási mérésekhez két platformot használtunk: SOLiD-AppliedBiosystems és Illumina genetikai analízist.

SOLiD újgenerációs szekvenáláshoz első lépésben kis RNS dúsítást végeztünk teljes RNS-ből miRNA Isolation Kit (#AM1560, Invitrogen) segítségével [119]. A miRNS könyvtárkészítéshez a Small

RNA Expression Kit-et alkalmaztuk (#4399434b, SOLiD™ Small RNA Expression Kit Protocol, Applied Biosystems) követve a gyártói utasításokat. A templát preparálást, emulziós PCR-t és tisztítást követően a szekvenálást (deep-sequencing) SOLiD V2 Sequencing System (Applied Biosystems) segítségével végeztük a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biokémiai Intézetének szekvenáló platformján. Az adatok analízise a CLCBio Genomics Workbench v5.0 Small RNA Analysis algoritmusával történt az alapbeállított minőségi és trimming paraméterek alkalmazásával. Referenciának a miRBase adatbázis érett miRNS szekvenciáit használtuk (2018. november), majd globális normalizációt végeztünk minden egyes mintára.

A minták többsége esetében a miRNS expressziós profilt *Illumina* platformon határoztuk meg. Világossejtes veserák és hepatocelluláris karcinóma xenograft szövetekből izolált RNS-ből cDNS könyvtárakat a TruSeq Small RNS Library Sample prep kit (#RS-200-0012, Illumina) segítségével készítettük [85, 132]. A könyvtárak minőségét Bioanalyzer High Sensitivity DNA Kit-tel (#5067-4626, Agilent Technologies) ellenőriztük, a szekvenálást az Illumina Hi-Seq 2500 platformon (Illumina) végeztük. Az leolvasott rövid szekvenciákat (read-eket) a miRBase adatbázis v20. (2014. február) érett RNS-szekvenciákhoz illesztettük a novoalign v2.08.02 algoritmussal. Az expresszió meghatározásához EdgeR és limma elemzési csomagot használtunk.

Hypophysis onkocitómák, plazma és szérum miRNS szekvenálásához a teljes RNS mintákból 5 µl-t kivéve készítettünk könyvtárat a QIAseq™ miRNS Library Kit (Cat#331505, Qiagen) felhasználásával a gyártó utasításait követve [125]. Az adapter ligálását követően először a miRNS-ek 3', majd 5' végén végeztünk univerzális reverz-transzkripciót minden mintán. Az RT primerek tartalmazták az egyedi molekuláris indexeket (UMI, unique molecular index) is. A cDNS a könyvtár mágneses gyöngyös tisztítását követően a szekvenálást Illumina MiSeq készüléken futtattuk 150 ciklusos MiSeq Reagent Kit v3 (#MS-102-3001, Illumina) használatával. Az adatanalízishez a GeneGlobe Data Analysis Center algoritmusait alkalmaztuk (<https://geneglobe.qiagen.com/us/analyze>). A nyers leolvasásokat a 3' adapter és a gyenge minőségű bázisok cutadapt (<http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>) segítségével történő levágásával dolgoztuk fel. A leolvasott szekvenciákat (read-eket) a miRBase v21 adatbázisban található referencia érett miRNS-szekvenciáihoz illesztettük bowtie algoritmus (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) segítségével. Az UMI-k segítségével meghatároztuk a miRNS expressziókat, a normalizálást a TMM és a GeNorm algoritmusokkal végeztük a daganatszövet minták esetében. Plazma miRNS méréseknél globális normalizációt végeztünk (A leolvasásokat normalizáltuk az egyes minták teljes leolvasásszámahoz, és 10 000 leolvasásra vonatkoztatott leolvasásszámként adtuk meg (normalizált leolvasásszám)) [121]. Az IsomiR-elemzéseket az isomiR-SEA algoritmus segítségével végeztük [133].

III.3 Alkalmazott sejtvonalak és *in vitro* funkcionális vizsgálatok

III.3.1 Felhasznált sejtvonalak, tenyésztési módszerek és alkalmazott kezelések

Az *in vitro* vizsgálatainkban világossejtes veserák, endotél, hipofízis neuroendokrin tumor, feokromocitóma és mellékvesekéreg karcinóma sejtvonalakat használtunk (3. táblázat). A sejteket az

henriettbutz_199_24

American Type Culture Collection (ATCC) és az LGC Standards Ltd. (European partner of ATCC) cégtől vásároltuk. A sejteket az ATCC ajánlásai szerint tenyésztettük, a fenntartás során 100 U/ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin antibiotikumot adtunk a tápoldatokhoz, a kísérletekhez legfeljebb 20 passzázsra használtuk őket. Fenntartáshoz a sejteket 25 és 75 cm² -es flasksban tenyésztettük 37°C-on, 5%-os CO₂ termosztátban. A sejtek többségénél a tápoldatot hetente háromszor cseréltünk, és hétfőn, illetve pénteken passzáztunk, azonban mindig igazodtunk a sejtek igényeihez a sejtszámok függvényében. Miután a sejtek elérték a 90%-os konfluenciát, 0,05%-os tripszin-EDTA (#25300062, Invitrogen) segítségével passzáztunk. A kísérleteket 6, 24, 48 és 96 lyukú tenyésztőedényekben (plate-eken) végeztük.

3. táblázat. A kísérletekben alkalmazott sejtvonalak és kezelőszerek

Alkalmazott sejtvonalak		
Sejtvonal Neve	Sejtvonal szöveti eredete	Tenyésztéshez használt tápoldat összetétele
786-O	primer ccRCC, humán	RPMI-1640 Medium; 10% FBS
ACHN	ccRCC pleurális metasztázisa, humán	Eagle's Minimum Essential Medium; 10% FBS
Caki-2	primer ccRCC, humán	McCoy's 5a Medium Modified; 10% FBS
HUVEC	köldökvéna vaszkuláris endotélium, humán	F-12K Medium; 10% FBS; 0,1 mg/mL heparin; 0,03 mg/mL ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement)
RC-4 B/C	hipofízis elülsőlebeny adenoma, plurihormonális (LH, GH, FSH, prolaktin, ACTH és TSH β-alegység termelő), patkány	45% Dulbecco's modified Eagle's medium (4 mM L-glutamin; 1,5 g/L nátrium-bikarbonát; 4,5 g/L glükóz tartalmú); 45% alpha minimum essential medium (1 g/L glükóz tartalmú); 10% dializált hőinaktivált FBS; 0,01 mM nem-esszenciális aminosav keverék; 15 mM HEPES; 0,2 mg/ml BSA (bovine serum albumin); 2,5 ng/ml EGF (epidermális növekedési faktor)
GH3	hipofízis elülsőlebeny adenoma, növekedési hormon és prolaktin termelő, patkány	F-12K Medium; 2,5% FBS; 15% lószérum (horse serum)
PC12	feokromocitoma, patkány	Ham's F-12K medium (L-glutamin és nátrium-bikarbonát tartalmú); 15% lószérum (horse serum); 2.5% FBS
H295R	mellékvesekéreg karcinóma, aldosteron, kortizol és C19 szteroid (androgének) termelő, patkány	DMEM-F12 Medium; 10% FBS; 2,5% Nu-Serum; 1% ITS+ Premix (inzulin, transferrin, szelén, BSA és linolén sav)
Alkalmazott kezelések		
Kezelőszerek neve	Katalógusszám (forgalmazó)	Alkalmazott végkoncentráció
Sunitinib	#S1042 (SelleckChem)	0,1 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM
Acetil-szalicilsav (aspirin, ASA)	#A5376, (Sigma)	1 mM; 5 mM
YM155 (survivin inhibitor)	#S1130 (SelleckChem)	0,1 µM; 0,25 µM; 0,5 µM
TRAIL (TNFSF10, humán rekombináns)	#310-04-1MG (ThermoFisher Scientific)	2 µg/ml
Decitabin	#A10292 (Adooq)	10 µM

BSA: marha szérum albumin (bovine serum albumin); EGF: epidermális növekedési faktor; ECGS: endotheliális sejt növekedést elősegítő kiegészítő komponens (Endothelial Cell Growth Supplement); FBS: főtális marhaszérum (fetal bovine serum); HEPES: 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinétánszulfonsav – puffer; TRAIL: tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand

III.3.2. Géntechnológiai és nukleinsav beviteli módszerek

III.3.2.1. Klónozás – Expressziós és riporter vektorkonstrukciók létrehozása

A Survivin fehérje funkcionális vizsgálatához expressziós vektort terveztünk [117]. A patkány *Birc5* (survivin) gén analíziséhez genomi DNS-t izoláltunk RC-4 B/C patkány hipofízis neuroendokrin tumor sejtekből. A *Birc5* kódoló szekvenciát PCR-amplifikáltuk az általunk tervezett egyedi primerek segítségével. *Birc5*-ex1F: 5'-CGGAAGGCGACTTTTCCAG-3'; *Birc5*-ex1R: 5'-TGTGTATGAACGCCGAGGTG-3'; *Birc5*-ex2F: 5'-CTCTCGGCCCGGAAGATT-3'; *Birc5*-ex2R: 5'-TCCAGTTCTTCCCAAAGACTCC-3'; *Birc5*-ex3F: 5'-AAAGACAGCCGTGGAGATGG-3'; *Birc5*-ex3R: 5'-TCCC TGAGACAGATCCCCAG-3'; *Birc5*-ex4F: 5'-CTCCCTTGGTAGGCGAGC-3'; *Birc5*-ex4R: 5'-CGGTCTCC TGTAAGACACCAA-3'. A *Birc5* cDNS-t RC-4 B/C patkány hipofízis adenoma sejtek mRNS-éből állítottuk elő reverz transzkripcióval, amely templátként szolgált a plazmid inzert amplifikációjához a következő primerekkel: F 5'-CGAAGCTTCACCATGGGTGTGCTCCGGCGCTGGGGGGGC-3' és R 3'-CGTCTAGAGTCAGCGTAAGGCAGCCAGCTG-3'. Az amplifikációhoz nagy hűségű („high fidelity”) DNS-polimerázt (#M0530, New England Biolabs) enzimet használtunk. Az inzertet pcDNA3.1 vektorba (#V79020, Thermo Fisher Scientific) klónoztuk XbaI és HindIII-HF restrikciós enzimek (#R0145 és #R3104, New England Biolabs) segítségével. A ligálást T4 DNS-ligázzal (#M0202, New England Biolabs) végeztük 16 °C-on egy éjszakán át. A plazmid bevitelét kémiai szempontból kompetens *Escherichia coli* DH5α (#18265017, Invitrogen) hősokk transzformálásával végeztük. Ampicillintartalmú LB agarra való kiültetést és egy éjszakán át 37 °C-on tenyésztést követően telep PCR segítségével két pozitív klónt kiválasztottunk, majd tovább tenyésztettük folyékony LB tápoldatban 37 °C-on egy éjszakán át. A rekombináns plazmid DNS izolálásához PureLink HiPure plazmid Midiprep Kitet (#K2100-03, ThermoFisher Scientific) használtunk. A konstrukció (pBirc5) szekvenciáját kétirányú Sanger szekvenálással igazoltuk a következő primerek alkalmazásával: F 5'-AGAACCCACTGCTTACTGGC-3' R 5'-GGCAAACAACAGATGGCTGG-3' [117].

Az mRNS-miRNS interakció vizsgálatához luciferáz riporter vektort készítettünk [125]. Az Akonitáz 2 (*ACO2*) riporter vektor készítéséhez az *ACO2* 3'-UTR (ENST00000216254.8) régióját amplifikáltuk humán genomi DNS-ből a következő primerekkel: F 5'-CCATCCTCCTGAACCACACC-3' és R 5'-GCCTCCACTGACCTTGACTG-3'. Az amplifikált szekvenciát 5'→3' irányban pGL3control vektorba (#E1751, Promega) klónoztuk a szentjánosbogár (firefly) luciferáz gén 3' végére az XbaI restrikciós enzimhasító helyen (pACO2). A transzformálást, klónszelekciót és plazmidtisztítást a fent leírt módon végeztük. Negatív kontrollként a pGL3-control vektort használtunk [125].

A *Pttg1* (pituitary tumour transforming gene 1) promoteraktivitás vizsgálatához szintén luciferáz riporter vektort készítettünk [123]. A *Pttg1* 5'-UTR 201 ENSRNOT00000005070.5 régiójából 2090 bp-t klónoztunk 5'→3' irányba pGL3promoter vektorba (#E1761, Promega) a szentjánosbogár (luciferáz) gén elé (5' végére). A *Pttg1*-luc konstrukciót (pPttg1) direkt Sanger szekvenálással és az alap luciferáz aktivitás detektálással ellenőriztük. A többi lépést a fent leírtaknak megfelelően végeztük.

III.3.2.2. Transzgén konstrukció bejuttatása

Survivin túlexpresszázó PitNET sejtek létrehozásához a pcDNS3.1-Birc5 (pBirc5) vektort használtunk, melyet X-tremeGENE HP DNS transzfekciós reagenssel (#XTGHP-RO, Sigma) és Opti-MEM I Reduced Serum Medium (#31985062, Gibco) segítségével transzfektáltunk antibiotikum nélkül. Az expressziós szintet western blot segítségével határoztuk meg a transzfekció után 48 órával. A transzfekció hatékonysága 80% volt, amelyet GFP (green fluorescent protein)-tartalmú plazmid (pGFP) transzfekciójával kontrolláltunk [117].

III.3.2.3. Géncsendesítés siRNS-sel

A kiválasztott gének funkciójának vizsgálatához géncsendesítést végeztünk siRNS segítségével [115–117]. A sejteket Lipofectamine RNAiMAX (#13778075, Life Technologies) és OptiMEM (#31985062, Life Technologies) segítségével transzfektáltuk a *KIAA0101* gén elleni különböző LNA® siRNS-ek (#s18861, #s18863, Silencer Select, ThermoFisher Scientific; 30 nM), *CAV1* (#s2448 Silencer Select, ThermoFisher Scientific) vagy *FLOT1* (#s19915, Silencer Select, ThermoFisher Scientific), *MDGA1* (#s49009 vagy #s49011, Silencer Select, ThermoFisher Scientific, 100 nM), *BIRC5* (#s133761, #s133762, Silencer Select, ThermoFisher Scientific) specifikus siRNS-ek, vagy target nélküli kontroll siRNS (#4390843, ThermoFisher Scientific, 30 nM) alkalmazásával. A transzfekciókat BLOCK-iT fluoreszcens oligóval (#2013, Life Technologies) optimalizáltuk. A géncsendesítést qPCR és western blot segítségével ellenőriztük.

III.3.2.4. miRNS transzfekció

A miRNS-ek funkciójának vizsgálatához a következő pre-miR prekursorokat, miRNA mimics-eket és miRNA inhibitorokat használtuk: miR-124-3p (#MC10691), miR-30a-5p (#MC11062), miR-200c-3p (#MC11714), miR-1 (#MC10617), miR-663a (#MC11581), miR-744-5p (#MC13027), miR-127-3p (#MC10400) vagy target nélküli kontroll miRNA mimics (#44640633, #4464058, non-targeting control, NTC, ThermoFisher Scientific). A transzfekcióhoz LipofectamineRNAiMAX (#13778075, Life Technologies) vagy siPORT NeoFX transfection agent (#AM4510, ThermoFisher Scientific) reagenst használtunk követve a gyártói utasításokat (30, vagy 120 nM koncentrációban kísérlettől/sejtvonaltól függően) [116, 132, 134]. A transzfekciókat BLOCK-iT fluoreszcens oligó használatával (#2013, Life Technologies) optimalizáltuk. A transzfekciók hatását 24 óra elteltével RT-qPCR-rel ellenőriztük a kivont RNS-ből TaqMan próbák segítségével.

III.3.2.5. miRNS átvitel exoszómák segítségével

Az ACHN, Caki-2 és 786-O sejteket az ajánlott médiumban antibiotikumok nélkül tenyésztettük. A sejteket három napig 10% exoszóma-mentesített FBS-t (#EXOFBS50A1, System Biosciences, Mountain View, CA, USA) tartalmazó tápoldatban tartottuk [34]. Exoszóma-mentesített FBS-t használva 100 000 sejtet ültettünk (/well) 12 lyukú tenyésztőedényre. A következő naptól kezdve 1 mL médiumot gyűjtöttünk az 1., 2. és 4. napon. Az exoszómák sejtek közötti átviteléhez az

henriettbutz_199_24

exoszómákat tisztítottunk ExoQuick TC-kittel (#EXOTC10A1, System Biosciences) 786-O sejtek felülűszűjából. Az exoszóma pelleteket 100 μ l steril PBS-ben reszuszpendáltuk. A konfokális mikroszkópiához az exoszómákat Exo-Red festékkel (#EXOR100A-1, System Biosciences) jelöltük a gyártó protokollja szerint. A jelölt exoszómákat ezután metasztatikus ACHN, Caki-2 és endoteliális HUVEC sejtekhez adtuk. 24 órával később a sejteket kétszer mostuk PBS-sel, és az intracelluláris exoszóma felvételét élő sejteken Leica TCS SL konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk 460 nm-es gerjesztési és 650 nm-es emissziós hullámhosszakon.

III.3.2.6. Riporter vektor ko-transzfekció – mRNS-miRNS interakció validálás és promoter aktivitás mérés

A miRNS-mRNS interakciók bizonyításához 96 lyukú tenyésztőlemezen 10^4 /well sejtet ültettünk ki a transzfekció előtti napon antibiotikum mentes tápoldatban [125]. A sejteket riporter vektorral: [75 ng pACO2 szentjánosbogár (firefly) luciferáz vektorral vagy pGL3-control negatív kontrol vektorral és 75 ng transzfekciós kontrol renilla (pRL-control, #E2231, Promega) vektorral], valamint és miRNS mimics-szel [30 nM miR-744-5p, miR-127-3p mirVana™ miRNA mimics (#MC13027, MC10400) vagy target nélküli kontroll miRNS-sel (Non-targeting control #1 (NTC): #4464058, ThermoFisher Scientific)] kotranszfectáltuk PANfect A-plus transzfeckciós reagens (#P02-8110, PAN Biotech) használatával.

A PTTG1 promoter aktivitás vizsgálatához RC-4B/C sejteket 96 lyukú tenyésztőlemezen lyukanként 10^4 /well koncentrációban ültettünk ki antibiotikum mentes tápoldatban a transzfekció előtti napon. Másnap 150 ng pPttg1 vagy kontroll pGL3-promoter plazmiddal és 150 ng renilla luciferáz vektorral (pRL-control, #E2231, Promega) Lipofectamine 3000 (ThermoFisher Scientific) használatával a gyártó utasításai szerint [123].

A transzfekció hatékonyságát minden luciferáz kísérlet esetében pRL Renilla Luciferase Control Reporter Vector (pRL-control, #E2231, Promega) plazmid kotranszfekcióval kontroláltuk. A luciferáz mérést 24 órával a transzfekciókat követően végeztük el Dual-Glo luciferáz kit segítségével (#E2920, Dual-Glo Luciferase Assay System, Promega), a gyártó protokolljának megfelelően. A szentjánosbogár luciferáz aktivitását a transzfekciós hatékonysághoz igazítottuk úgy, hogy minden minta renilla luciferáz aktivitására normalizáltuk. A lumineszcencia mérést Varioskan™ Flash Multimode Reader (ThermoFisher Scientific) készülékkel végeztük.

III.3.3. In vitro funkcionális vizsgálatok

III.3.3.1. Viabilitás, proliferáció és élő-halott sejt arány meghatározás in vitro festékek alkalmazásával

A sejtek életképességét/proliferációját (#05015944001, Roche Applied Science), Alamar Blue assay (#DAL1025, Thermo Fisher Scientific) reagenssel vizsgáltuk [115–117, 125, 135] 96 well plate-ekre ültetett sejteken, az optikai denzitást Thermo Scientific Varioskan Flash készülékkel (ThermoFisher Scientific) mértük. A proliferációvizsgálatához emellett sejtszámolást és élő-halott

sejtszámok és arány meghatározást végeztünk 6-lyukú lemezekben tenyésztett sejteken. Tripszines emésztést követően 0,4%-os Trypan Blue (#15250, ThermoFisher Scientific) exklúziós festést alkalmaztunk. Bürker kamra segítségével számoltuk az össz, az élő és a halott sejtek számát/arányát.

III.3.3.2. Kaszpáz-3 apoptózis vizsgálat

A sejtek kaszpáz-3 aktivitását Caspase-3 kolorimetriás proteáz kit (#KHZ0021, ThermoFisher Scientific) segítségével határoztuk meg [117]. A sejteket hűtött sejtlízis pufferben szuszpendáltuk, és jégen inkubáltuk 10 percig. 10000×g-n végzett 1 perces centrifugálás után a felülúszók (citoszol kivonat) fehérjekoncentrációját BCA assay-vel mértük (#B6916, Sigma). Ezután egyenlő mennyiségű fehérjét inkubáltunk 37°C-on 10 mM DTT-t és 200 uM DEVD-pNA szubsztrátot tartalmazó reakciópufferrel 2 órán keresztül. Az optikai denzitást 405 nm-en mértük egy Thermo Scientific Varioskan Flash készülékkel (ThermoFisher Scientific)

III.3.3.3. DNS fragmentáció vizsgálata

A DNS-lebomlás/fragmentáció az apoptózis vagy a nekrosis jelenlétének kulcsfontosságú tényezője. A sejthalál DNS-fragmentációs vizsgálattal történő kimutatására a sejteket egy 6 lyukú lemezen tenyésztettük és kezeltük. A kezelést követően DNS-t izoláltunk, a DNS degradáció mértékét 1% etidiumbromidot tartalmazó agarózgélben elemeztük [117].

III.3.3.4. Áramlási citometriás sejtciklusanalízis, proliferáció és apoptózis/nekrosis mérések

A sejtciklus analíziséhez a sejteket 1xPBS-sel mostuk, majd jéghideg 70%-os etanollal fixáltuk 15 percig jégen. Ezután a sejteket PBS-mosást követően centrifugáltuk, majd a sejtpelletet 20 mg/ml RNase A oldatban (#LS005649, Worthington Biochem) reszuszpendáltuk, és 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Propidium-jodidot (#556463, BD BioSciences) adtunk hozzá 50 ug/ml végkoncentrációban, és egy éjszakán át 4° C-on inkubáltuk [116, 117]. Sejtciklusanalízishez a klasszikus propidium-jodid festés mellett Cycloscope Reagent DNA labeling solution festéssel is vizsgáltuk (#CYT-CS-R-50; Cytognos) [123], ahol 500 000 sejtet 0,5 mL reagenssel festettünk 10 percen át szobahőmérsékleten sötétben inkubálva. A DNS-tartalmat és a sejtciklus fázisokat áramlási citometriával határoztuk meg MACS Quant (MiltenyiBiotec), FACSCalibur (BD Biosciences) vagy BD FACS Lyric flow cytometer (Becton Dickinson) áramlási citométeren. Az adatokat a Multicycle AV (FCS Express, DeNovo Software), ModFit és Cell Quest Pro (BD Biosciences), vagy Kaluza 2.1.1 (Beckman Coulter) szoftverek segítségével elemeztük [116, 117, 123].

A *sejtproliferációt* karboxifluoreszcein-diacetát-szukcinimidil-észter (CFSE, #422701, BioLegend Inc) festékhígulással is elemeztük áramlási citometriás mérést követően [116]. A vizsgálandó sejteket CFSE festékkel jelöltük a gyártó utasításainak megfelelően. Röviden, a sejteket tripszinizáltuk és 1xPBS-ben 5×10^6 sejt/ml koncentrációban szuszpendáltuk. A sejteket 1 uM

henriettbutz_199_24

végkoncentrációjú CFSE-vel kevertük 10 percig, majd 10 ml jéghideg teljes médiummal állítottuk le a festés folyamatát és kétszer mostuk. Ezután a sejteket 60 cm-es² tenyésztőlemezre ültettük ki 4,5x10⁶ sűrűségében, majd 24 órával később 30 nM miR-124-3p mimics-szel vagy nem célzott kontrollal transzfektáltuk a fent leírtak szerint. 48 óra elteltével a sejteket tripszináltuk, PBS-sel mostuk, és a CFSE hígulást áramlási citometriával határoztuk meg MACS Quant (MiltyeniBiotec) készüléken. A felvett adatokat az FCS Express 4 (DeNovo Software) segítségével elemeztük élő, egysejtes kapuk alapján, majd proliferációs elemzéssel modelleztük az egyes populációk generációs csúcsait és proliferációs indexét.

A sejtproliferáció jellemzéséhez emellett Ki-67 festést is végeztünk [123]. Ehhez 500 000 sejtet fixáltunk 15 percig szobahőn 100 µL IntraStain A reagenssel (#K2311, Dako-Agilent). PBS-sel (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH = 7,4) történő mosás után (5 perc, 400 g, szobahőmérséklet) a pelletet 100 µL IntraStain B reagensben szuszpendáltuk, amely 0,4% Triton X-100 mellett 5 µL Ki67 antitestet (#2352515, Sony Biotechnology) tartalmazott. 15 perc szobahőmérsékleten, sötétben történő inkubálást követően a sejteket ismét mostuk (5 perc, 400 g, szobahőmérsékleten). A pelletet 0,5 ml PBS-ben szuszpendáltuk, amely 0,01 mg/ml 2-(4-amidinofenil)-6-indolkarbamidint (DAPI) tartalmazott és 30 percig szobahőmérsékleten, sötétben inkubáltuk. A mintákat BD FACS Lyric áramlási citométeren (Becton Dickinson) mértük. Minden esetben legalább 50 000 sejt mérését végeztük el. A kísérletet háromszor ismételtük. A mért adatokat Kaluza 2.1.1 szoftverrel elemeztük (Beckman Coulter).

A *sejthalál* formáit (apoptózist és nekrozist) Annexin V (#556420, BD Biosciences) és Propidium-jodid (PI) (#556463, BD Biosciences) együttes festésével analizáltuk [132]. 24 óra 0,1, 1,0, 5,0, 10,0 µM szunitinib kezelést követően az ACHN sejteket begyűjtöttük és kötőpufferben szuszpendáltuk, majd Vi-Cell készülék (Beckman) segítségével megszámoltuk. Annexin V (AV) vizsgálatot Annexin V-FITC festéssel végeztük 15 percig 4°C-on, sötétben. Ezután a festett sejteket kötőpufferben szuszpendáltuk, és PI hozzáadása után áramlási citometriával elemeztük MACS Quant áramlási citométeren (Miltyeni Biotec) >500 evs/s eseményszám mellett. Az adatokat a Multicycle AV (FCS Express) segítségével elemeztük. Az intakt sejteket AV-/ PI-, a korai apoptózist AV+/PI-, az apoptózist AV+/PI+ és a nekrotikus/elhaló sejteket AV-/PI+ jellemezte [136].

III.3.3.5. Migráció, invázió vizsgálata

A sejtek migrációs és inváziós képességét kétféle módszerrel vizsgáltuk: transzwell és klasszikus sebgyógyulási (wound healing vagy scratch) assay-kel.

A *transzwell* migráció és invázió tanulmányozásához 8,0 µm pórusméretű sima és extracelluláris mátrix-szal bevont inzertereket használtunk (#354578 és #354480, BD-Biocoat, Corning) követve a gyártói utasításokat [115, 116]. Huszonnégy óra elteltével a kitben meghatározottakat követve az inzer membránokat fixáltuk, a belső oldalukról a sejteket fizikálisan eltávolítottuk. A membránokat ezt követően megfestettük, a túloldalra migrált/invazív sejteket mikroszkóppal számoltuk. A migráció/invázió vizsgálatokor hydroxyureát alkalmaztunk a sejtproliferáció gátlására [116].

henriettbutz_199_24

A migrációt emellett a klasszikus sebgyógyulási („wound-healing” vagy „scratch”) vizsgálattal is értékeltük [115, 116, 123]. A sejteket 12 lyukú lemezre ültettük. A konfluens sejtenyészeten 24 órával a kezelés/transzfekció után 200 μ L-es pipettahegy segítségével hosszanti „sebet” („scratch”) ejtettünk. A sebesítés időpontjától (0 óra) kezdődően 30 percenként mikroszkópos felvételeket készítettünk 37 °C-on és 5% CO₂ inkubációs kamrában. A mikroszkópot úgy programoztuk, hogy a képek sorozatát pontosan ugyanazon a meghatározott helyeken készítse el (Zeiss ZEN). A sejt-vándorlás elemzéséhez az Image J szoftvert (National Institutes of Health, Bethesda, ME, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>) használtuk, a sejtmentes terület százalékos arányát és a sejt-vándorlási sebességet a sejtekkel borított terület százalékos arányaként számoltuk.

III.3.3.6. In vitro szunitinib rezisztencia modell létrehozása

In vitro szunitinib rezisztencia modellt folyamatos szunitinib kezeléssel alakítottunk ki, melyet több koncentrációval 0,1, 1, 5, 10 μ M próbáltunk [132]. A különböző szunitinib koncentrációk hatását a veserák sejtvonalak apoptózisának kiváltására Annexin V-Propidium-jodid áramlási citometriával és Alamar Blue viabilitási teszttel vizsgáltuk.

III.4. In vivo állatkísérletes módszerek

Minden állatokon végzett munkát intézeti etikai jóváhagyást követően végeztünk és követtük az intézményi állatgondozási irányelveket.

III.4.1. PitNET xenograft modell létrehozása

PitNET GH3 és RC-4 B/C xenograft modellek előállítására beltenyésztett SCID egereket használtunk [117]. A 6-8 hetes hím egereket szubkután injektáltuk Matrigel Matrix-szal (#354262, Corning) kevert GH3 és RC-4 B/C sejtekkel a csípő magasságában. A tumor méretét hetente egyszer mértük kaliperrel, és a tumor térfogatát [szélesség² $\times$ hossz $\times$ 0,5] képlettel határoztuk meg. Az RC-4 B/C xenograftok esetében fokozatosan növekvő sejtszámmal végeztük el a xenograft injekciót (5 $\times$ 10⁶, 10 $\times$ 10⁶ és 20 $\times$ 10⁶ /injektálás). Minden kísérletben két egeret használtunk, és háromszor megismételtük. Pozitív kontrollként GH3 sejtekből képzett xenograft modellt alkalmaztunk 10 $\times$ 10⁶ sejt/egér injektálásával.

III.4.2. ccRCC xenograft létrehozása, szunitinib rezisztencia modell vizsgálata

A világossejtes veserák szunitinib rezisztencia modellezéséhez nőstény NOD/SCID/ γ egereket használtunk [132]. Öt hetes egerekbe 786-O humán RCC sejtvonalat fecskendeztük be szubkután, 1,5 $\times$ 10⁶ sejtet alkalmazva mindkét csípő magasságában. A tumor méretét hetente kétszer mértük kaliper segítségével, és a tumor térfogatát a fentiek alapján számoltuk ki. A tumorképződés után (~1 hét) az állatok naponta (heti 7 napon) szájon át kaptak vagy szunitinibet citrát-pufferelt (pH 3,5) oldat formájában 40 mg/kg dózisban vagy vivőanyagot. A terápiás választ a RECIST-kritériumok szerint értékeltük. Az egereket a következő időpontokban áldoztuk fel: kontrollcsoport ($N = 4$), szunitinib-

érzékeny (3 hetes kezelés, válasz és a rezisztencia jelei előtt) ($N = 5$) és rezisztens csoport (10 hetes kezelés, rezisztencia a kezdeti válasz után) ($N = 7$). A boncoláskor a xenograft tumorokat RNA later oldatban tároltuk a további felhasználásig. A veséket, májat és tüdőt is begyűjtöttük formalin fixálás és immunhisztokémiai elemzés céljából.

III.4.3. HCC xenograft létrehozása, szorafenib rezisztenciamodell vizsgálata

A hepatocelluláris karcinóma xenograft modellhez ortopikus modellt használtuk, ahol Hep3B-hCG sejteket injektálunk hathetes hím CB17 SCID egerek májába [85, 137]. A daganatos egereket longitudinális ultrahangos képalkotó vizsgálatra (kezdetben $n=24$) vagy molekuláris/szövettani analízisre ($n=41$) osztottuk szét, majd naponta vívívőanyaggal vagy 30 mg/kg szorafenibbel kezeltük *per os* gyomorszondán keresztül. A molekuláris/szövettani elemzéshez a kezdeti választ és később szerzett rezisztenciát mutató reprezentatív egereket öt különböző csoportban ($n = 6$ /csoport) áldoztuk fel a szorafenibb-érzékeny és szerzett rezisztens daganatok (HCC) értékelésére („kontroll”, „érzékeny”, „korai rezisztencia”, „késői rezisztencia”, „stop” (késői rezisztens csoport leállított kezeléssel a reverzibilis változások vizsgálatához) csoportok).

III.5. Fehérje alapú vizsgálati módszerek

III.5.1. Fehérje extrakció és western blot

A friss mintákból a teljes fehérje extrakciójához a szöveteket kézi homogenizátorral homogenizáltuk jég hideg foszfát pufferelt sóoldatban (PBS), vagy lízis pufferben (T-PER Tissue Protein Extraction Reagent, #78510, ThermoFisher Scientific) melyet 1:100 proteáz-inhibitor koktéllal (#P3840, Sigma-Aldrich) egészítettünk ki. A sejtvonalak esetében a sejteket jégen, hideg lízispufferrel (100 mM NaCl, 30 mM Hepes (pH 7,5), 20 mM NaF, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, kiegészítve 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF és 1:100 proteáz-inhibitor koktéllal) lizáltuk. Ezt követően a sejttörmeleket centrifugálással távolítottuk el (30 percig 4 °C-on, 14 000 fordulat/perc), majd a felülúszót használtuk fel a további vizsgálatához. A fehérjekoncentrációt mindkét esetben BCA Protein Assay-vel (#23228, Pierce Biotechnology) határoztuk meg.

A teljes fehérjét 6% vagy 10%-os poliakrilamid gélen (SDS-PAGE) futtatuk, nitrocellulóz membránra vittük át, és a primer antitestekkel egy éjszakán át inkubáltuk (**4. táblázat**). A mosások után HRP konjugált szekunder antitesteket alkalmaztunk és elektrochemilumineszcens előhívó oldattal (Pierce ECL Western Blotting Substrate, #32106, ThermoFisher Scientific) vizualizáltuk az antitesttel megjelölt sávokat. A membránokat azután ún. „stripping” pufferrel (15g glicin, 1g SDS, 10 ml Tween 20, 1000 ml térfogatra feltöltve ioncserét vízzel és sósavval pH 2,2-re állítva) kezeltük az antitestek eltávolításához, majd β -aktin ellenes antitesttel újrafestettük a betöltött fehérjemennyiség ellenőrzése (loading control) céljából. A sávok intenzitását az Image J szoftver (Bethesda, MD, USA) segítségével számszerűsítettük.

4. táblázat. Western blothoz és immunhisztokémiához alkalmazott antitestek

henriettbutz_199_24

Antitest	Katalógus szám, forgalmazó	Hígítás	Módszer
acetyl-p53	#bs-0905R, Bioss Antibodies	1:500	WB
anti-goat HRP conjugated IgG	#sc-2354, Santa Cruz Biotechnology	1:10000	WB
anti-mouse HRP conjugated IgG	#W402B, Promega	1:10000	WB
anti-mouse HRP conjugated IgG	#P044701, Agilent Technologies	1:2000	WB
anti-rabbit HRP conjugated IgG	#W401B, Promega	1:10000	WB
anti-rabbit HRP conjugated IgG	#P044801, Agilent Technologies	1:2000	WB
CAV1	#3238, Cell Signalling Technology	1:1000	WB
CCNA2	#MA1-154, ThermoFisher Scientific	1:1000	WB
CDK2	#2546, Cell Signaling Technology	1:1000	WB
FLOT1	#3253, Cell Signalling Technology	1:1000	WB
FRAS1	#sc-98444, Santa Cruz Biotechnology	1:100	WB
MDGA1	#AB2226, Sigma	1:200	WB
p53	#2524, Cell Signaling Technology	1:1000	WB
pCDK2 (p-Thr160)	#2561, Cell Singaling Technology	1:1000	WB
PTTG1	#sc-56207, Santa Cruz Biotechcnology	1:2000	WB
Survivin	#2808, Cell Signaling Technology	1:500	WB
β-Actin	#3700, #4967 Cell Signalling Technology	1:1000	WB
5-hmC	#39769, Active Motif	1:1000	IHC
AHR	#NB100-128SS, Novus Biologicals	1:200	IHC
anti-rabbit HRP conjugated IgG	#P0448, Agilent Technologies	1:200	IHC
CDC2 (CDK1)	#9116, Cell Signalling Technology	1:40	IHC
CDC25A	#sc-56264, Santa Cruz Biotechnology	1:100	IHC
CDC25C	#sc-327, Santa Cruz Biotechnology	1:100	IHC
Drosha	#ab12286, Abcam	1:100	IHC
GRHL2	#NBP1-88552, Novus Biologicals	1:400	IHC
KIAA0101	#H00009768-M01, Abnova Corporation	1:150	IHC
pCDC2 (p-Tyr15)	#NBP1- 19966, Novus Biologicals	1:40	IHC
Pit1	#NBP1-92273, Novus Biologicals	1:5000	IHC
SF1	#N1665, ThemoFisher Scientific	1:500	IHC
Survivin	#2808, Cell Signaling Technology	1:4000	IHC
Tpit	#CL6251, Atlas Antibodies	1:2000	IHC
UHRF1	#PA5-29884, Thermofisher Scientific	1:2000	IHC
UHRF2	#PA5-40969, Thermofisher Scientific	1:800	IHC

III.5.2. Szöveti microarray blokkok készítése és kiértékelése

A világossejtes veserák immunhisztokémiai vizsgálataihoz szöveti microarray (tissue microarray, TMA) blokkokat készítettünk 383 primer ccRCC beteg daganatszövet mintájából. Ezen minták esetében 85 azonos betegből, a daganatszövet mellől származó, egészséges normál szövet is rendelkezésre állt. A normál és daganatos szövetek tiszta elkülönítése és a mezőhatás elkerülése érdekében a vese másik pólusából, illetve a tumortól legalább 2 cm távolságra lévő normális szövetet nyertünk, melyeket szintén kontrollként használtunk. A hisztológiai diagnózist és tumor-normál területek kiválasztását patológus szakorvos segítségével végeztük. A TMA készítéséhez minden tumorból két 1,0 mm-es mintát („core”-t) nyertünk, majd azokat patológus által ellenőriztük [115]. Az immunfestődés értékelésére egy arány- és egy intenzitás-pontszám kombinációját használtuk: az arány-pontszám (a pozitív tumorsejtek aránya a vizsgált metszeten) a következő volt: 0: nincs, 1: 1-

henriettbutz_199_24

24%, 2: 25-49%, 3: 50-74, 4: $\geq 75\%$. Az intenzitás pontszám (a tumorsejtek festődésének intenzitása): 0: nincs, 1: gyenge, 2: mérsékelt, 3: erős. A két pontszám kombinálásával kaptuk meg a teljes pontszámot. Minden beteg esetében két core került kiértékelésre, és a pontszámok számtani átlagát használtuk fel a végső statisztikához [115, 134].

A PitNET daganatok vizsgálatához 46 FFPE mintát választottunk ki a hat elülső lebeny hormon és hematoxin és eozin (H&E) festés alapján. A kiválasztott daganatminták közül 4 esetben a daganatos szövet mellett egészséges hipofízis szövet is megtalálható volt, melyeket külön minta („core”) formájában kontrollként használtunk fel. A 2 mm-es régiókat („core”-okat) 7x10-es szöveti microarray (TMA) minta gyűjtőblokkba rendeztük. A betegek és mintáik klinikopatológiai adatait tartalmazó Excel fájlokat kapcsoltuk össze a fogadó blokkpozícióihoz egy számítógéppel vezérelt automatizált TMA-Master készülék segítségével (3DHistech Kft) [118]. A festések kvantifikációját 12 pontos rendszerrel végeztük, figyelembe véve a festett sejtek intenzitását és előfordulási gyakoriságát. A TMA Modul Software (3DHISTECH Kft) segítségével a gyenge festést 1-4, a mérsékelt festést 5-8 és az erős festést 9-12 pontokkal jellemeztük a pozitív sejtek arányának alapján. A pontozást két független értékelő végezte, és a statisztikai elemzéshez az átlagpontszámokat használtuk.

III.5.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok és kiértékelésük

A rutin klinikopatológiai immunfestések a diagnosztika folyamat részeként kerültek elvégzésre.

Minden egyéb immunfestést egyedileg optimalizáltunk és végül a **4. táblázatban** található primer és szekunder antitestek megadott koncentrációit alkalmaztuk. Négy μm vastagságú metszeteket, illetve szöveti microarray blokkokat használtunk, majd a deparaffinizálást, rehidratálást és az endogén peroxidáz-aktivitás blokkolását követően a metszeteket 0,1 mM nátrium-citrát pufferben (pH 6,0) történő mikrohullámú hőkezeléssel előkezeltük az antigén-feltárás céljából. A lemezeket a primer antitestekkel minden esetben egy éjszakán át inkubáltuk. Bizonyos esetekben LSAB+ Kit (#K5005, DAKO) segítségével sztreptavidin-biotin-peroxidáz komplex protokollt alkalmaztunk. Minden festésnél a primer antitest szöveti metszetekhez való kötődését 3,3'-diaminobenzidin (DAB, SK-4105, Vector Laboratories, Burlingame, CA, US) segítségével vizualizáltuk, és hematoxilinnel ellenfestettük.

A PitNET minták esetében a festett lemezeket P1000 szkennerral történő teljes digitalizációt követően a Panoramic Viewer szoftverrel (3DHISTECH Kft, Budapest, Magyarország) elemeztük, ahol a negatív, gyenge, közepes és erős pozitív sejtek százalékos arányát határoztuk meg a kiválasztott területeken (region of interest, ROI), csak a daganatsejteket értékelve és a strómaelemeket kizárva). A gyenge, közepes és erős festődési intenzitás tartományokat határoztunk meg [124]. A Survivin és Drosha festés kvantifikálásához a CaseViewer v2.1 szoftver NuclearQuant modulját (3DHISTECH Kft.) használtuk [117, 125]. A mintákat a festődés alapján a szoftver negatív vagy gyenge, illetve közepes vagy erős pozitívnak értékelte, valamint kiszámította az egyes festési intenzitású magok százalékos arányát. Közepes és erős festést alkalmaztunk az adenoma és a normál szövetek összehasonlítására.

Az FFPE xenograft tumormetszeteket hematoxilinnel és eozinnal festettük a mikroszkópos morfológia, nekrozis és invazív mintázat felmérésére. A tumor nekrozis százalékos arányát egész metszet vizsgálatokból számítottuk ki [132].

III.6. Nagy teljesítményű folyadékkromatográfia-tandem tömegspektrometriás (HPLC-MS/MS) mérések

III.6.1. 5-metilcitozin és 5-hidroximetilcitozin mérése HPLC-MS/MS technikával

Az 5-metilcitozin és 5-hidroximetilcitozin méréséhez saját módszert fejlesztettünk [124].

Vegyszerek és reagensek. Az LC-MS minőségű vizet, acetonitrilt és hangyasavat a VWR International Ltd.-től (Debrecen, Magyarország) vásároltuk. A Zymo Research Corporation által gyártott 5-Methylcytosine & 5-Hydroxymethylcytosine DNS Standard Set-et a Biocenter Kft-től (Szeged, Magyarország) szereztük be. A belső standardként a citozin-2,4-13C₂-15N₃-t (Sigma-Aldrich Kft., Budapest, Magyarország) alkalmaztuk.

Minta előkészítés. Az 1,0 µg DNS-t és 10 µL belső standard oldatot (1 µg/ml) tartalmazó DNS-oldatot 0,2 ml 98%-os hangyasavval kevertük, majd 140 °C-on 90 percig hidrolizáltuk. A mintát szobahőmérsékleten lehűtöttük és nitrogén alatt bepároltuk. A maradékot 0,2 mL acetonitril-vízben (90:10, v/v) oldottuk fel, és a felülúszót extraháltuk az LC-MS/MS analízishez.

LC-MS/MS módszer. Az LC-MS vizsgálatokat Perkin-Elmer Flexar FX10 ultrateljesítményű folyadékkromatográfia-vel végeztük, amelyhez egy Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométert kapcsoltunk. A kromatográfiás elválasztást Aquity UPLC BEH HILIC (130 Å, 1,7 µm, 2,1*100 mm) oszlopon (Waters Kft., Budapest, Magyarország) végeztük. A mobilfázis 2,5 mM ammónium-formiátot tartalmazó vízből (A) és 0,05% (v/v) hangyasavat tartalmazó acetonitrilből (B) állt. A részletes MS beállítást lásd: [124, 138].

III.6.2. Szteroid hormonok mérése HPLC-MS/MS technikával

A szteroidhormonok LC-MS/MS méréséhez a korábban közzétett protokollunkat [139] használtuk, kisebb módosításokkal, a sejtenyészési közegek használatához igazodva [140].

Vegyszerek és reagensek. a referenciaanyagokat (kortizol, kortizon) és a belső standardot (hitelesített referenciaanyag: 9,11,12,12,12-D₄-kortizol) metanolban oldottuk 1 mg/ml és 100 µg/ml koncentrációban (Sigma-Aldrich). Az LC-MS minőségű vizet, az LC-MS minőségű metanolt és az LC-MS minőségű hangyasavat a VWR International Kft-től szereztük be (Debrecen, Magyarország).

Minta előkészítés. Tíz µl belső standardot (2,76 µmol/l) adtunk 90 µl sejtenyészeti közeghez. A fehérje kicsapását 300 µl acetonitril hozzáadásával végeztük. Vortexelés után a mintákat 5 percig 13 500 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszót 1:1 arányban LC-MS minőségű vízzel hígítottuk, majd a minta készen állt az elemzésre.

LC-MS/MS módszer. Az LC-MS/MS vizsgálatokat egy Perkin-Elmer Flexar FX10 ultrateljesítményű folyadékkromatográfia-vel végeztük, amelyhez egy Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométert kapcsoltunk. A kromatográfiás elválasztáshoz Phenomenex Kinetex C18 állófázisú oszlopot (50 x 2,1 mm, 1,7 µm)

használtunk, Phenomenex Security Guard Ultra C18 védőoszloppal (2 x 4,6 mm) kiegészítve (Gen-Lab Kft., Budapest, Magyarország). A mobil fázis 0,1% (v/v) hangyasavat tartalmazó vízből (A) és 0,1% (v/v) hangyasavat tartalmazó metanolból (B) állt. A részletes MS beállítást lásd [135].

III.7. Bioinformatikai elemzések

III.7.1. A microarray adatok analízise

A gén és miRNS array adatok elemzéséhez, valamint az *in silico* vizsgálatoknál, ahol a nyers adatok rendelkezésre álltak, azokat a Genespring GX 12 és 14.9 szoftver (Agilent Technologies) segítségével elemeztük újra standard beállításokkal, elkerülve a különböző elemzési beállításokból és a különböző szoftverek használatából eredő torzításokat. Elsőként a nyers adatokat percentilis szerint szűrtük (alsó határérték: 20). A fold change szűrőt 2-szeresre állítottuk, majd a szignifikáns ($p < 0,05$) génexpressziós változások azonosítására párosítatlan t-próbát alkalmaztunk, többszörös tesztelési korrekcióval (Benjamini-Hochberg, multiple testing correction) a jobb hamis felfedezési arány (false discovery rate) elérése érdekében [115, 125, 127].

III.7.2. Szövetspecifikus miRNS target predikció

A miRNS-célpontokat a TargetScan 4.0, 5.0, vagy 6.2 (<http://www.targetscan.org>), a miRecords (<http://miRecords.umn.edu/miRecords>, 2009. március-2012. december), a TarBase (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/tarbase>, 2009. március-2012. december), microrna.org (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>, 2009. március-2012. december), MicroCosm v.5.0 (<http://www.ebi.ac.uk/enrightsrv/microcosm/htdocs/targets/v5/>) and miRWalk (<http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html>, 2009. március-2012. december) és az Ingenuity Knowledge Base (IPAKB, 2012. szeptember – 2013. szeptember) segítségével azonosítottuk. Szövetspecifikus target predikciót végeztünk egy többlépcsős szűrési eljárás segítségével [34, 115, 119]. Első lépésben kizártuk azokat a géneket, amelyek a szűrési kritériumoknál kisebb mértékben fejeződtek ki a vizsgált szövetben. Az integratív elemzéseknél az analízisbe a legalább két tanulmányban deregulált miRNS-eket és mRNS-eket vettük be ($p < 0,05$ és fold change: 2). Végül a miRNS-mRNS párokat az inverz expressziós változások jelenléte alapján választottuk ki. Amennyiben rendelkezésre állt, az Ingenuity Pathway Analysis microRNA Target Filtert alkalmaztuk (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/features/microrna-target-filter/>) [115, 116, 125].

III.7.3. Génontológia, útvonal- és hálózatelemzés

A funkcionális elemzést a DAVID Bioinformatics Resources 6.7 és 6.8 [34, 125], Ingenuity Knowledge Base (IPAKB, 2012. szeptember – 2013. szeptember), a ToPPGene Suite (<https://toppgene.cchmc.org/enrichment.jsp>) és Panther Classification System (<http://www.pantherdb.org/>) segítségével végeztük [115, 116, 125].

A génontológia és útvonalanalíziseknél génkészlet dúsulási analízist (GSEA, gene set enrichment analysis) használtunk, ahol a vizsgált génkészleteket hasonlítottuk meglévő gén ontológia vagy útvonal

henriettbutz_199_24

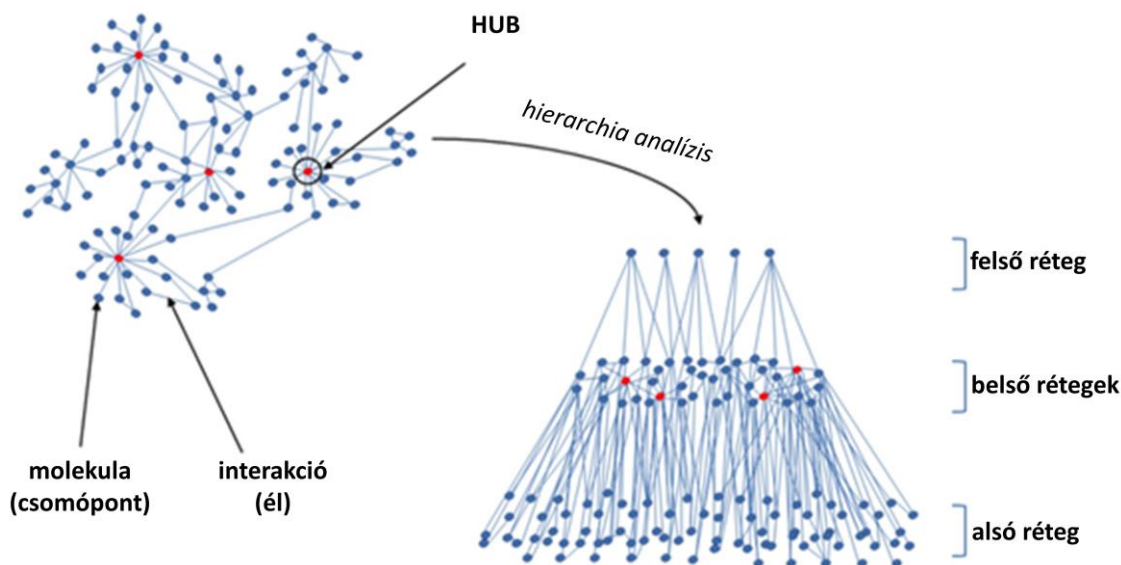
génkészletekhez Pearson Chi-négyzet teszt alkalmazásával. A gének és miRNS targetek (célgének) génontológia kategóriáit a Generic Gene Ontology (GO) Term Mapper segítségével határoztuk meg. A redundáns GO kategóriák eltávolítását a REVIGO algoritmus alkalmazásával végeztük [34, 116]. A sunitinib rezisztencia [132] kísérletekben a biofunkciók analíziséhez az IPA génkészlet-dúsulási analízist alkalmaztunk, és az eredményeket a gén/miRNS-expresszióból származó aktivációs/gátlási Z-pontszámokkal jellemeztük.

Az útvonalanalízishez az IPA (Ingenuity Pathway Analysis) szoftvert használtuk, mellyel vizsgáltuk a gén-, miRNS- és fehérjeexpressziós változások lehetséges biológiai jelentőségét (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA). Bonferroni korrekció után a p-értékeket 0,0025 alatt tekintettük szignifikánsnak [115, 132]. A patkány transzkriptom adatok útvonal elemzéséhez a Reactome pathway génkészleteit alkalmaztuk.

A hálózatanalízishez szintén az IPA szoftvert alkalmaztuk, melyhez több mRNS- vagy fehérje-vizsgálatban egyirányba deregulált géneket/fehérjét vontunk be ($p < 0,05$, abs. fold change > 2). Általánosságban a 2-3 vizsgálatban azonos eredmény jelenléte elegendő ahhoz, hogy a kombinált elemzésbe vehető legyen. A vesedaganatok integratív bioinformatikai elemzésénél a nagyobb pontosság érdekében azonban szigorúbb kritériumokat alkalmaztunk, és csak azokat az eredményeket fogadtuk el, melyet legalább 5 tanulmányban hasonlóak voltak [115]. Ezt követően a beválogatott génekből, fehérjékből 35-105 csomópontból álló hálózatokat építettünk, a hálózatok jellemzőit és hierarchiát „vertex sort” algoritmussal vizsgáltuk [115]. Az interakciós hálózat olyan elfogulatlan megközelítésen alapul, amely csak a molekuláris kölcsönhatásokra támaszkodik, szemben az útvonalelemzéssel, amely génkészlet-dúsulást vizsgál egy előre meghatározott génkészleten. A hálózati struktúra alapelemekből (pl. mRNS-ek vagy fehérjék; *csomópontok*) és az e csomópontok közötti fizikai kölcsönhatásokból vagy kapcsolatokból (*élek*) áll [141]. A kölcsönhatások a típusuk alapján irányítottak (például aktiválás, gátlás stb.). A különböző tagok közötti kapcsolatokat számítási algoritmusok és/vagy irodalomban dokumentált, kísérletileg validált kölcsönhatások (pl. fehérje-fehérje, fehérje-DNS, RNS-miRNS) jelzik előre. A HUB-okat a kölcsönhatások száma alapján a legmagasabb fokú csomópontokként határozzák meg. Az irányított kölcsönhatások alapján a hálózati hierarchia három (vagy több) csomóponti réteget tartalmaz (7. ábra). A "legfelső" réteg(ek)ben lévő géneket a hálózat "mester szabályozóinak" ("driver") vagy irányítóknak tekintjük, mivel más csomópontok nem hatnak rájuk, és az összes többi szabályozóiként működnek, és mint ilyeneknek, a downstream célpontjaikon keresztül az egész hálózatot befolyásolják.

A belső, "mag" ("core") réteg, mely állhat több szintből is akár, általában a hálózat alapszerkezetét meghatározó HUB-ok többségét tartalmazza. Ez a réteg központi szerepet játszik a jelterjedés és a moduláció szabályozásában (a jel erősíthető, csillapítható vagy pufferehető). A harmadik, "alsó" réteg(ek)ben található gének közvetlenül szabályozott effector vagy végrehajtó molekulák [142]. A felső réteg génjei potenciális gyógyszer-célpontok lehetnek, mivel a hálózat "igazgatói", és csak kevés további kapcsolattal rendelkeznek, ezért e molekulák célzott kezelése kevesebb mellékhatással járhat [143].

7. ábra. Hálózatok struktúrája, jellemzői és hierarchia analízis. (részleteket lásd a szövegben)



A miRNS-mRNS interakciós hálózathoz a korábban összeállított adataink [115] felhasználásával az 593 ccRCC és 389 normál vesemintán alapuló szövetspecifikus targetpredikciót végeztünk. A miRNS-ek ccRCC patogenezisben betöltött szerepének megállapítása érdekében a célgéneket az "RCC-hez kapcsolódó gének" kifejezésre szűrtük az Ingenuity Knowledge Database adatait használva (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>). Hálózatépítéshez alkalmaztuk a String adatbázisban található (<https://string-db.org/>) interakciókat is. A transzkriptomikai szabályozási összefüggéseket a TRRUST (<https://www.grnpedia.org/trrust/>) és a TFBlast (<http://www.generegulation.com/cgi-bin/pub/programs/tfbblast/tfbblast.cgi>) adatbázisból töltöttük le. A hálózatokat a Cytoscape 3.1.0. szoftver segítségével vizualizáltuk, a csomópontok színét és méretét a csomópontok grádusához, az élek színét és méretét pedig az élek közötti távolsághoz rendeltük.

III.7.4. Statisztikai analízis

A statisztikai elemzéshez a STATISTICA 7.0 (StatSoft, TIBCO Software) és a GraphPad Prism 6, és 6.02 programot (GraphPad Software Inc.) használtuk.

Az egyedi mérések analíziséhez két csoport közötti összehasonlítására t-próbát vagy Mann-Whitney/Wilcoxon rank sum tesztet alkalmaztunk a Shapiro-Wilks-teszttel megállapított normalitástól függően. A t-próbához Welch-korrekciót alkalmaztunk a csoportok közötti nem egyforma varianciák kiküszöbölésére.

Több csoport közötti összehasonlításához varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk kísérlettől függően különböző post-hoc tesztet (Fisher, Tukey, Conover-Iman test) tesztet. Nem-normál eloszlás esetében nonparametrikus Kruskal-Wallis ANOVA használtunk több csoport összehasonlításához. A hamis felfedezési arány (false discovery rate) csökkentésére többszörös tesztelési korrekciót (Benjamini-Hochberg multiple testing correction) alkalmaztunk.

A korrelációk vizsgálatához Pearson's vagy Spearman rank korreláció tesztet alkalmaztunk az adatok eloszlásától függően.

henriettbutz_199_24

A hierarchikus klaszterelemzést és hő térképet R programcsomag, Heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/>), vagy Genesis 1.8.1 (https://genome.tugraz.at/genesiscient/genesiscient_news.shtml) algoritmus segítségével készítettünk. A hasonlóságokat "átlag" klaszterezési, valamint euklideszi távolság vagy Kendall-Tau módszerrel vizsgáltuk. Dimenzióredukciós algoritmusként a t-distributed stochastic neighbor embedding (t-SNE) analízist alkalmaztuk az iDEP.91 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>) platformot használva.

A miRNS-ek, gén vagy fehérje expressziók elkülönítő képességének azonosítására ROC (receiver operating characteristic) analízist használtunk.

A miRNS-ek és a PPGL/pNET előfordulása közötti összefüggések értékelésére és a legjobb logisztikus modell megtalálására bináris logisztikus regressziós elemzéseket alkalmaztunk.

A diagnosztikai pontosságot („accuracy”) a következőképpen számoltuk ki: $\text{Pontosság} = (\text{TN} + \text{TP}) / (\text{TN} + \text{TP} + \text{FN} + \text{FP})$, ahol a TN: a valódi negatív; a TP: a valódi pozitív; az FN: a hamis negatív; az FP: a hamis pozitív eseteket jelöli.

Dichotóm változók közötti kapcsolat erősségének és a függetlenségének vizsgálatához 2x2 kontingenciátáblát és Fisher egzakt tesztet alkalmaztunk.

A túlélési adatokhoz az optimális cut-off értékeket a CutoffFinder "outcome euclidean" algoritmus módszerével azonosítottuk [144], a túlélési adatokat ezután a Kaplan-Meier-módszerrel és log-rank tesztel elemeztük. A hazard ráta (hazard ratio, HR) meghatározása Cox proporcionális hazard regressziós modellel történt.

Szignifikáns eltérésnek a $p < 0,05$ értékeket tekintettük.

IV. Eredmények és Megbeszélés

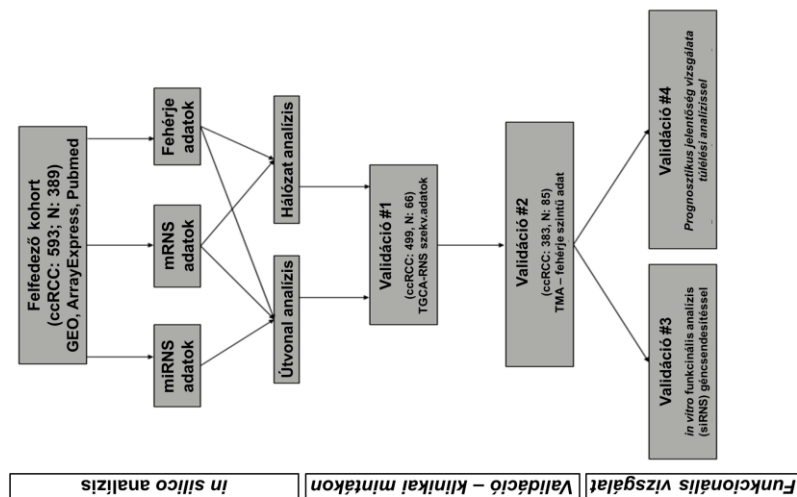
IV.1. Epigenetikai eltérésekhez kötődő mechanizmusok és jelátviteli zavarok

IV.1.1. A miRNS-ek és általuk befolyásolt mechanizmusok világossejtes veserák patogenezisében: aril-hidrokarbon receptor (AHR) jelátvitel, sejtproliferáció, migráció, invázió

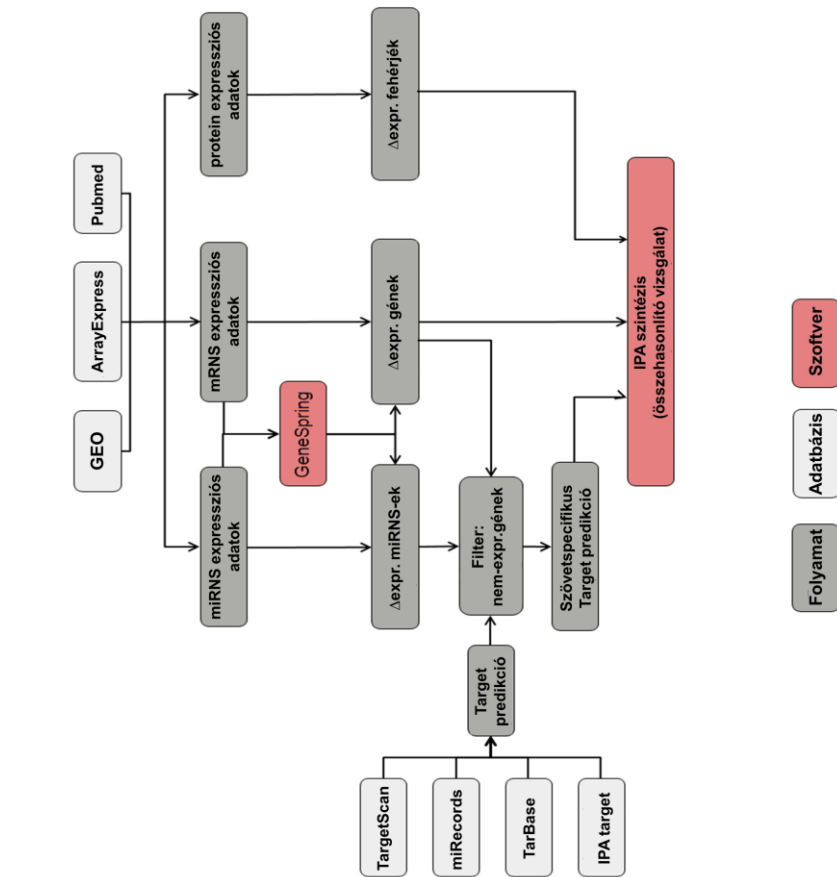
Annak érdekében, hogy jobban megértsük a miRNS-ek komplex funkcionális hatását a ccRCC patogenezisében, korábbi vizsgálatainkban felhasznált adatokat kiegészítve, összesen 593 ccRCC és 389 normál vesemintából származó miRNS- és génexpressziós és protein array adatokat összesítettünk, ezt kiegészítettük protein array adatokkal (**8. ábra**), majd egy olyan miRNS-target interakciós hálózatot építettünk, amely globálisan képes jellemezni a világossejtes veserák molekuláris hátterét.

8. Ábra. Integratív bioinformatikai megközelítés. (A) A vizsgálat kísérleti elrendezése, (B) Útvonal analízis folyamata, (C) Hálózat analízis folyamata.

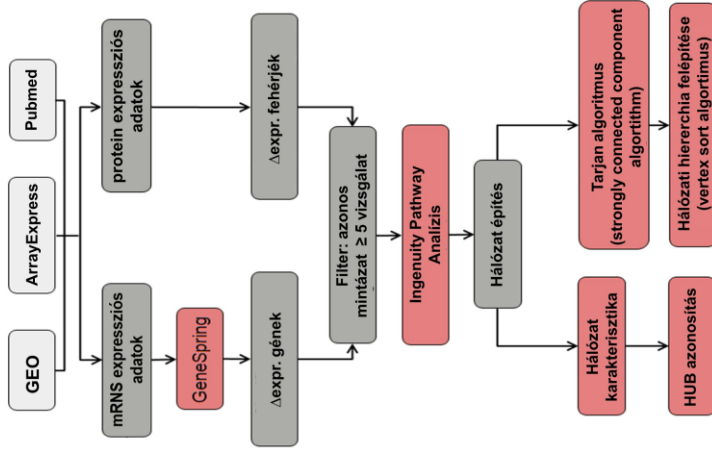
A. Vizsgálati elrendezés



B. Útvonal analízis folyamata



C. Hálózatanalízis folyamata

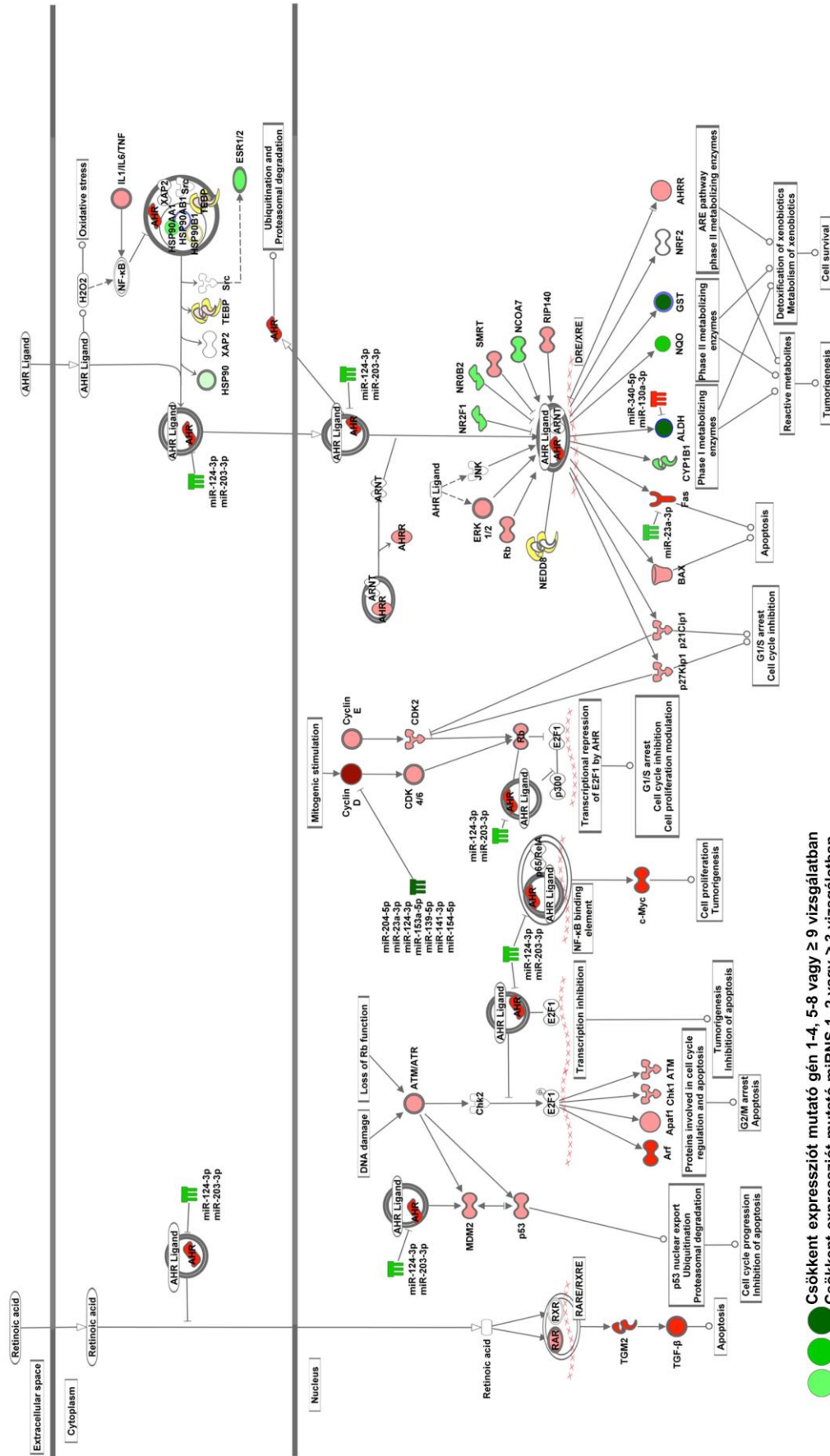


IV.1.1.1. Útvonalanalízissel azonosított, miRNS-ek által szabályozott útvonalak és jelentőségük klinikai mintákon – AHR jelátvitel.

A szövetspecifikus target predikció és útvonalelemzés eredményeként azonosítottuk az "Aryl-hydrocarbon receptor" (AHR) jelátvitelt (**9. ábra**), amely részt vesz a xenometabolizmusban, a sejtciklusban, a differenciálódásban és az apoptózisban, de korábban még nem hozták kapcsolatba a ccRCC patogenezisével, ezért további validálásra választottuk.

11 olyan miRNS-t azonosítottunk, amelyek az AHR jelátviteli útvonalat szabályozták, köztük a miR-203-3p és a miR-124-3p magát az AHR-t célozta (**2. ábra**).

9. Ábra. Az Aril-hidrokarbon receptor (AHR) jelátvitel világossejtes veserákban (ccRCC). Ennek az útvonalnak jelentős számú tagja eltérően fejeződik ki ccRCC-ben. A receptor (AHR) a ligandkötés után transzlokálódik a sejtmagba, ahol több gént transzaktivál vagy elnyom. Elsőként felismert szerepét a xenometabolizmusban írták le, melyet a ligandaktivációt követő fázis I és II metabolikus enzimek aktivációján keresztül fejt ki. Emellett fehérjeinterakciókon keresztül szabályozza a sejtciklust (pl. Checkpoint kinase 2 fehérje (Chk2) gátlása, p21 és p27 sejtciklus gátló fehérjék aktiválása) és az apoptózist (pl. a p53 vagy Bax, Fas fehérjéken keresztül). A színintenzitás megfelel a diszregulációt mutató vizsgálatok számának.

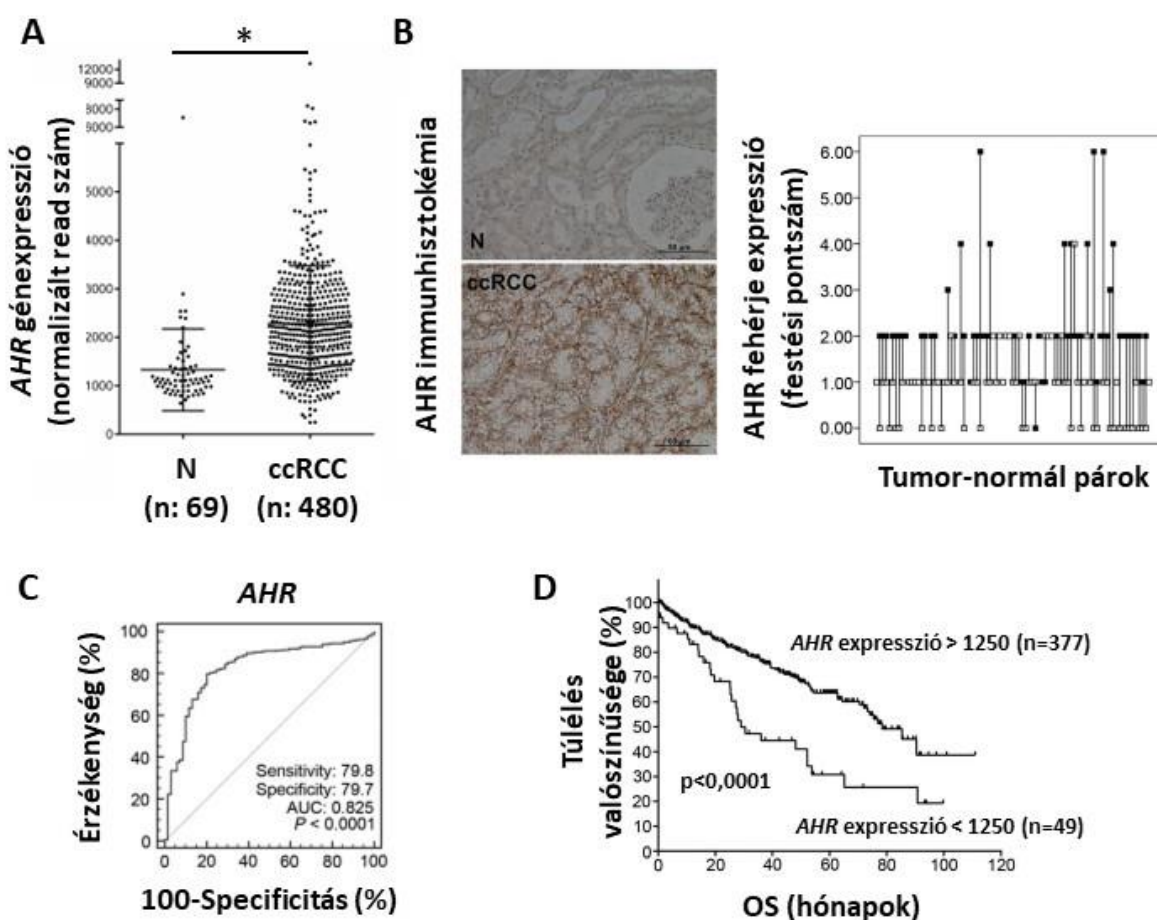


- Csökkent expressziót mutató gén 1-4, 5-8 vagy ≥ 9 vizsgálatban
- Csökkent expressziót mutató miRNS 1, 2 vagy ≥ 3 vizsgálatban
- Emelkedett expressziót mutató gén 1-4, 5-8 vagy ≥ 9 vizsgálatban
- Emelkedett expressziót mutató miRNS 1, 2 vagy ≥ 3 vizsgálatban
- Csökkent expressziót mutató fehérje 1, 2 vagy ≥ 3 vizsgálatban
- Emelkedett expressziót mutató fehérje 1, 2 vagy ≥ 3 vizsgálatban

henriettbutz_199_24

mRNS szinten az *AHR* expressziója szignifikánsan magasabb volt a ccRCC-ben a normál veséhez képest (10A ábra). Immunhisztokémiai módszerrel szöveti microarray mintasorozatunkon az *AHR* fehérje expressziója a daganatminták 75%-ában nagyobb mennyiségben expresszáldott a normál szövetekhez képest (10B ábra, 5. táblázat). Az *AHR* a normál és a daganatos szövetek elkülönítésben is szignifikánsnak bizonyult ROC (Receiver Operating Characteristics) analízisben (AUC 0,825, szenzitivitás: 80%, specificitás: 80%) (10C. ábra). Az *AHR* mRNS magasabb expressziója jobb teljes túléléssel járt együtt (10D. ábra). Az *AHR* fehérjeexpressziója a daganatos szövetekben negatívan korrelált a tumor grádusával ($p=0,047$) (6. táblázat).

Ábra 10. Az *AHR* gén és fehérje expressziója világossejtes veserákban (ccRCC) a normál (N) veseszövethez képest. (A-B) Az *AHR* fehérje nagyobb mennyiségben mutatható ki a daganatokban a normál szövethez képest. (B) A fehér pontok a normál, a feketék a daganatszöveteket ábrázolják. Az *AHR* fehérje diagnosztikus ereje (C) és prognosztikus jelentősége (D). Részletek a szövegben.



5. táblázat. *AHR* fehérje expressziója világossejtes veserák (ccRCC) és egészséges veseszövet párokban (ugyanazon betegeken).

<i>AHR</i> fehérje expresszió	Esetszám (%)	<i>P</i> -érték
Magasabb a daganatban vs. normal párjában	51 (75,0)	<0,001
Alacsonyabb a daganatban vs. normal párjában	6 (8,82)	
Egyforma festődés	11 (16,17)	

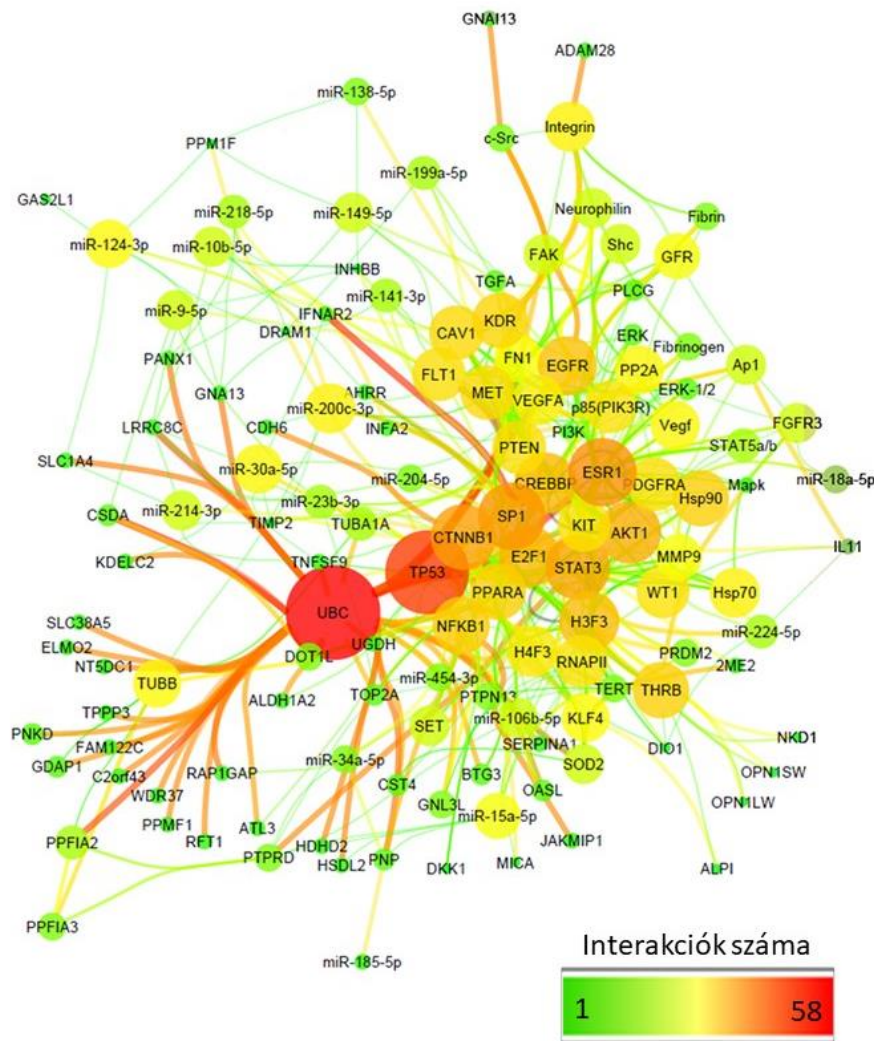
6. táblázat. AHR fehérje expresszió ccRCC daganatokban a tumor grádus (grade) szerint

Grádus	Esetszám	Átlag expresszió ± SE	AHR Medián AHR expresszió	p-érték
I	18	2,39 ± 0,304	2,00	0,047
II	70	1,74 ± 0,158	2,00	
III	28	1,25 ± 0,159	1,50	

IV.1.1.2. Hálózatanalízissel azonosított, miRNS-ek által szabályozott biológiai folyamatok és jelentőségük klinikai mintákon – sejtmigráció és invázió

A miRNS-ek hatását nemcsak a jelátviteli útvonalakra, de az interakciós hálózatokra nézve is elemeztük [116]. A szövetspecifikus target predikciót követően azonosítottunk 600 miRNS-mRNS párt, amelyek 49 miRNS és 266 gén interakcióját írták le. A géneket (“RCC associated genes”) funkció alapján szűkítve létrehoztunk egy 133 csomópontból álló hálózatot kapjunk, amely 20 miRNS-t és az általuk szabályozott veserák-asszociált gént tartalmazott (**11. ábra**). Legjelentősebb miRNS-ekként (a legnagyobb számú kölcsönhatást mutató miRNS-ek) a miR-200c-3p-t, a miR-124-3p-t és a miR-30a-5p-t azonosítottuk (**7. táblázat**).

11. ábra. Világossejtes veserák miRNS-target interakciós hálózata organikus elrendezésben. A csomópontok színe és mérete a kölcsönhatások számát (csomóponti fok), az élek színe és mérete a kölcsönhatások jelentőségét (él közötti érték) jelzi.

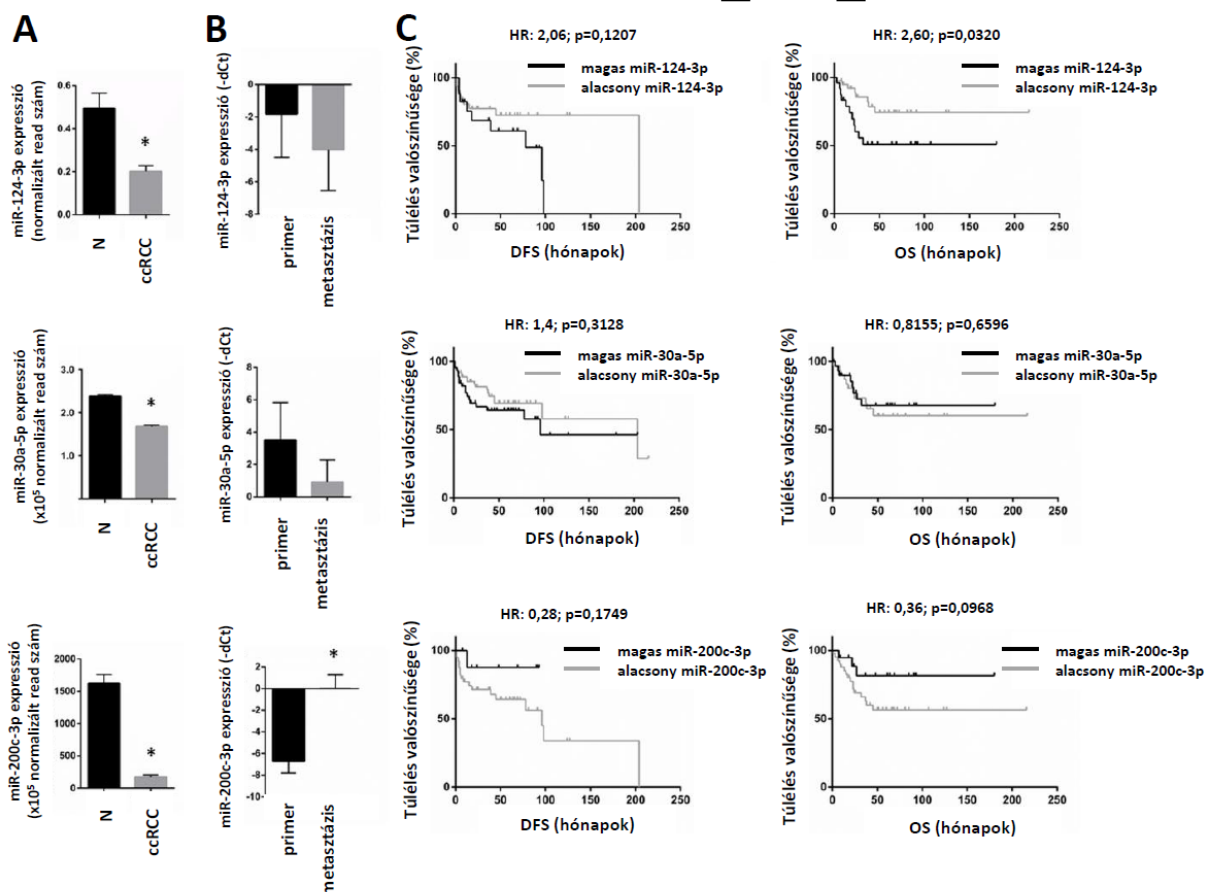


7. táblázat. ccRCC miRNS interakciós hálózat 3 központi miRNS-e és az azok által szabályozott gének

miRNS	miRNS célpontok száma	miRNS célpontok
miR-200c-3p	9	<i>CDH6, CREBBP, FLT1, FN1, KDR, PPM1F, TIPM2, TUBB, VEGFA</i>
miR-30a-5p	7	<i>IFNAR2, KDEL2, LRRC8C, MET, TIMP2, TNFSF9, TP53</i>
miR-124-3p	7	<i>AHRR, CAV1, DRAM1, GAS2L1, GNA13, PPM1F, SLC1A4</i>

Mindhárom miRNS az általunk vizsgált primer ccRCC daganatokban csökkent expressziót mutatott a normál szövethez képest, ami a miR-124-3p és a miR-30a-5p esetében további csökkenő tendenciát mutatott a metasztázisokban (**12A-B ábra**). Emellett a miR-124-3p magasabb expressziója szignifikánsan összefüggött a hosszabb teljes túléléssel (HR:2,6; p=0,032) (**12C ábra**). Eredményeinket a TCGA-adatbázisból származó független betegcsoport felhasználásával is validáltuk, és mindhárom miRNS esetében hasonló eredményeket kaptunk.

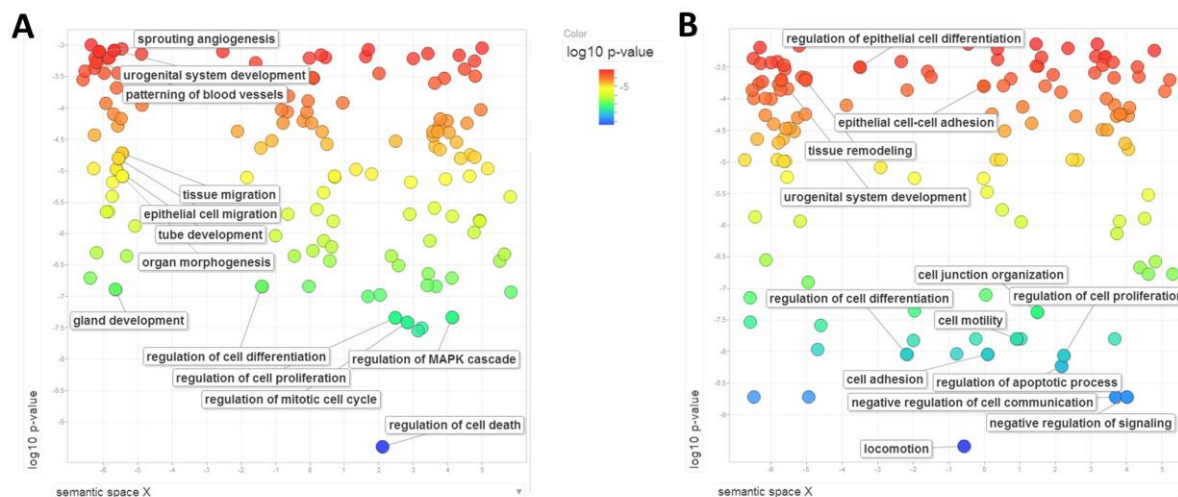
12. ábra. A miR-124-3p, miR-30a-5p és miR-200c-3p expressziója (A) N vs ccRCC és (B) ccRCC primer vs. metasztázis tumorokban. (C) A miR-124-3p, miR-30a-5p és miR-200c-3p összefüggése a betegségmentes (disease-free survival, DFS) és teljes túléléssel (overall survival, OS)



Mivel mindhárom kiválasztott miRNS csökkent expressziót mutatott a daganatokban, *in vitro* transzfekcióval vizsgáltuk tovább funkciójukat ccRCC sejtvonalakon. A három miRNS transzfekciót követően a globális transzkriptom vizsgálatával a leginkább megváltozott útvonalak a “Molecular mechanism of cancer”, “Integrin signaling”, “Cell cycle”, and “Regulation of the epithelial-mesenchymal transition pathway” voltak. A génontológia (GO) analízis a sejtmigrációt azonosította a három miRNS által leginkább befolyásolt biológiai folyamatnak (“locomotion” és migrációhoz kötődő funkcionális GO csoportok: “cell adhesion”, “cell motility”, “cell-cell junction organization”, “negative regulation of cell adhesion”). A három miRNS kiemelt szerepét a ccRCC patogenezisben tovább igazolta, hogy a miRNS transzfekció hatására bekövetkezett globális transzkriptom eltérések GO analízise jelentős átfedést mutatott a daganatszöveteken végzett GO elemzés eredményeivel (13. ábra).

A transzfekciót követő célzott miRNS vizsgálatával a miR-30a-5p leginkább az “Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway” és “TGF- β signaling” útvonal, valamint a “regulation of transcription” biológiai folyamat (BP GO kategória) szabályozásában vett részt. A miR-124-3p elsősorban a migrációhoz és invázióhoz köthető jelátvitteket (“Regulation of Cellular Mechanics by Calpain Protease”, „Integrin signaling”, „Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition Pathway”, „Actin Cytoskeleton Signaling”, „Epithelial Adherens Junction Signaling”, „Paxillin Signaling”, „Remodeling of Epithelial Adherens Junctions”) regulálta, emellett hatására, bár kisebb mértékben, a sejtciklushoz kötődő útvonalak megváltozása is detektálható volt. Ezek kísérletes validálásával, ezzel tökéletesen egybehangzó eredményeket kaptunk (lásd alább).

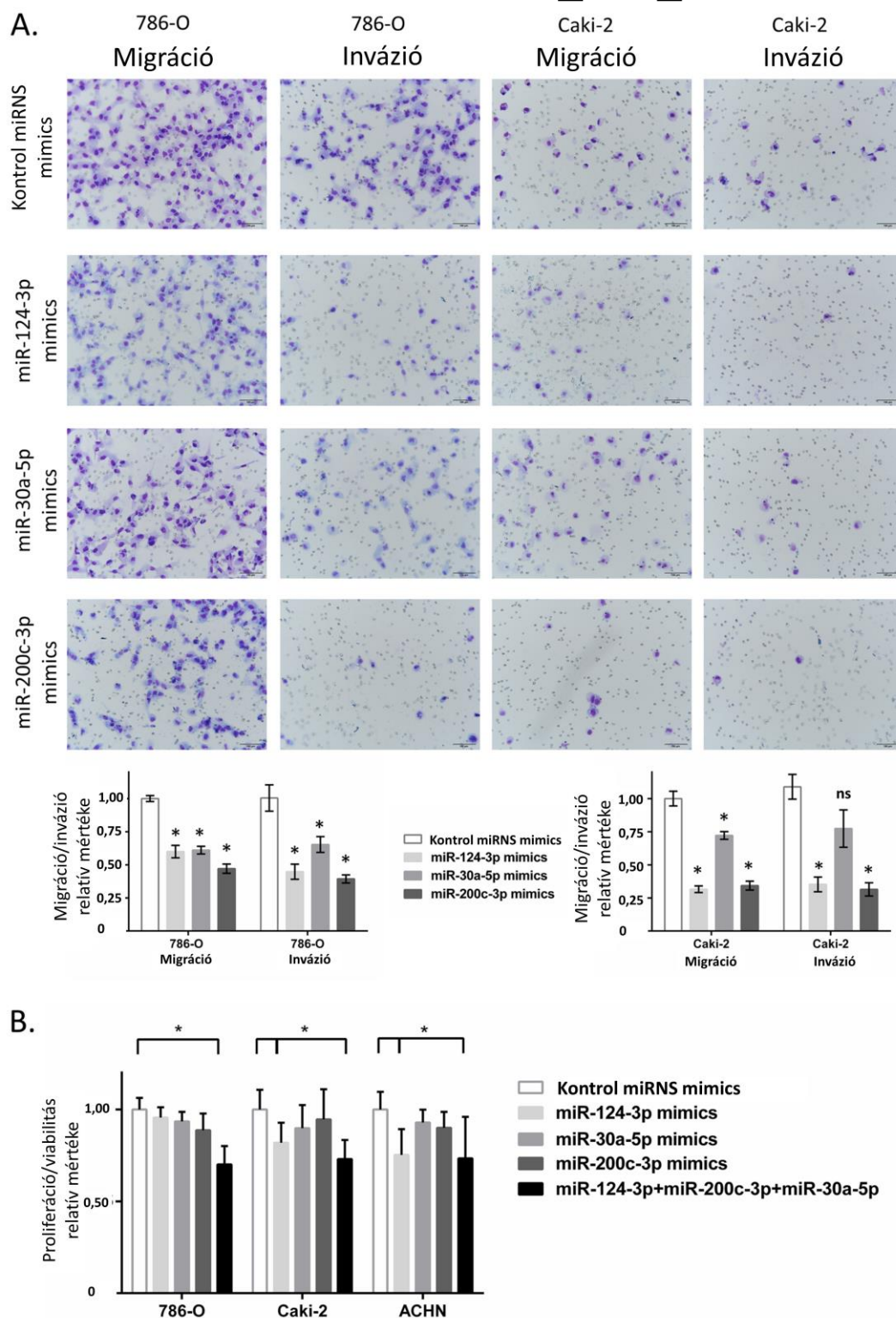
13. Ábra. (A) A ccRCC miRNS-célhálózat tagjainak funkcionális génontológiai klaszterezése (ccRCC vs N). (B) A miR-124, miR-30a-5p és miR-200c-3p hármia miRNS transzfekcióját követő megváltozott génexpressziójú célgének génontológiai elemzése transzkriptom-profilozással értékelve, 786-O és Caki-2 sejtekben. A körök GO kategóriákat jelölnek. A színek és az Y tengely $\log_{10}(\text{Benjamini-Hochberg FDR } q)$ értékeket jelölik. A két analízis erős hasonlósága alátámasztja a három miRNS központi szerepét a ccRCCmpatgoenezisben



Az azonosított biológiai funkciókat kísérletesen tovább validáltuk ccRCC sejtvonalak transzfekcióját követően a miRNS célgéneket vizsgáló PCR array mérésekkel. Így a miR-124-3p transzfekció hatására csökkent *TGFBI* és *ITGB1* génexpresszió ($p > 0,05$) keresztül, a gének oldaláról is szignifikáns változást mutattunk ki az extracelluláris mátrix (ECM) és a sejtadhéziós útvonalak működésében.

Bármelyik három miRNS szintjének helyreállítása jelentősen csökkentette a 786-O és a Caki-2 sejtek transzwell migrációját és invázióját, melyet sebgyógyulási teszttel is megerősítettünk. (14. ábra)

14. ábra. (A) miRNS (miRNS mimics) hatása a 786-O és Caki-2 veseráksejtek transzwell migrációjára és inváziós képességére. A miR-124-3p, -30a-5p és 200c-3p túlexpresszió szignifikánsan csökkentette a sejtek migrációját és invázióját ($p < 0,001$). (B) miRNS transzfekció hatása a sejtek proliferációjára és életképességére. A diagramok az $\text{átlag} \pm \text{SD}$ -t ábrázolják. *: $p < 0,05$). ns: nem szignifikáns

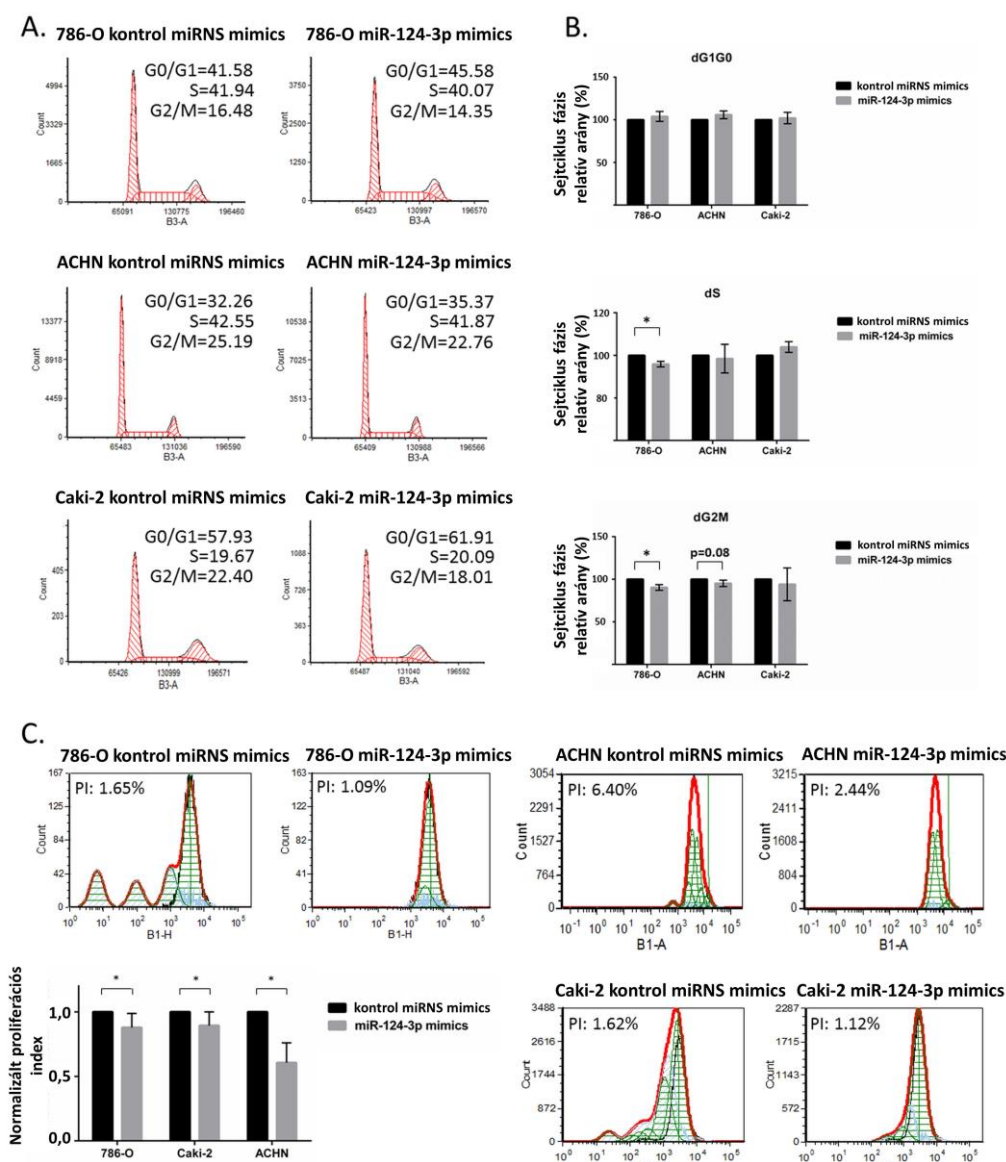


Mindhárom miRNS együttes transzfekciója 30 nM végkoncentrációban a sejtproliferáció/életképesség enyhe csökkenését eredményezte a 786-O, Caki-2 és ACHN sejtvonalakban. Egyenként transzfektálva (30 nM) csak a miR-124 vezetett a sejtproliferáció kismértékű, de szignifikáns csökkenéséhez a metasztatikus Caki-2 és ACHN sejtekben. A 786-O sejtekben is csökkent a sejtproliferáció, bár ez nem érte el a statisztikai szignifikanciát (14. ábra). A sejtciklus analízis miR-124-3p transzfekciót követően a 786-O és az ACHN sejtekben átlagosan 5% és 2%-kal csökkentette az S fázisban lévő sejtek számát,

henriettbutz_199_24

valamint 10%-os és 5%-os csökkenést eredményezett a G2/M fázisban (15A-B ábra). CFSE áramlási citometriás vizsgálat segítségével mindhárom sejtvonal kis mértékű, de szignifikáns csökkenést mutatott a proliferációs indexben és alacsonyabb generációs számot mutatott a miR-124-3p transzfekciót követően (15C. ábra).

15. ábra. A miR-124-3p transzfekció sejtciklusra és a proliferációra gyakorolt hatása. (A) Reprezentatív képek áramlási citométerrel mért sejtciklus fáziseloszlásáról transzfekciót követően. (B) Normalizált sejtciklus fázis változások: átlagos dG1G0, dS és dG2M eloszlás (n=3). (C) Reprezentatív normalizált CFSE-hígulás a sejtproliferációt követő sejtpopulációkban transzfekciót követően. Átlagolt proliferációs index, PI: propidium iodid (N = 3). CFSE: Carboxyfluorescein succinimidyl ester, vitális fluoreszcens sejtfesték. Az adatok átlag±SD-vel ábrázoltak. *:p<0.05

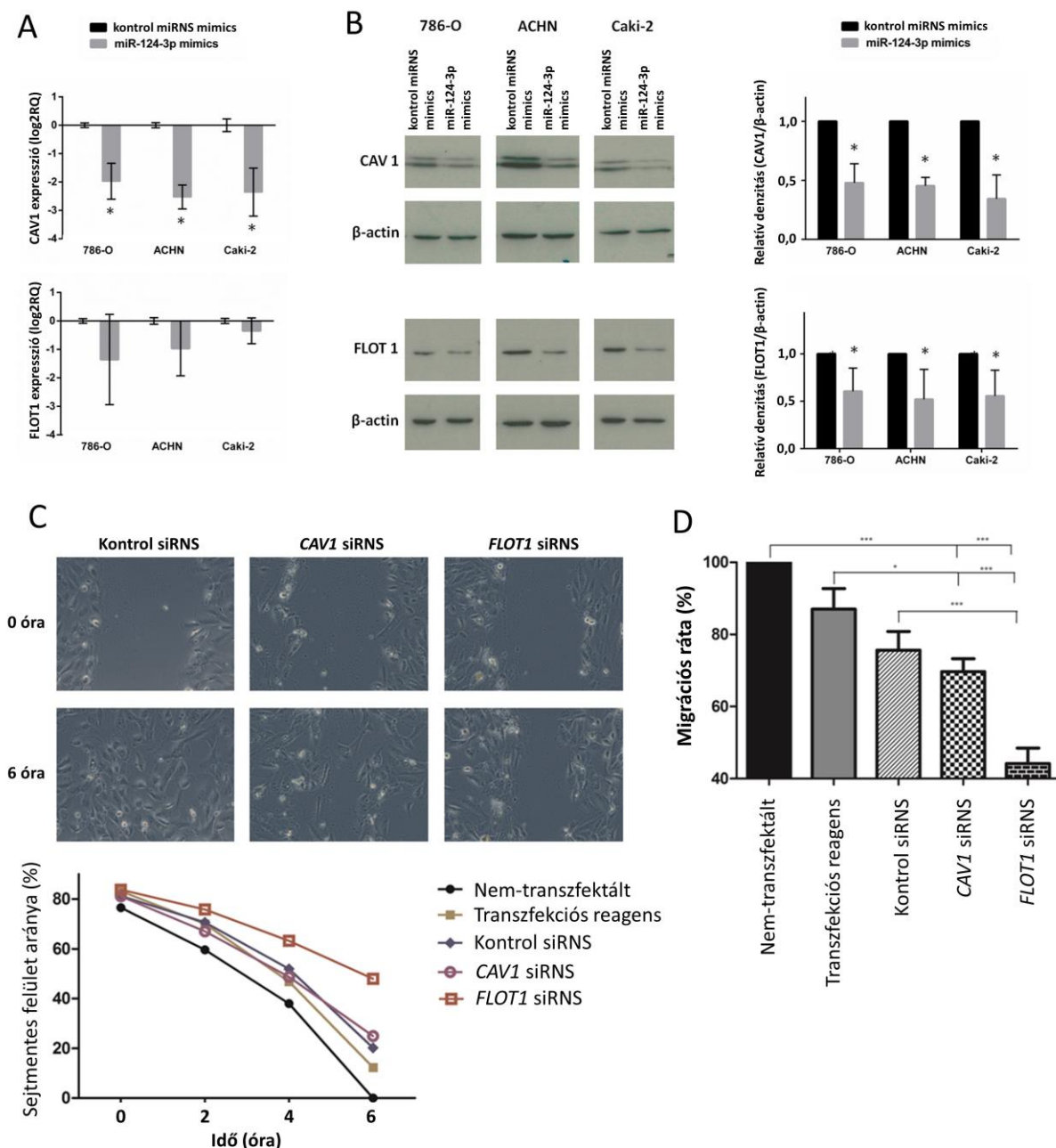


Mivel a miR-124-3p csak csekély hatást gyakorolt a sejtproliferációra, a következőkben a migrációs/invaziós folyamatokra gyakorolt hatására összpontosítottunk. Ennek megfelelően választottuk ki a sejtmigrációban-inváziójában szerepet játszó Caveolin 1-t (CAV1) és Flotillin 1-t (FLOT1) a miR-124-3p target validációhoz (16. ábra). A Caveolin 1 (CAV1) génexpressziója a miR-

henriettbutz_199_24

124-3p transzekciót követően 4,59 és 8,00 szerez csökkenést mutatott ($p < 0,001$ és $= 0,007$) (16. ábra), valamint részt vett az általunk azonosított migrációval kapcsolatos útvonalakban.

16. ábra. CAV1 és FLOT1 expresszió 24 órával a miR-124-3p transzekciót követően RNS (A) és fehérje (B) szinten. (C) CAV1 és FLOT1 fehérjék hatása a veserák sejtek migrációjára. Az siRNS-sel való géncsökkentés hatására a daganatsejtek migrációja lassul az idő függvényében. (D) Transzekciót követően 24 órával indított sebgyógyulási vizsgálatban 6 óra elteltével a CAV1 és FLOT1 géncsökkentett sejtek migrációs rátája alacsonyabb volt a kontrolokhöz képest.

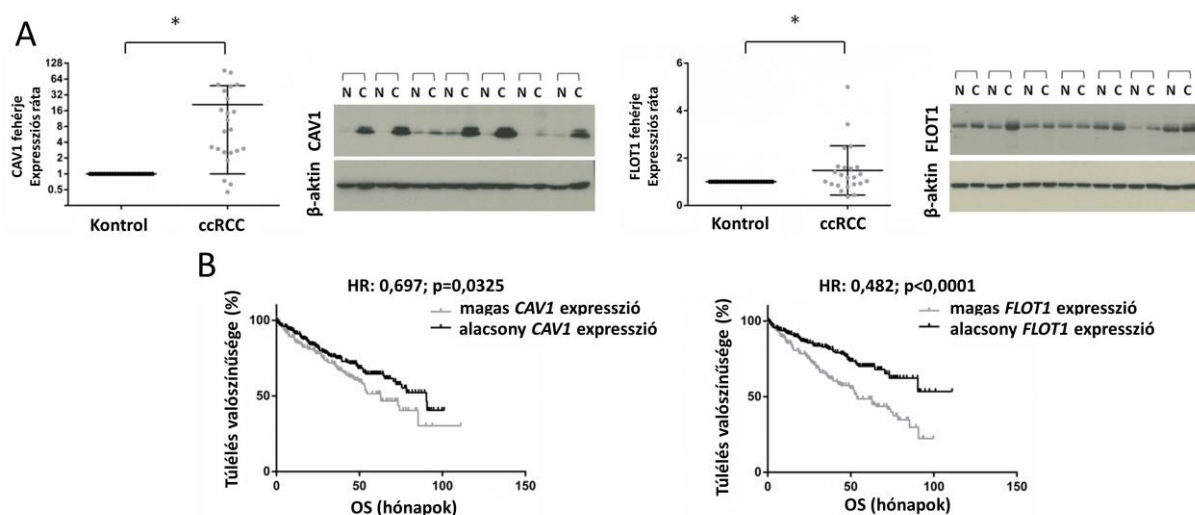


A miR-124-3p overexpresszió mind mRNS, mind fehérje szinten csökkentette mindkét fehérje mennyiségét a vizsgált három ccRCC sejtvonalban (16B ábra). Annak további vizsgálatára, hogy a miR-124-3p migrációra gyakorolt hatása közvetíthető-e a CAV1 és a FLOT1 révén, megvizsgáltuk e két molekula (siRNS-ekkel történő) csökkentésének hatását a sejt vándorlásra. A CAV1 és FLOT1 siRNS-sel való géncsökkentése szintén gátolta a ccRCC sejtek migrációját, ami arra utal, hogy a miR-124-3p

hatása többek között ennek a két fehérje mennyiségének a szabályozásán keresztül valósul meg (16C-D ábra).

Emellett elemeztük a *CAV1*, *FLOT1* expresszióját klinikai mintákon is. A fehérje expressziókat Western blot segítségével vizsgálva 23 pár normál-ccRCC mintán mind a *CAV1*, mind a *FLOT1* fehérje magasabb expressziót mutatott a ccRCC-ben ugyanazon beteg normál mintájához képest (17A ábra). Valamint, a miR-124-3p-vel összehasonlítva a *CAV1* és *FLOT1* ellentétes mintázatot mutatott a túléléssel való összefüggésükben: az alacsonyabb expresszió a ccRCC-betegek rosszabb teljes túlélésével társult (HR:0,697; $p=0,0325$ és HR:0,483; $p<0,001$) (17B ábra).

17. ábra. (A) *CAV1* és *FLOT1* fehérjeexpresszió 23 ccRCC és egészséges szövetpárban, reprezentatív western blot képekkel. A *CAV1* és a *FLOT1* fehérjék szignifikánsan nagyobb mennyiségben fejeződnek ki a ccRCC daganatokban az egészséges vese-szövethez képest ($p=0,01$ és $p=0,03$). (B) Kaplan-Meier analízissel a magasabb *CAV1* vagy *FLOT1* génexpresszió a ccRCC betegek rosszabb túlélésével jár. Az oszlopok az átlag $\pm$ SD-t ábrázolják. *: $p<0,05$.



Megbeszélés. Jelen munkában egyedülállóan átfogó integratív elemzést végeztünk, és 28 publikációból összeállított, nagy, nyilvánosan elérhető adathalmazok alapján géninterakciós hálózatot építettünk, amely 593 ccRCC és 389 normál veseminta 3 szintű (mRNS-, miRNS- és fehérje-expressziós profil) nagy áteresztőképességű vizsgálatok eredményén alapult. Validálásként saját mintakohorszokat alkalmaztunk.

Eredményeink összhangban vannak a korábbi adatokkal, amelyek szerint a metabolikus útvonalak kritikus szerepet játszanak a ccRCC patogenezisében [145], és kimutattuk, hogy az *AHR* jelátvitel megváltozik ezekben a daganatokban. Az *AHR*, amely többek között az ún. xenometabolizmusban vesz részt érzékelő receptorként, aktivációja közvetíti a környezeti kémiai és genotoxikus ingereket a sejt számára. Emellett szerepet játszik a celluláris homeosztázisban és befolyásolja az immunválaszt [146]. Fiziológiai funkciói mellett, az utóbbi években a daganatsejtek agresszív viselkedésében kulcs szabályozóként ismerték fel [146]. Vizsgálatunk alapján ccRCC szövetek a fokozott *AHR* kifejeződése, legalább részben, a csökkent expressziójú miR-124-3p-nek

köszönhető [147]. Az *AHR*-nek nemcsak diagnosztikai, de prognosztikai jelentőségét is bizonyítottuk több kohorszon. Szövettypustól függően az *AHR* közvetíthet tumorképződést elősegítő vagy gátló hatásokat is. Emlődaganatokban magas *AHR* expressziót írtak le [148], és az *AHR* fokozott expressziója a máj- és gyomortumork kialakulását eredményezte, míg a génkiütés csökkentette a daganatok növekedését és metasztázis képzését. Az *AHR* aktiváció pro-migrációs hatással bír a hámsejtekben, és fokozta a tumoros sejtek invázióját urotheliális daganatokban [149].

Az *AHR* mellett, a ccRCC molekuláris hálózatanalízise egyéb fontos molekulákra is felhívta a figyelmet, úgymint a *KIAA0101*, *CCND1*, *ETS1*, *CDKN2A*, amelyek a daganatok patogenezisben fontos szereppel bírnak. Ezek közül a *CCND1*-t és az *ETS1*-t, mint onkogéneket, már korábban is összefüggésbe hozták a veserák kialakulásával [150], amely hitelesíti az általunk létrehozott molekuláris hálózat biológiai jelentőségét.

Szintén hálózatanalízissel azonosítottuk a legfontosabb szereppel bíró tumorszuppresszor miRNS-eket a ccRCC patogenezisében. Ezek közül kiemelkedik a miR124-3p, amely alacsony expressziója összefügg a betegek rosszabb betegségmentes és teljes túlélésével. Emellett a miR-124-3p tendenciaszerűen alacsonyabb expressziót mutatott a metasztázisokban, mint a primer tumorokban. A miR-124-3p tumorszuppresszor szerepét funkcionális vizsgálataink eredményei is megerősítették, mivel jelentős hatást gyakorolt a tumorsejtek migrációjára és inváziójára. A miR-124-3p csökkent expresszióját korábban más daganatokban is közölték, és a sejtek migrációjában, inváziójában és proliferációjában részt vevő egyéb gének (*ROCK1*, *ETS1*, *KITENIN*, *FOXQ1*, *EZH2*, *RAC1* *STAT3*) szabályozójaként is említették [151–157]. Gliómában és hasnyálmirigyrákban a miR-124 csökkent expressziója és a betegek rosszabb túlélése közötti kapcsolatról is beszámoltak [156–158].

Elsőként írtuk le veserákban a Caveolin 1 (*CAV1*) és Flotillin 1 (*FLOT1*) géneket, mint a miR-124-3p célmolekuláit. Kimutattuk, hogy ezek a fehérjék nagyobb mennyiségben vannak jelen a daganatokban a normál szövetekhez képest, valamint, hogy a magasabb *CAV1* és *FLOT1* expresszióval rendelkező betegek rosszabb teljes túlélést mutatnak, amely fordított korrelációban állnak a miR-124-3p túlélésre gyakorolt hatásával. A Caveolin 1 fehérje a plazmamembrán caveolák egyik fő összetevője és irányítja a caveolák által közvetített endocitózist [159]. Akt-függő útvonalon keresztül indukálja a lamellipódiumok kialakulását [160], ezáltal részt vesz a migrációjában és a tumorsejtek inváziójában. Emellett membránadaptorként is funkcionál, amely összekapcsolja az integrin alfa alegységet a FYN tirozinkinázzal, és a Ras-ERK útvonalon keresztül elősegíti a sejtciklus progresszióját [161]. A Caveolin 1 gátolja a programozott sejthalál egy speciális formáját is, amelyet a letapadásfüggő sejtek leválása indukál [162]. Korábban leírták már ccRCC-ben is fokozott expresszióját, mely rossz prognózissal társul [163]. A Flotillin-1 (*FLOT1*), a Caveolin 1-hez hasonlóan az endocitózisban és a vezikuláris transzportban részt vevő fehérje, mely számos daganattípusban magasán expresszálódik [164]. A *FLOT1*-nek közvetlen szerepe van az EGFR (epidermális növekedési faktor tirozinkináz receptor) és a következményes MAP-kinázok aktivációjában [165], ami megmagyarázza onkogén szerepét a tumoros szövetekben. Összhangban az általunk találtakkal, kéziratunk elkészítésével párhuzamosan jelent meg egy közlemény, amely szintén igazolta a *FLOT1* szerepét a daganat progresszióban és a betegek rossz

túlélésével ccRCC-ben [166]. Természetesen, a bemutatott eredményeink mellett analízisünk egyéb fontos molekulákat és útvonalakat is feltárt a ccRCC patogenezisében és progressziójában, amelyek a jövőbeni vizsgálatot érdemelnek, jelen munkában azonban csak a ccRCC miRNome legerőteljesebb hatású miRNS(ek) funkcióira fókuszáltam.

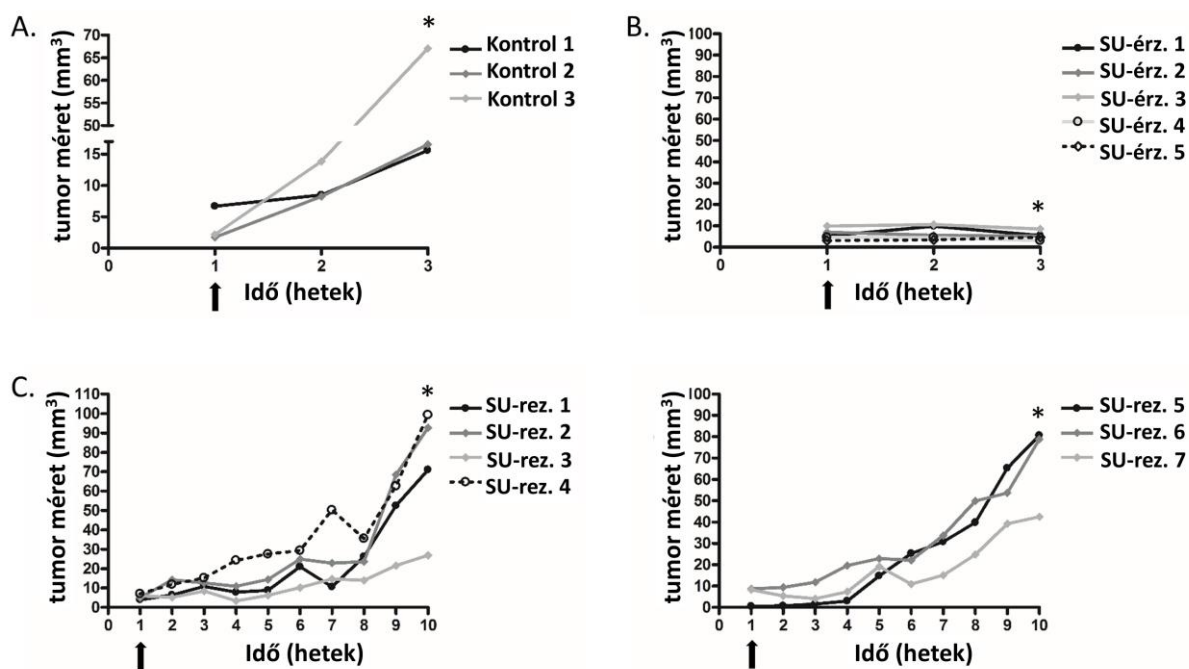
IV.1.2. A miRNS-ek szerepének vizsgálata az antiangiogén terápiával szemben kialakult rezisztenciamechanizmusokban: epithelialis-mezenchimális átmenet és tumorsejtek általi érbefogás (kooptálás)

IV.1.2.1. Szunitinibrezisztencia hátterében azonosított, miRNS-által szabályozott folyamatok.

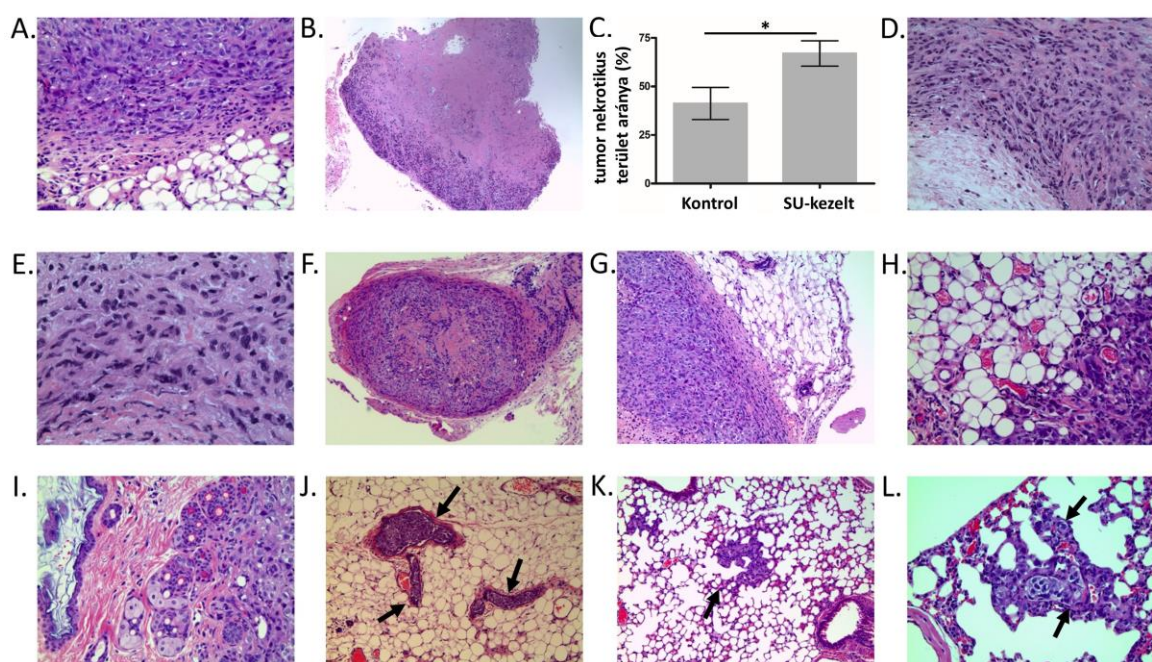
A betegekben kialakuló gyógyszerrezisztencia hátterében álló mechanizmusok feltárása céljából *in vitro* és *in vivo* rezisztenciamodelleket hoztunk létre. A kontrol, szenzitív és rezisztens daganatokat immunhisztokémiával és transzkriptomikával (miRNS & mRNS) karakterizáltuk, majd funkcionális vizsgálatokkal miRNS target validálást végeztünk, végül igazoltuk a miRNS-mRNS párok funkcióját.

Az *in vivo* xenograftok esetében a szunitinib-kezelés a tumor térfogatának csökkenését/stabilitását eredményezte körülbelül 4 hétig (18. ábra). A rezisztencia a négyhetes kezelés után kezdett kialakulni, és a tumorok 6-7 hét után gyors növekedésnek indultak (18. ábra). Mikroszkópos vizsgálat során a tumorok xenograftjai a klasszikus RCC morfológiát mutatták (19A. ábra).

18. ábra. Szunitinib kezelés hatása a xenograft tumor méretre a kontroll (vivőanyag) (A), érzékeny (B) és rezisztens (C-D) xenograft csoportokban. A nyilak a kezelés kezdőpontját mutatják. Az egereket a csillagok (*) által jelzett időpontokban áldoztuk fel.



19. ábra. Xenograft tumorszövet szövettani vizsgálata (H&E festés). (A) A kezelés előtti daganatok klasszikus RCC morfológiát mutattak lekerekített sejtekkel és világos citoplazmával. (B) A szunitinibbel szemben érzékeny tumorokban jelentős nekrozist figyeltek meg. (C) A szunitinibbel kezelt és a kontroll xenograftok nekrotikus területeinek összehasonlítása. (D) Rezisztens tumorokban orsósejtekkel rendelkező szarkomatoid fenotípus volt megfigyelhető. (E) Gyengén differenciált sejtek a rezisztens tumorokban. (F) Szunitinib érzékeny daganatok jól körülhatárolt szegéllyel, fibrózissal és krónikus gyulladásos infiltrációval a tumortokban. (G) Szunitinib-érzékeny daganatokban fibrózissal és gyulladással járó határok expanzív növekedési jellege. (H) A szunitinib-rezisztens tumorokban szabálytalan infiltratív tumormargók a környező zsírszövet inváziójával. (I) A rezisztens daganatok bőr inváziója. (J) A rezisztens daganatok kiterjedt vaszkuláris inváziót mutattak (nyilakkal jelzett erek). (K, L) Tüdőmetasztázis rezisztens daganatokban (nyíl). A metasztázisokban a tumorsejtek a befogadó szövet ereihez vándorolnak, „érbefogás” figyelhető meg. A daganatok az alveolák falának véredényei mentén haladnak, miközben megőrzik az alveoláris tereket.



A szunitinib-kezelt tumorokban szignifikánsan nagyobb volt a nekrotikus területek aránya a kezeletlen kontrollokhoz képest (2B-C ábra, 8. táblázat). A szunitinib érzékeny tumorok jól körülírt határt mutattak, rostos kapszulával és gyulladásos infiltrátummal (2F-G ábra). A rezisztens tumorokra viszont infiltratív, irreguláris határok voltak jellemzők, a környező szövetekbe való terjedéssel (2H-I ábra). Ezekben nekrotikus területek szintén megfigyelhetők voltak (összhangban a korábbi kezelési hatással), azonban fokális szarkomatoid fenotípus volt kimutatható orsósejtekkel (2D ábra) és rosszul differenciált sejtekkel (2E ábra) a kontrollokhoz és az érzékeny tumorokhoz képest. A szarkomatoid differenciálódás és a helyi invázió mellett a rezisztens tumorok agresszívabb viselkedést mutattak, amit a kiterjedt érinvázió (2J ábra), valamint a máj- és tüdőmetasztázisok (2K ábra) jelenléte mutatott. A szunitinib-érzékeny tumorokban metasztázisok nem voltak kimutathatók. A szunitinib-rezisztens tumorokban a szövettani vizsgálatokkal speciális érinvázó, a tumorsejtek általi érbefogás („vascular co-option”) volt megfigyelhető. Ezt a tumorsejtek vándorlása jellemezte a tüdő alveoláris falának véredényei mentén, az alveoláris terek pusztulása nélkül (2K-2L ábra). Ez a jelenség a tumorsejtek adaptációja, mely az antiangiogén kezelés hatásának elkerülésére irányul azáltal, hogy a tumorsejtek a befogadó („host”) szövet normál architektúráját felhasználva

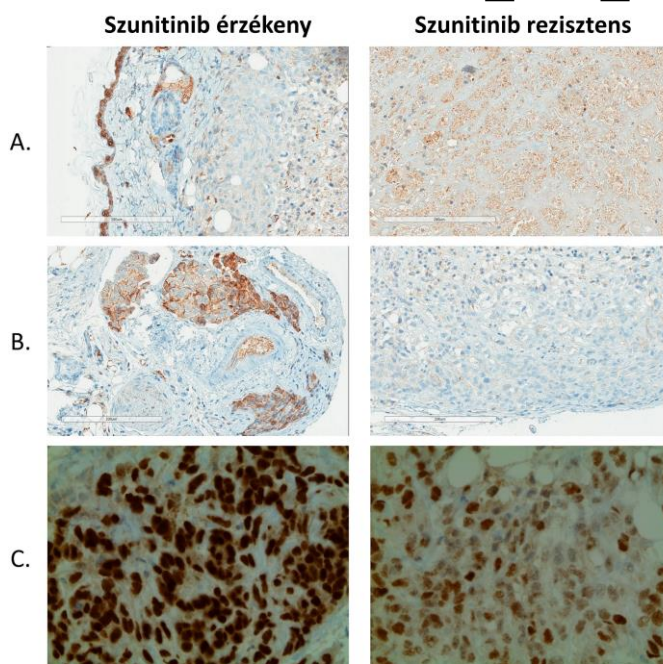
vándorolnak azért, hogy a gazdaszervezet normál érrendszerét (kapillárisait) oxigén és tápanyagellátás céljából felhasználják.

8. táblázat. A szunitinib hatása a xenograft ccRCC daganatokra

	786O xenograft Kontrol	786O xenograft szunitinib érzékeny	786O xenograft szunitinib rezisztens
Nekrotikus terület	++	++++	+++
Szarkomatoid fenotípus/gyenge differenciáció	–	–	+
Tumor határ	Ép/szabályos	Szabályos/infiltratív	Infiltratív/irreguláris
Lokális invázió	–	–	+
Vaszkuláris invázió	–	–	++++
Távoli metasztázis	–	–	++
Érbefogás (vascular co-option)	–	–	++

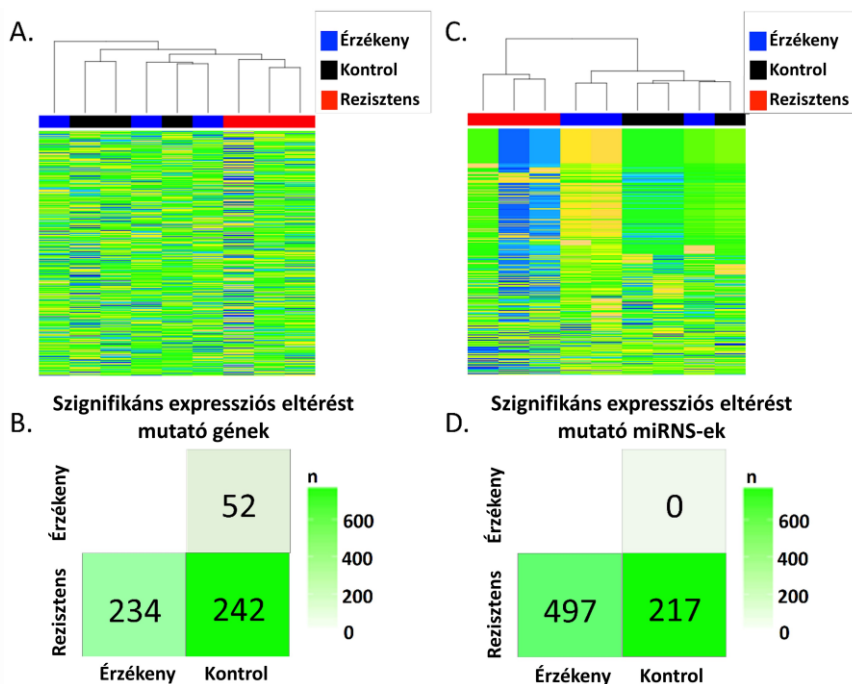
A tirozin-kinázgátló rezisztenciával kapcsolatos korábbi irodalmi adatok alapján számos immunfestést végeztünk a szenzitív és rezisztens xenograft tumorokon. Enyhe COX2 expresszió növekedést találtunk a rezisztens tumorokban (**20A ábra**), ami összhangban van a korábbi adatokkal, amelyek szerint a COX2 gátlása képes volt potenciólni a szunitinib hatását RCC xenotranszplantátumokban [167]. Az E-kadherin expressziója is jelentősen csökkent a rezisztens tumorokban a szunitinib-érzékeny tumorokhoz képest, ami az EMT fenotípus kialakulására utal (**20B ábra**). A PAX8 egy sejtvonalkorlátozott transzkripciós faktor, amely elengedhetetlen az embrionális vese fejlődéséhez [168] és a vese differenciálódásának markereként használják. A PAX8 expressziója csökkent a rezisztens tumorokban (**20C ábra**), ami ugyanezt a tendenciát jelzi a dedifferenciálódás és az epheliális-mezenchimális fenotípus (EMT) kialakulása felé.

20. ábra. A szunitinib érzékeny és rezisztens daganatok immunfestése. (A) A COX-2 nagyobb mennyiségben detektálható a rezisztens daganatokban, mint az érzékenyekben. Az E-cadherin (B) és a PAX8 (C) csökkent festődést mutatott a rezisztens tumorokban.



A szunitinib válasz (érzékenység) és rezisztencia molekuláris hátterének vizsgálatához összehasonlítottuk a kontroll, érzékeny és rezisztens tumorok miRNS és mRNS profiljait. A globális transzkriptom változások alapján a rezisztens tumorok jelentősen elkülönültek a szunitinib-érzékeny és kontroll csoportoktól (**21A, C ábra**). Míg érdekes módon csak minimális molekuláris különbség volt a kontrollok és a szunitinib érzékeny tumorok között (**2B, D ábra**).

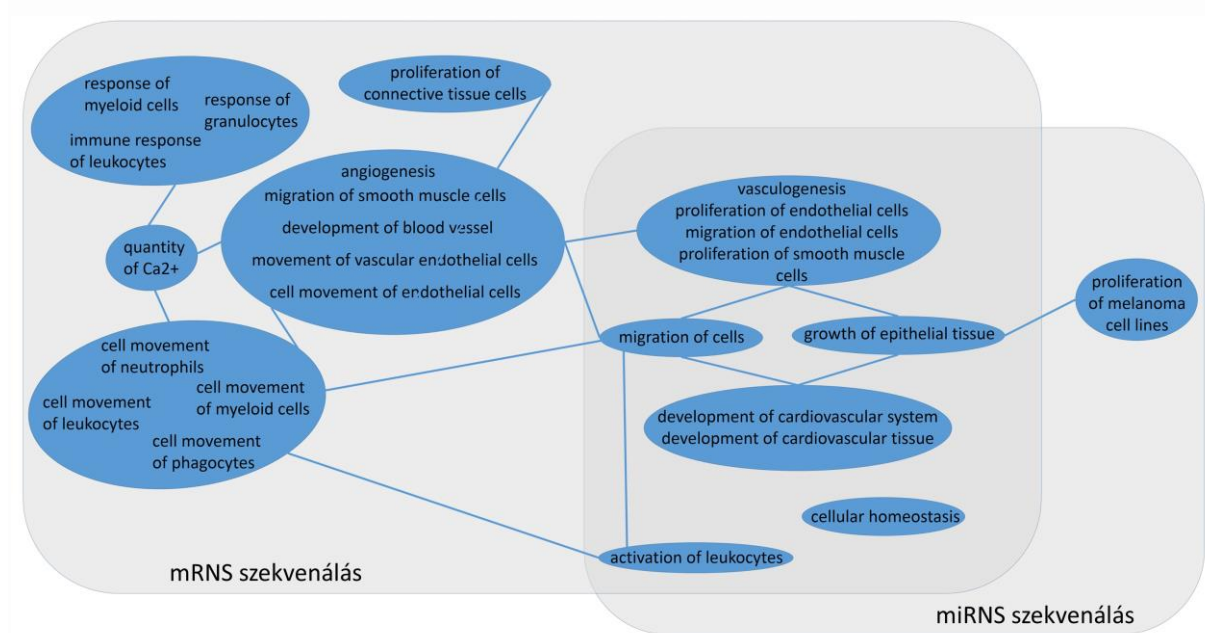
21. ábra. A kontroll, szunitinib érzékeny és rezisztens xenograft tumorok mRNS (A) és miRNS (C) expressziós profilja hierarchikus klaszterezést követően Az eltérően kifejeződő gének (B) és miRNS-ek (D) száma.



A hatásmechanizmusnak megfelelően a szunitinib hatás az endothél sejtek proliferációjának, az angiogenezis, epithel sejtnövekedés és sejtmigráció biológiai folyamatok gátlásában nyilvánult meg a

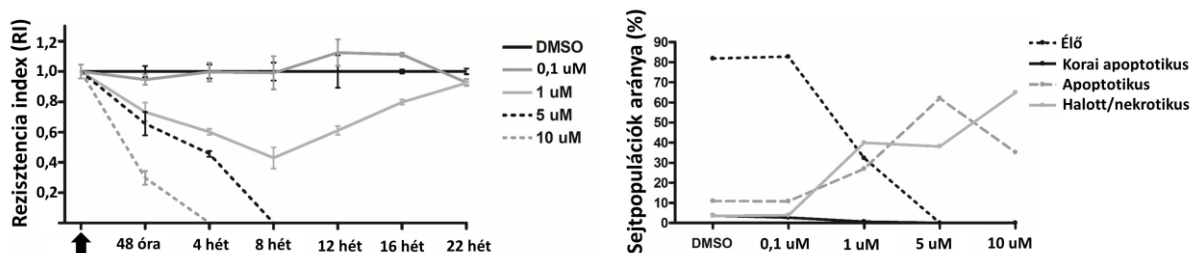
szunitinib érzékeny tumorgraftokban. A génexpressziós adatok mind útvonal, mind a génontológia analízise a drogrezisztens daganatokban a sejtmigrációval, az epiteliális-mezencimális átmenet (EMT) útvonal szabályozásával és az emberi embrionális őssejtek pluripotenciájával kapcsolatos gének jelentősen megváltoztak a szunitinib érzékeny daganatokhoz képest. Ezenkívül az immunválasszal és gyulladásal kapcsolatos útvonalak eltéréseit is megfigyeltük a két csoport között. A miRNS-expressziós különbségek útvonalelemzése feltűnően hasonló eredményt mutatott. A növekedési faktor receptorokkal kapcsolatos molekuláris funkciók a miRNS-ek által szabályozott megváltozott molekuláris funkciók jelentős részét képviselték a szunitinib rezisztens tumorokban. Összehasonlítva a biofunkciók elemzésének változásait az mRNS és a miRNS szekvenálás között, és erős hasonlóságot találtunk a transzkripció szabályozásának két szintje között (22. ábra), jelezve a miRNS-ek fontos szerepét a szunitinib rezisztenciában.

22. ábra. Transzkriptomikai (mRNS és miRNS) eltérések funkcionális elemzése a szunitinib rezisztens xenograftokban az érzékeny tumorokhoz képest



A miRNS-ek dinamikusabb funkcionális vizsgálatához *in vitro* szunitinib rezisztenciamodellt hoztunk létre különböző gyógyszer koncentrációk hosszútávú alkalmazásával. Az 1 μ M-os koncentrációnál a sejtek kezdeti választ mutattak, majd 8 hetes szunitinib kezelés után rezisztencia alakult ki. 16 hét elteltével a sejtek elérték az eredeti növekedési ütemet (23. ábra).

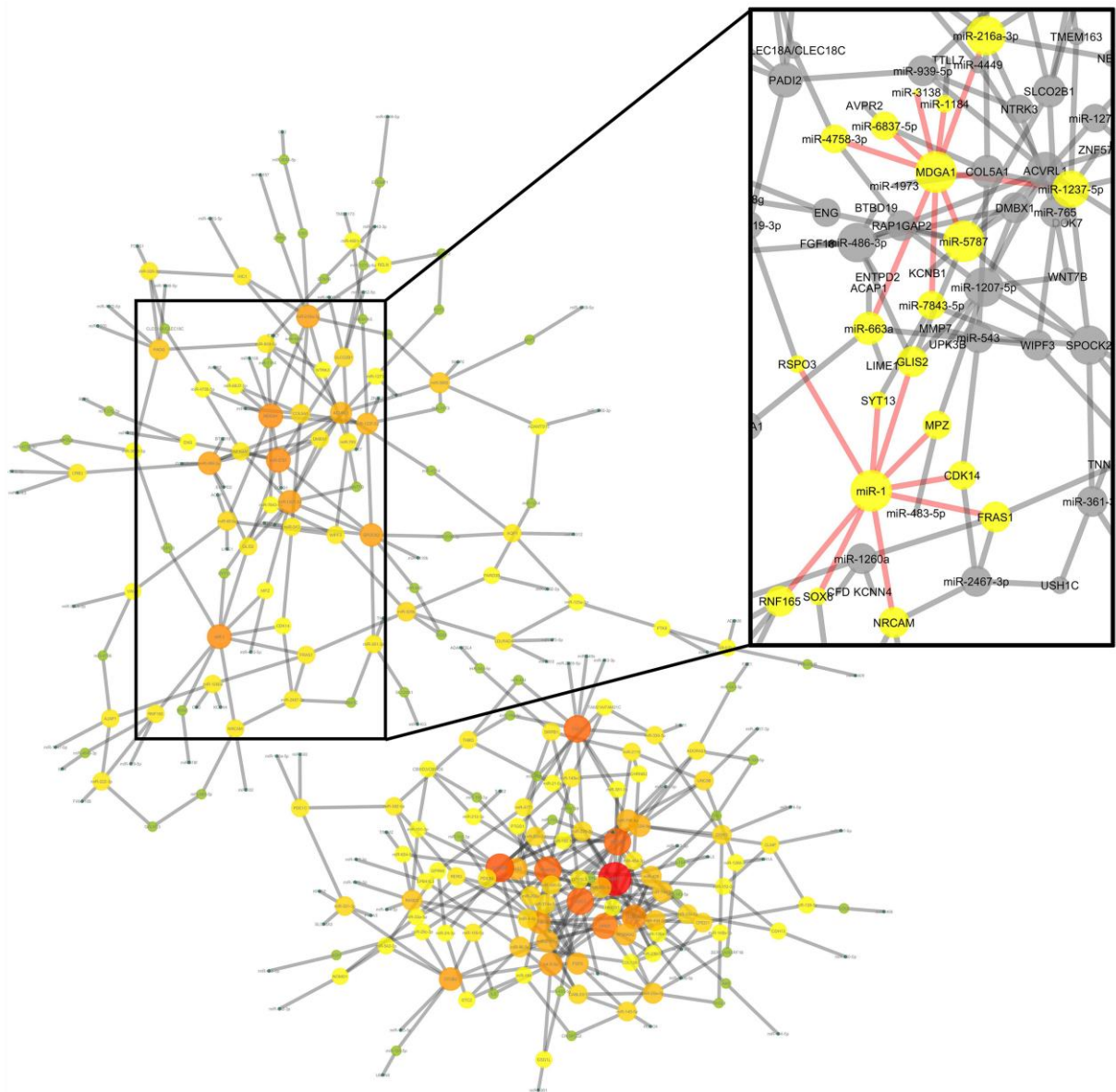
23. ábra. *In vitro* sunitinib rezisztencia modell karakterizálása. Bal oldalt: különböző szunitinib koncentrációk hatása a daganatsejtek növekedésére. A nyíl a kezelés kezdetét jelöli. Jobb oldalt: különböző szunitinib koncentrációk toxikus hatása áramlási citometriás mérések (annexin V és propidium jodid együttes festés) alapján



Összehasonlítottuk az érzékeny és rezisztens sejtvonalak miRNS expressziós profilját az *in vivo* tapasztalt miRNS változásokkal, így összesen 36 közös miRNS-t azonosítottunk.

Az *in vivo* és az *in vitro* rezisztencia modellek miRNS mintázatának elemzése szinte azonos útvonalakat és sejtfolyamatokat azonosított be [132]. A miRNS kölcsönhatások rezisztenciában betöltött szerepéhez integráltuk a gén- és miRNS-expressziós adatokat egy interakciós hálózatba (**24. ábra**). A hálózati struktúra és a szakirodalmi adatok alapján a rezisztenciában csökkent expressziójú miR-663a-t (rezisztenciában alulszabályozott) és a fokozott expressziójú MDGA1-et, valamint a FRAS1-miR-1 párt emeltük ki további funkcionális vizsgálatokhoz. Mind a négy molekula részt vesz a sejtmotilitásban és migrációban, ami összhangban van *in vivo* és *in vitro* eredményeinkkel és az érbefogás (vascular cooption) mechanizmussal.

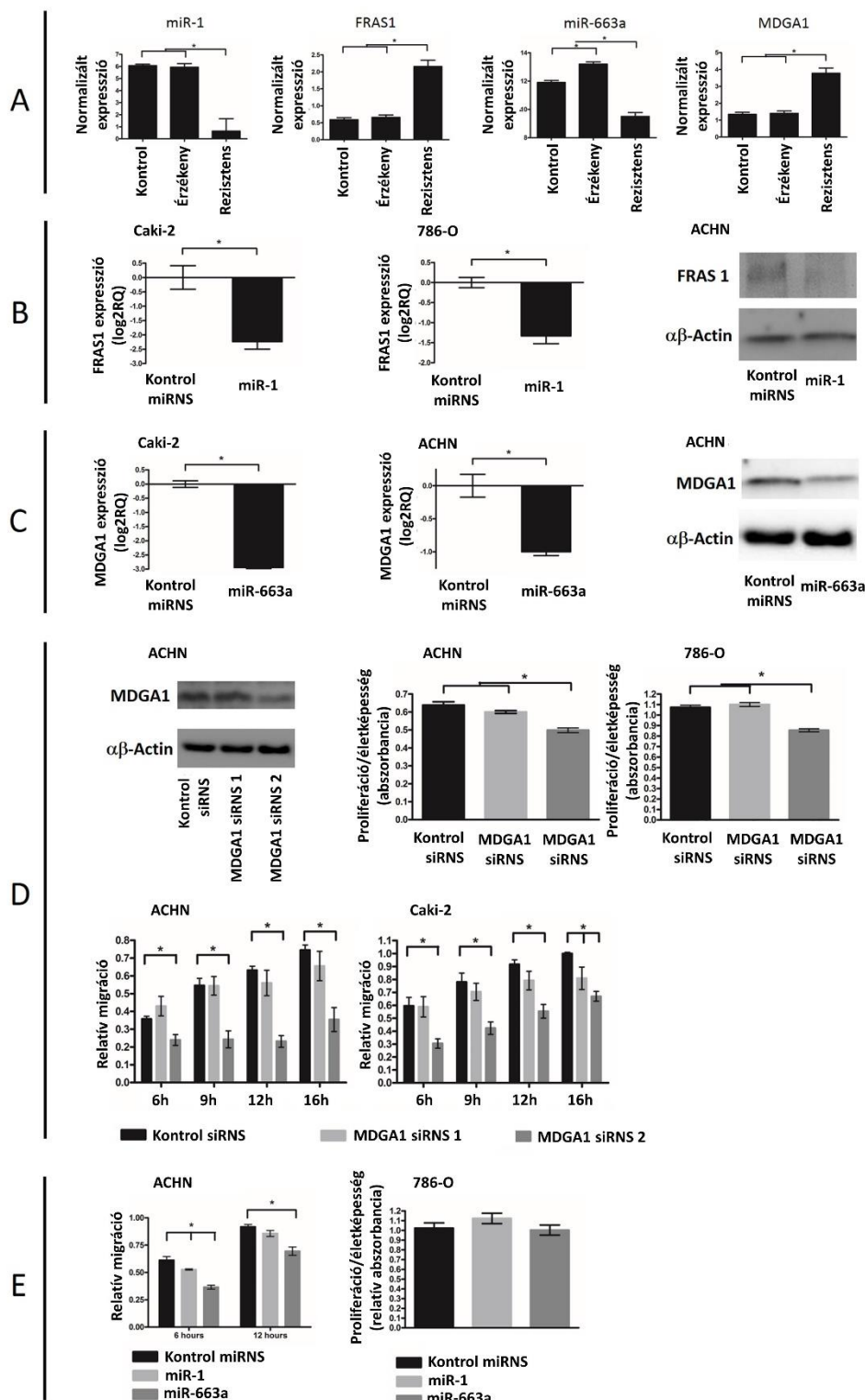
24. ábra. A szunitinib érzékeny és rezisztens daganatok közti eltérő transzkriptomikai (miRNS és mRNS) eltéréseit leíró miRNS-target interakciós hálózat. Minden csomópont (kör) egy gént/miRNS-t képvisel, az összekapcsolt vonalak a molekulák közötti kölcsönhatásokat. A kiemelt rész a miR-1 és az MDGA1 központi szerepét mutatja be (jobb oldalt a téglalapban kiemelve).



A miRNS-target párok fordított génexpressziót mutattak a rezisztens xenograft tumorokban a szunitinib érzékeny és kontroll daganatokhoz képest (**25A ábra**), jelezve, hogy a kiválasztott gének potenciális célpontjai ezen miRNS-eknek. Az inverz expresszió a csoportok között előrevetítette a rezisztenciában való potenciális részvételüket (**25A ábra**). Az *in vitro* funkcionális tesztekben a miR-1 és miR-663 transzfekciója a *FRAS1* és *MDGA1* expressziós szintjének csökkenését eredményezte mind fehérje, mind mRNA szinten veserák sejtvonalakban (**25B-C ábra**). Az *MDGA1* gén csendesítése csökkent migrációt és proliferációt eredményezett az ACHN, 786-O és Caki-2 sejtvonalakban (**25D ábra**). A miRNS hatás vizsgálatához a miR-1 és miR-663 miRNS-ek expressziós szintjét transzfekcióval helyreállítva szintén csökkent sejtmigrációt tapasztaltunk, az életképességre/proliferációra gyakorolt miRNS hatást azonban nem tudtuk kimutatni (**25E ábra**).

25. ábra. (A) A miR-1, *FRAS1*, miR-663a és *MDGA1* expressziója a kontroll, szunitinib érzékeny és rezisztens xenograftokban. (B) A miR-1-*FRAS1* kölcsönhatás kísérletes validálása. A miR-1 túlexpressziója csökkentette a *FRAS1* szintjét mind az mRNA (qRT-PCR, balra), mind a fehérje (western blot, jobbra) szinten. (C) A miR-663a-*MDGA1* kölcsönhatás vizsgálata. A miR-663a overexpressziója jelentősen csökkentette az *MDGA1* mRNA (qRT-PCR, balra) és a fehérje (western blot, jobbra) szintjét.

(D) Az siRNS csökkent MDGA1 fehérjeexpressziót eredményezett (western blot). Az MDGA1 géncsendesítés a sejtprolifерáció és a migráció sebességének jelentős csökkenését eredményezte (sebgyógyulási vizsgálatban). (E) A miR-1 és miR-663a miRNS transzfekciója csökkent sejtmigrációhoz vezetett, de nem volt jelentős hatással a proliferációra.



Megbeszélés. A szunitinib-rezisztencia a gyógyszer bevezetését követően fontos problémát jelentett az áttétes ccRCC kezelésében [169]. Munkánkban elsőként írtuk le az érbefogás jelenségét, mint adaptív mechanizmust a világossejtes veserák szunitinib rezisztenciájának hátterében. Morfológiai, immunhisztokémiai és molekuláris elemzésekkel kimutattuk, hogy a migrációs fenotípusra való áttérés szerepet játszik a rezisztencia kialakításában, és hogy a rezisztens daganatok agresszívebb, és fokozott

metasztatikus potenciállal rendelkező fenotípust szereznek. Ez a jövőbeli kutatások egyik kiindulása lehet, ami lehetővé teszi potenciális új adjuváns terápiák kifejlesztését, amely megelőzi vagy lassítja a gyógyszerrezisztencia kifejlődését.

A rezisztencia hátterében a *PAX8* csökkent expressziója volt igazolható a rezisztens tumorokban. A *PAX8* (Paired Box 8) az embrionális vese fejlődéséhez nélkülözhetetlen sejtípus specifikus transzkripciós faktora, amely a magzati és felnőtt vesék tubuláris sejtjeiben és a daganatokban expresszálódik [168]. A *PAX8* fehérje részt vesz az *L1-CAM* (*L1 Cell Adhesion Molecule*) adhéziós molekula szabályozásában is, amely egyben az *ccRCC* fontos terápiás és prognosztikai fehérjéje is [170]. Irodalmi adatok alapján a *PAX8* csökkent mennyisége fokozott *L1-CAM* expresszióhoz és a vese daganatsejtjeinek fokozott migrációs aktivitásához vezet. Így a *PAX8* downregulációja a szunitinib rezisztens sejtekben a migrációs fenotípus egyik kiváltó oka lehet, amely tisztázásához azonban további vizsgálatok szükségesek, mivel más közlemények fokozott *PAX8* expressziót írtak le szarkomatoid *ccRCC*-ben és metasztázisokban [171]. A csökkent *E-cadherin* jelenléte a szunitinib-rezisztens daganatokban megerősítette a migrációs fenotípus kóroki szerepét, hiszen az *E-cadherin* elvesztését az EMT alapvető eseményének tekintik. Kimutatták, hogy a gyógyszerrezisztencia reverzibilis *RCC*-ben [172]. A transzkriptomikai méréseink nem igazoltak ún. angiogenezis rebound-ot (visszacsapást), ami azt jelenti, hogy a szunitinib továbbra is hatással van a növekedési faktor receptorokra a rezisztens tumorokban. Az angiogenezis újra-aktivációja helyett mind az *mRNS*, mind a *miRNS* profilok útvonalai, biofunkciói és *GO* kategóriái a sejt migrációra mutattak.

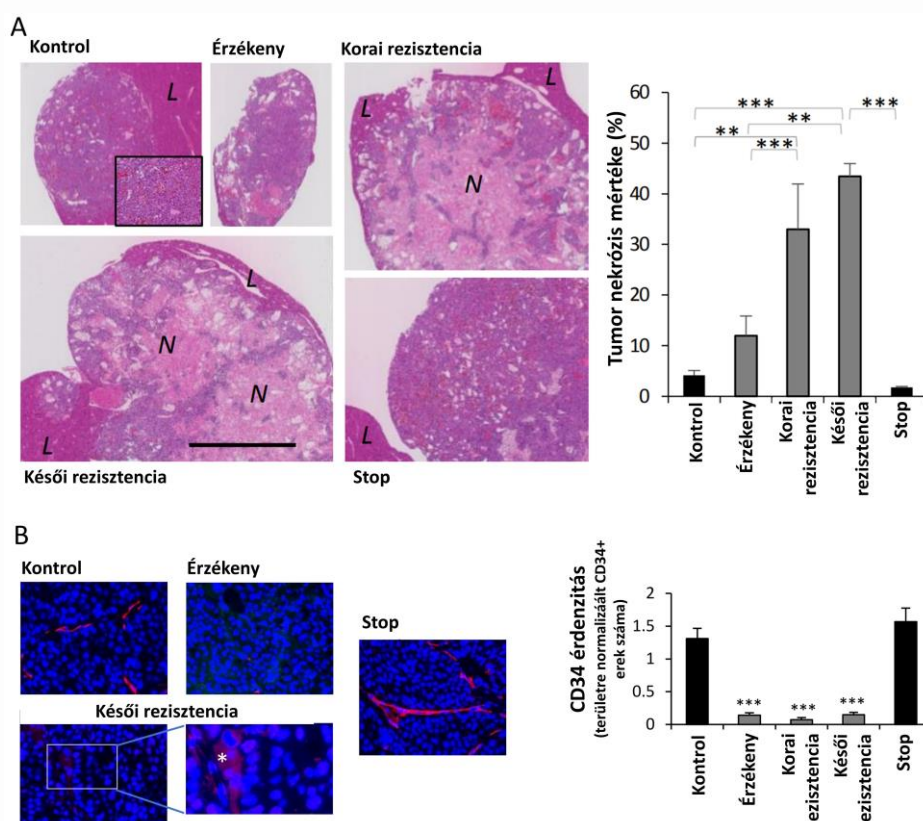
Két jelentős csökkent expressziójú *miRNS*-t azonosítottunk a rezisztencia markereiként: a *miR-663a*-t és *miR-1*-t, melyek többek között az *MDGA1* és *FRAS1* gének kifejeződését regulálják. A *FRAS1* szerepet játszik a sejtadhézióban, és kimutatták, hogy a *FRAS1* csendesítése tüdődaganatokban is csökkenti sejtek migrációját és invázióját a fokális adhéziós jelátvitel gátlásával [173]. Az *MDGA1* fehérje funkciója szintén összefügg a sejtadhéziós molekulákkal, expressziója fokozott sejt motilitáshoz és sejt-sejt adhézióhoz, valamint csökkent extracelluláris mátrixfehérjékhez való tapadáshoz vezetett [174]. Korábban egyik gén esetében sem volt ismeretes a *miRNS* szabályozás, elsőként bizonyítottuk a *FRAS1*-et és az *MDGA1* *miRNS*-ek általi regulációját, és ezzel a két *miRNS*-target pár szerepét a szunitinib rezisztenciában a sejt migráció szabályozása révén. A *miR-1* egy tumorszuppresszor *miRNS*, amely számos daganattípusban csökkent expressziót mutat [33], és olyan molekulákat szabályoz, mint a *MET*, a *Slug*, a *CCND2*, a *CXCR4* [175]. Kimutatták, hogy a *miR-663* gátolja a tumorsejtek migrációját és a pajzsmirigy karcinóma sejtek invázióját [176] és a daganatsejtek mellett gátolja az endothél és vaszkuláris simaizomsejtek migrációját is [177]. Ez különösen fontos jelentőséggel bír *ccRCC*-ben, amely erősen vaszkularizált daganat és az alkalmazott kezelésben is fontos szerepet kapnak az angiogenezist gátló szerek. A rezisztens tumorokban a *miR-663a* csökkent expressziójának oka még tisztázásra vár, de más leukémiás sejtekben írtak már le fokozott promóter-metilációt ennél a *miRNS*-nél [178, 179], ami megfelelne annak a megfigyelésnek, hogy a szunitinib rezisztencia reverzibilis [172].

IV.1.2.2. Szorafenibrezisztencia hátterében azonosított, miRNS-ek által szabályozott folyamatok

A szunitinib mellett, egy másik angiogenezisgátló gyógyszerrel, a szorafenibbel szemben kialakuló rezisztencia okait is vizsgáltuk. A szunitinib rezisztenciavizsgálathoz hasonló kísérletet végeztünk: *in vivo* xenograft modellt hoztunk létre, eredményeinket immunhisztokémiai módszerrel validáltuk.

A szorafenib kezdetben gátolta az angiogenezist és stabilizálta a tumor növekedését. A kezelés hatására mind az érzékeny, mind a rezisztens daganatokban a nekrózis jelentős mértékű volt (**26A ábra**). A rezisztencia kialakulása során szintén nem figyeltünk meg angiogén "rebound" hatást, kivéve, ha a kezelést felfüggesztettük („Stop” tumorok), amely a rezisztencia reverzibilis voltára utalt (**26B ábra**). A neoangiogenezis helyett a rezisztens daganatok lokálisan infiltratívabbá váltak, és a rezisztens tumorokban a májparenchima saját érhalózatának 75%-ában, míg a kontrolloknak 23,3%-ában volt kimutatható a befogadó szövetek ereinek befogása.

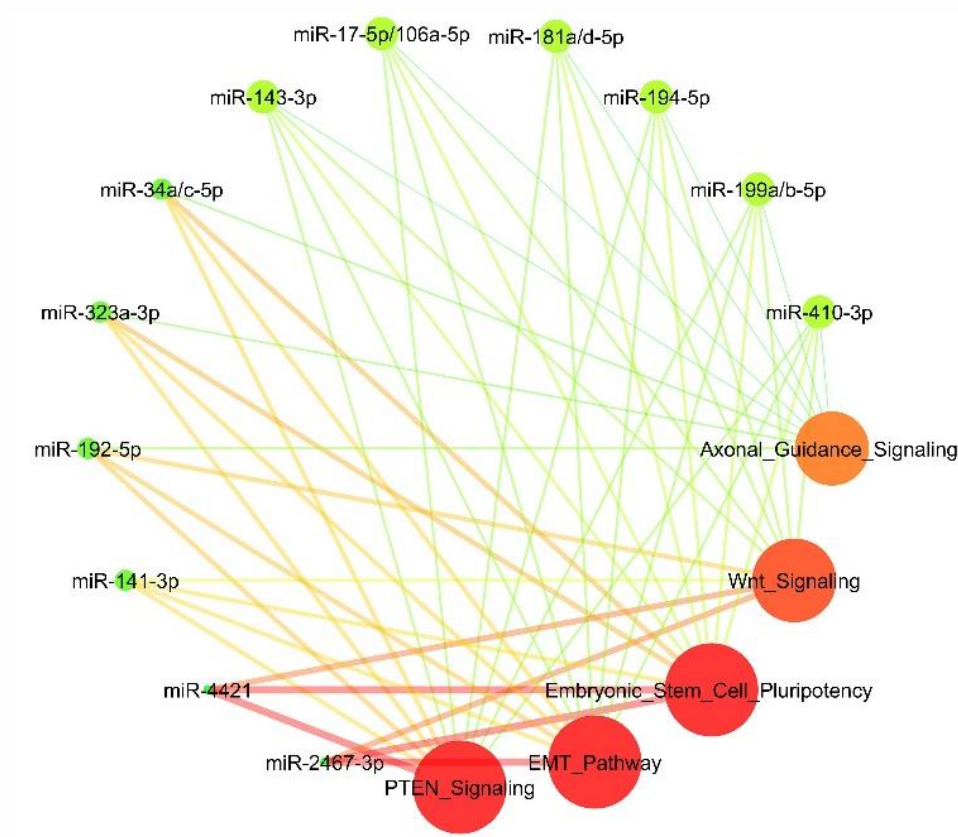
26. ábra. (A) Szorafenib kezelt kontrol, érzékeny és rezisztens xenograftok szövettani képe (hematoxilin-eozin festés) és a tumor nekrózis mértéke. L: környező májszövet, N: nekrotikus tumor terület, Stop: kezelés alól felfüggesztett xenograft tumor. (B) Érdenzítés (CD34 pozitivitás piros fluoreszcens festéssel jelölve) alakulása a kezelés hatására a különböző mintacsoportokban (a sejtmagok kék DAPI festéssel jelölve).



MiRNS-szekvenálást végeztünk a kontroll, érzékeny és késői rezisztens daganatokon. A rezisztens daganatokban az útvonalanalízis során az első 8 azonosított aktiválódott útvonal közül 4 részt vett a sejtmotilitásban és az invázióban („Axonal guidance”, „EMT”, „STAT3” és „Wnt/β-catenin

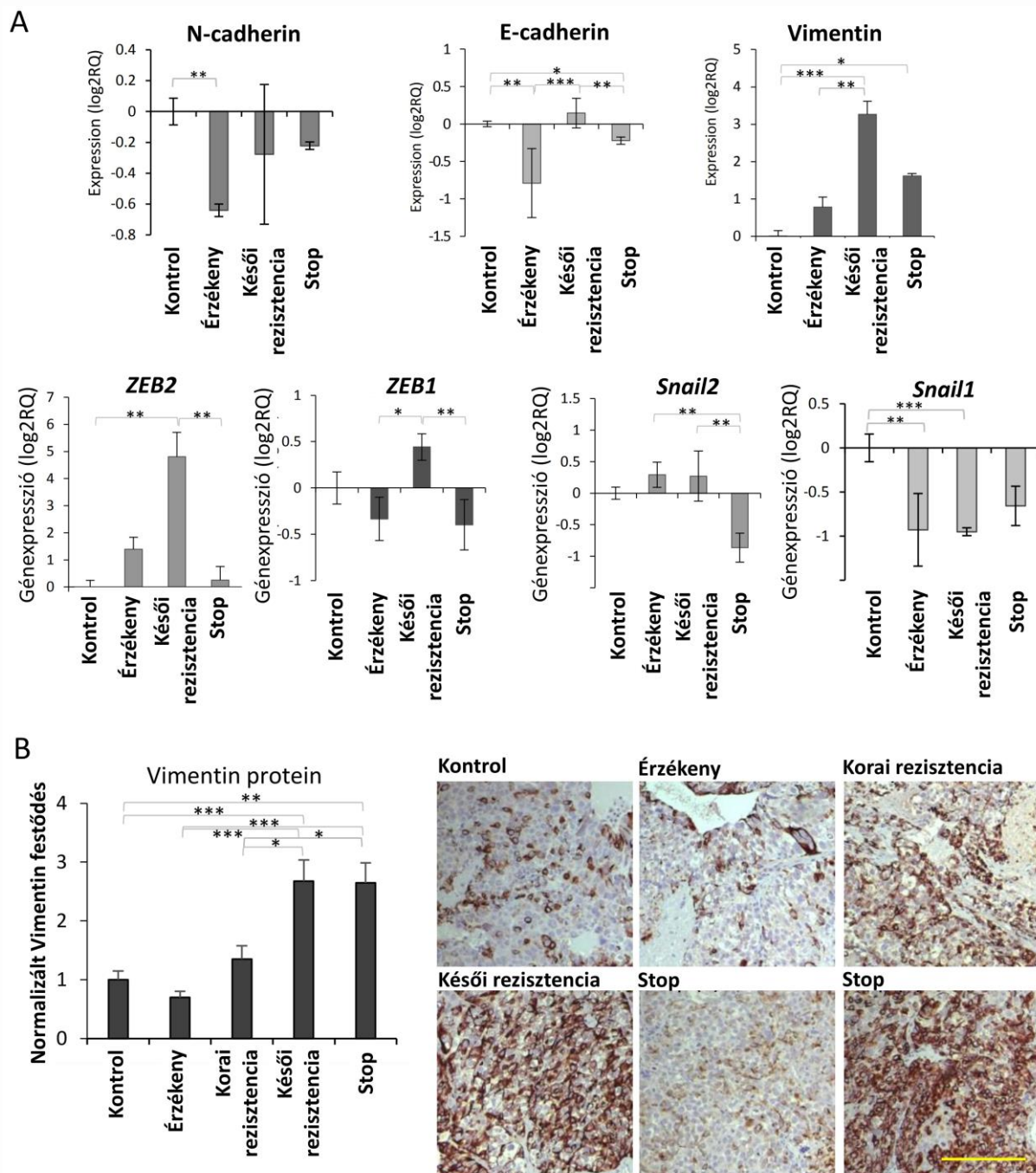
signaling”). A késői rezisztenciában részt vevő miRNS-eket és az általuk szabályozott géneket a 27. ábra mutatja be.

27. ábra. A késői rezisztenciában az érzékeny daganatokhoz képest eltérően kifejeződő miRNS-ek által szabályozott 5 legszignifikánsabb jelátviteli útvonal.



Ezért számos EMT-vel kapcsolatos gén expresszióját validáltuk qRT-PCR-rel, mely a késői rezisztens tumorokban a mezenchimális és pro-EMT markerek fokozott (pl. *VIM*, *ZEB1* és *ZEB2*) kifejeződését mutatta a kontroll vagy szorafenib érzékeny tumorokhoz képest (28A ábra). Az EMT jelenlétét a rezisztenciában fehérje szinten is megerősítettük (28. ábra). A vimentin indukció már korai rezisztenciával megjelent ($p > 0,05$ vs. kontroll vagy érzékeny), amikor az invazivitás fokozott jelei nyilvánvalóvá váltak (28. ábra). A rezisztens daganatokban, melynél a kezelést felfüggesztettük („stop” tumorok) alacsony és magas expressziójú területek váltakozva voltak kimutathatók, ami a vimentin expresszió részleges megfordulását jelezte a kezelés abbahagyásakor (28B ábra).

28. ábra. Pro-invazív és EMT-szerű jelátvitel a tumorsejtekben szorafenib rezisztencia során. **(A)** Az EMT-asszociált gének génexpressziója. **(B)** A vimentin fehérje expressziója immunhisztokémiai analízissel a különböző csoportokban (a stop tumorokban vegyes fenotípussal volt észlelhető) (a sárga lépték: 200 μ m). * $p < 0.05$, † $p < 0.01$, ‡ $p < 0.001$. A hibasávok a szórást jelölik.



Megbeszélés. Szorafenib esetében szövettani vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az antiangiogén kezelés hatására a daganatok nem képesek érújdonképződésre, azonban a befogadó szövet érstruktúrája megmarad hasonlóan a szunitinib rezisztencia esetében. Ezért a tumorsejtek EMT-szerű molekuláris és fenotipikus változásokon mennek keresztül, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy infiltrálják a környező szöveteket, és további, már meglévő parenchymális ereket válasszanak (érbefogás). A migrációs fenotípus molekuláris hátterében az EMT-szerű folyamatok fontos szerepet játszanak, melynek kialakulásában a miRNS-ek is szerepet kaptak.

IV.1.3. A szöveti miRNS-ek sejtciklusban és mitokondriális funkcióban betöltött szerepének analízise hipofízis neuroendokrin tumorokban

IV.1.3.1 A szöveti miRNS-ek szerepe a sejtciklus szabályozásában

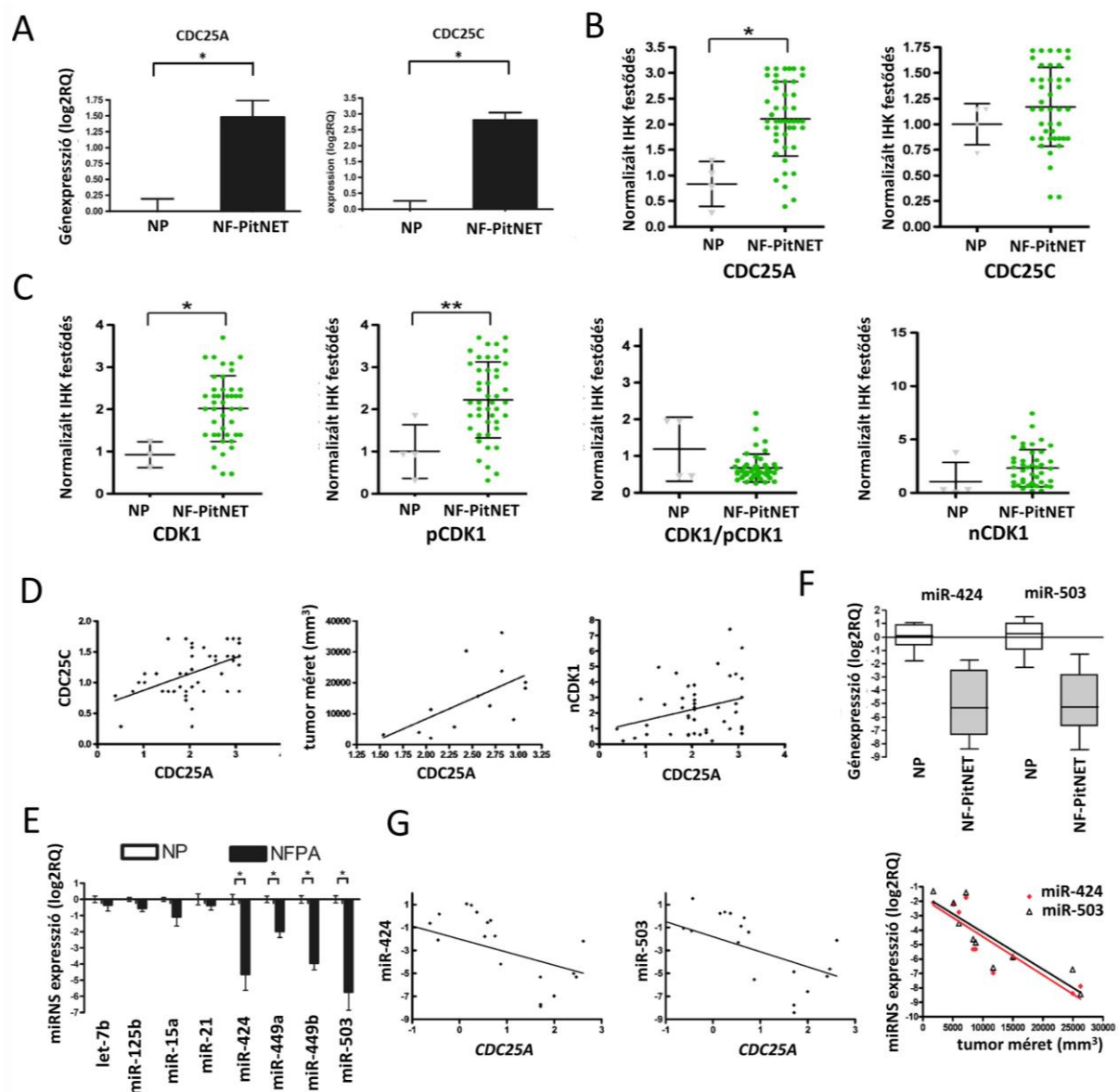
A G2/M átmenet tagjait kódoló gének expressziója nem-funkcionáló hipofízis neuroendokrin tumorokban (NF-PitNET). A vizsgált 46 gén közül, amelyeket 34 NF-PitNET és 10 normál hipofízis mintában egyedi tervezésű TaqMan Low Density Array (TLDA) segítségével vizsgáltunk, 15 mutatott eltérő expressziót a daganatokban a normál szövetekhez képest, ezek közül a CDC25A és CDC25C géneket egyedi assay-k alkalmazásával is validáltuk (9. táblázat).

9. táblázat. NF-PitNET daganatokban eltérően expresszáldó G2/M átmenetet szabályozó gének

Felülexpresszált gének			Alulexpresszált gének		
Gén	Fold change	p-érték	Gén	Fold change	p-érték
AURKB	6,09	0	GADD45B	0,11	0,0001
BIRC5	5,3	0,0011	CDKN1A	0,17	0
BRCA2	2,8	0,0002	AURKC	0,49	0,0029
CDC25C	2,75	0,0106	CDK7	0,61	0,0005
CDCA8	2,52	0,0002	CHEK2	0,64	0,0082
CDC25A	2,16	0,0039	TP53	0,68	0,0026
FANCD2	1,89	0,0075			
CCNB1	1,67	0,0167			
YWHAB	1,47	0,0233			

A CDC25A és CDK1 fokozott expressziója fehérje szinten NF-PitNET daganatokban. A CDC25A, CDC25C és ezek célmolekulája a CDK1 mennyiségét fehérje szinten is megerősítettük immunhisztokémiával szöveti microarray-ken. A CDC25A az NF-PitNET-ek 76%-ában (35/46) emelkedett expressziót mutatott a kontrollokhoz képest. A CDC25C az NF-PitNET-ek 45,6%-ában (21/46) volt jelen magasabb mennyiségben, de globálisan a CDC25C fehérjeszintű expressziója nem különbözött szignifikánsan a daganatok és a normál szövetek között. A CDK1 (total) és pCDK1 (foszfo-CDK1: inaktív forma) nagyobb mennyiségét találtuk az NF-PitNET-ek 82,6% (38/46) és 63% -ában (29/46) a normál szövetekhez képest (29. ábra). A pCDK1/CDK1 aránya azonban hasonló volt a két mintacsoportban, ami arra utal, hogy az aktivitási ráta nem változott, hanem a fehérje teljes mennyiségében következett be változás. A nukleáris CDK1 (nCDK1) festési pontszám nem különbözött szignifikánsan az NF-PitNET és a normál szövet között. Szignifikáns korrelációt találtunk a CDC25A és CDC25C, a CDC25A és a tumorméret, valamint a CDC25A és nCDK1 festés között (29. ábra). Emellett a nukleáris CDK1 pozitív korrelációt mutatott a Ki67 proliferációs indexszel (p=0,0003).

29. ábra. (A) A CDC25A és CDC25C génexpressziója normal hipofízis szövetben és NF-PitNET mintákban. (B) A CDC25A és CDC25C fehérje mennyisége immunhisztokémiával. (C) A CDK1, pCDK1, nCDK1 festődés és CDK1/pCDK1 arány NF-PitNET daganatokban. (D) A CDC25A fehérje mennyiség korrelációja CDC25C ($R=0,45$, $p=0,001$), nCDK1 festődéssel ($R=0,34$ and $p=0,01$) és a tumormérettel ($R=0,66$, $p=0,01$). (E) A CDC25A-t célzó miRNS-ek expressziója normal hipofízis szövetben és NF-PitNET mintákban. A miR-424 és miR-503 expressziója (F) és korrelációja a CDC25A-val (CDC25A & miR-424: $R=-0,51$, $p=0,02$; CDC25A & miR-503: $R=-0,55$, $p=0,01$) és a tumor mérettel (miR-424: $R=-0,73$, $p=0,04$; miR-503: $R=-0,92$, $p=0,01$) (G)



A primer és recidív adenomák összehasonlításában a Ki67 proliferációs index magasabb volt a visszatérő tumorokban ($p=0,001$). A CDK1 fehérje inaktív formája (pCDK1) magasabb expressziót mutatott az elsődleges vs. visszatérő adenomákban ($p=0,008$).

A CDC25 fokozott expressziójának okai. A CDC25A NF-PitNET tumorokban való magas expressziója mögött meghúzódó lehetséges okok feltárása érdekében teszteltük a CDC25A kromoszóma-lokalizációjának kópiaszám-variációit, a CDC25A-t szabályozó transzkripciós faktorok expresszióit és a CDC25A 3'UTR-jét célzó miRNS-eket. A CDC25A és a 3p21 kromoszóma-lokalizációinak kópiaszám-variációit öt független tanulmányból 177 PitNET daganaton végzett összehasonlító genomhibridizációs (CGH) vizsgálat adatainak újraelemzésével vizsgáltuk [118].

Ezeknek a lókuszoknak a kromoszóma-többlete csak a tumorok elenyésző hányadában volt detektálható, ami arra utal, hogy a minták többségében nem történik génamplifikáció. A *CDC25A* expressziót szabályozó transzkripciós faktorok vizsgálatához a *CDC25A* promoter analízissel, 7 humán transzkripciós faktort azonosítottunk, amelyek potenciálisan kötőhelyekkel rendelkeztek. Hat különböző, nagy áteresztőképességű mRNS és/vagy fehérje (5 mRNS microarray vizsgálat és 2 protein array [118]) szűrővizsgálat eredményeit áttekintve azonban ezen transzkripciós faktorok egyike sem mutatott expressziós eltérést egyik vizsgálatban sem a daganatokban a normál szövetekhez képest. Így a miRNS-ek szerepe került előtérbe, kifejezetten, mivel az irodalomban *CDC25A*-t 8 miRNS kísérletesen validált célpontjaként is leírták [118]. Ezért megvizsgáltuk ennek a 8 miRNS-nek az expresszióját NF-PitNET-ben, melyek közül a miR449a, miR-449b, miR-424 és miR-503 szintje jelentősen csökkent a normál hipofízisszövethez képest. Kettő ezek közül negatívan korrelált a tumor méretével (miR-424: $R=-0,73$, $p=0,04$; miR-503: $R=-0,92$, $p=0,01$) (29. ábra) [180], amely valószínűsíti a *CDC25A* miRNS-ek általi szabályozását NF-PitNET daganatokban.

Megbeszélés. Számos tanulmány igazolta, hogy a sejtciklus diszregulációja szerepet játszik a PitNET daganatok patogenezisében, azonban ezek a vizsgálatok elsősorban a G1/S átmenetre fókuszáltak, és a G2/M átmenet szabályozásának szerepét munkánkat megelőzően nem vizsgálták [95]. Korábbi eredményem, melyben a WEE1 kináz poszt-transzkripcionális, miRNS-ek általi szabályozásának jelentőségét tártam fel, volt az első közlés ebben a témában [103]. A WEE1 a sejtciklus fontos szabályozója azáltal, hogy foszforilálja a CDK1-et, gátolja kináz aktivitását, ezáltal megakadályozza a sejt mitózisba jutását a G2/M ellenőrző ponton. Kimutattuk, hogy a WEE1 fehérje expressziója csökkent NF- és GH-PitNET daganatokban az egészséges hipofízis szövetekhez képest, amely azonban mRNS szinten nem volt igazolható. Az *in silico* targetpredikció segítségével azonosított 5 miRNS közül 3 (miR-128a, miR-155 és miR-516a-3p) esetében igazolható volt a fokozott expresszió a NF-PitNET mintákban. E három miRNS az RNS interakciós kísérletekben szignifikánsan csökkentette a WEE1 kifejeződését mind transzkripciós, mind fehérje szinten. Emellett a miRNS-ek sejtprolifерáció gátló hatását is igazolni tudtam [103]. Ezt a munkát folytatva végeztük el a G2/M átmenet tagjainak komprehenzív karakterizálását, mely a sejtciklus G2/M átmenetének felgyorsulását azonosította az azt szabályozó molekulák fokozott expressziója által [118]. A mitózist elősegítő gének emelkedett expressziója (chromosomal passenger complex (CPC) members *CDC8A* (Borealin), *BIRC5* (Survivin) and *AURKB*)) szintén alátámasztotta ezt a megfigyelést. Irodalmi adatok alapján az *AURKB* a jóindulatú prolaktinómák 80%-ában (8/10) detektálható, magasabb expressziót mutat az agresszív tumorokban, mint a nem agresszívokban, és kiújulással vagy progresszióval is összefüggésbe hozható [181, 182]. A G2/M közvetlen szabályozójaként emeltük ki a *CDC25* család fehérjéit további vizsgálatra. A *CDC25A* részt vesz a G1/S átmenetben is, fő feladata azonban a CDK1-ciklin B komplex defoszforilációja (aktivációja), ezáltal elősegíti a sejtciklus G2/M fázisok közötti átlépést. A *CDC25B* és *CDC25C* a mitózis folyamatát regulálja [183]. A *CDC25A*-t és a *CDC25B*-t onkogénnek tekintik, fokozott expressziójukat gyakran azonosítják a legkülönbözőbb daganatokban [183]. Eredményeink alapján az

henriettbutz_199_24

NF-PitNET daganatokban a *CDC25A* nagyobb mennyiségben van jelen mind mRNS, mind fehérje szinten az egészséges kontrollokhöz képest, míg a *CDC25C* esetében, csak az mRNS szinten tudtunk kimutatni fokozott expressziót. Ez az eredmény összhangban van más megfigyelésekkel, amelyek a *CDC25* foszfatázok disszonáns expresszióját mutatják mRNS transzkript és fehérje szinteken [183].

Az NF-PitNET daganatokban emelkedett *CDK1* szintet találtunk fehérjeszinten, de mRNS-szinten nem, ami arra utal, hogy a *CDK1* expresszió poszttranszkripció szabályozása áll fenn. A *CDK1*-et célzó miRNS-ek [184–186] közül a miR-410 és a miR-24 alulexpresszáldók a NF-PitNET daganatokban [180]. A *CDC25A*-t célzó miR-424 és miR-503 csökkent expressziót mutatott a nem-funkcionáló és gonadotrop adenomákban, és expressziójuk negatívan korrelált a tumormérettel [180]. Ez a két miRNS az Xq26.3 lókuszon kódolt, egy miRNS-klaszterben a miR-450a, miR-450b és miR-542-vel együtt. Fontos, kiemelni, hogy a klaszter utóbbi három tagját az NF-PitNET mintákban végzett korábbi elemzésünkben is alulexpresszálnak találtuk a normál hipofízishez képest [180], és expressziós szintjük szintén erős negatív korrelációt mutatott a tumor méretével [180]. Mivel a *CDC25A* mRNS expresszió nem, de a fehérje mennyisége pozitívan korrelált az adenoma méretével, valamint a kópiaszám és transzkripció faktor analízis negatív eredménye alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a miR-424 és a miR-503 játszhat központi szerepet a *CDC25A* fehérje kifejeződés szabályozásában az NF-PitNET-ek esetében, és tumorsuppresszor miRNS-ekként működnek. Összegezve a WEE1, a *CDC25A* és *CDK1* miRNS-ek általi regulációját és szerepét esldőként írtuk le PitNET daganatokban.

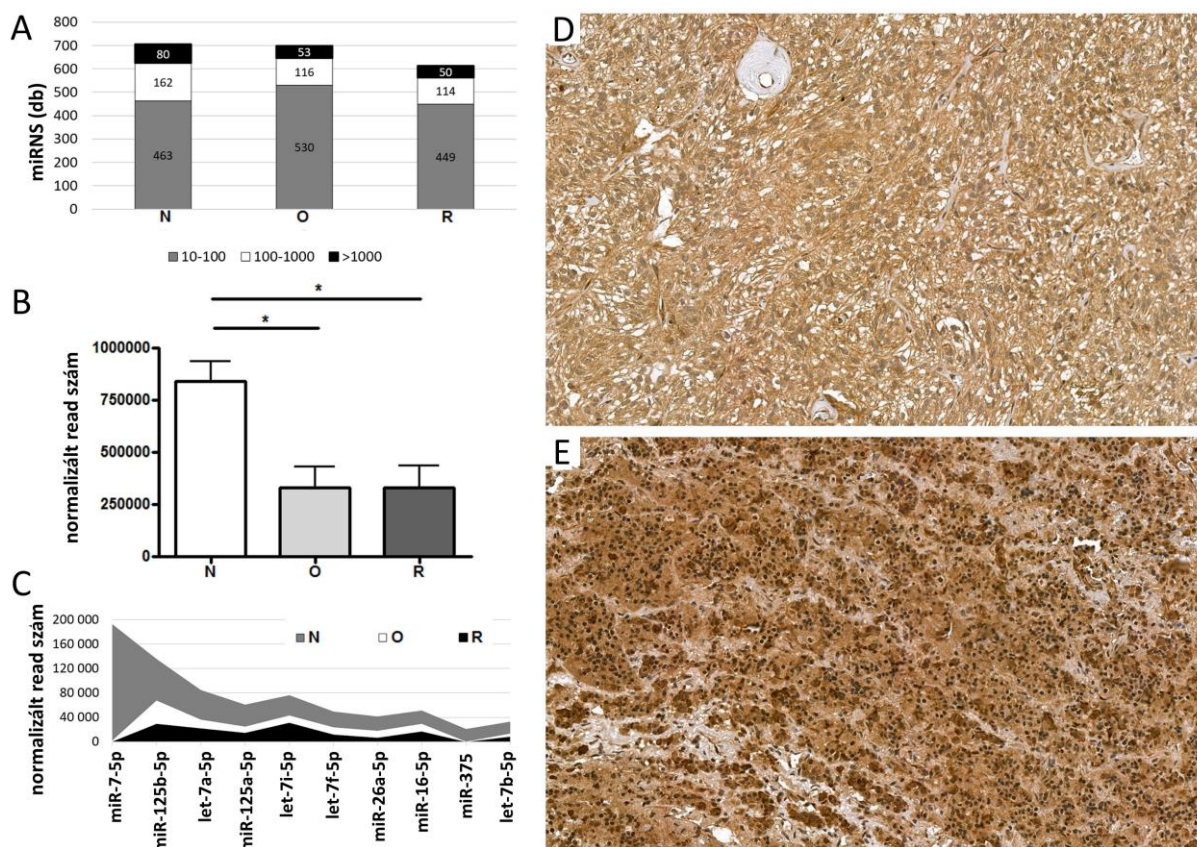
IV.1.3.2 miRNS-ek által szabályozott mitokondriális folyamatok hipofízis onkocitómákban

A hipofízis onkocitóma az agyalapi mirigydaganatok rendkívül ritka, hátsó lebenyből (neurohipofízisből) kiinduló formája, mely ritkaságnak köszönhetően kialakulásuk patogeneziséről rendkívül kevés információ áll rendelkezésre. Ebben a tumortípusban elsőként vizsgáltuk a miRNS-expressziós profilt, és komplex bioinformatikai megközelítéssel, valamint *in vitro* funkcionális tesztekkel bizonyítottuk a miRNS-ek szerepét e tumortípus kialakulásának hátterében.

Hipofízis onkocitómák miRNS és mRNS transzkriptom profilja. Összesen 9 FFPE PitNET onkocitóma szövetmintát (4 primer, 3 rekurrens és 2 környező normál szövet) gyűjtöttünk össze 2009-2018 között a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet neuropatológiai anyagából, melyből miRNS szekvenálást végeztünk. A miRNS profil karakterizálás (30. ábra) alkalmával a daganatokban szignifikánsan alacsonyabb globális miRNS expresszió volt kimutatható a kontrol szövetekhez képest, melynek hátterében mind mRNS, mind fehérje szinten csökkent Drosha szintet azonosítottunk (30. ábra).

henriettbutz_199_24

30. ábra. (A) miRNS expresszió karakterisztikája hipofízis normál szövetben (N), hipofízis onkocitómában (O) és recidív onkocitómában (R). A különböző színek a különböző expressziós tartományban kifejeződő miRNS-eket jelölik. (B-C) A legnagyobb mértékben expresszáldó miRNS-ek hipofízis onkocitómában. Droscha expresszió hipofízis onkocitómában (D) és normál hipofízis szövetben (E)



A teljes miRNS-profil képes volt elkülöníteni az agyalapi mirigy onkocitómáit a normál hipofízis szövetektől. Összesen 54 eltérően kifejeződő miRNS-t azonosítottunk PitNET onkocitómában a normál szövethez képest, és 8 miRNS-t visszatérő onkocitómákban vs. primer tumorban. Az mRNS expressziós adatok újraelemzésével 485 különböző expresszált gént azonosítottunk, melyek leginkább a sejtciklust befolyásolták (10. táblázat)

10. táblázat. A hipofízis onkocitóma transzkriptom eltéréseinek funkcionális hatása

ADATBÁZIS					
IPA		DAVID		TOPPFUN	
Útvonal	p-érték	Útvonal	p-érték	Útvonal	p-érték
Cell cycle: G1/S	0,0025	PI3K-AKT signaling pathway (Kegg Pathway)	0,005	Growth hormone signaling	0,000002
Cell cycle: G2/M	0,0027	Cell cycle: G1/S (Biocarta Pathway)	0,016		
Growth hormone signaling	0,0027	RAP1 signaling pathway (Kegg Pathway)	0,026		

A miRNS eltérések útvonal és génontológia vizsgálatával, valamint funkcionális annotációs klaszterezéssel egy metabolizmus („Metabolism”) és egy mitokondriumokkal kapcsolatos (Mitochondria related), miRNS-ek által szabályozott génklasztert azonosítottunk (31A ábra). Ezen

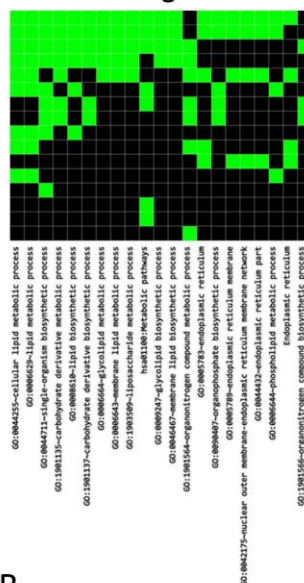
henriettbutz_199_24

génklaszterek használatával két miRNS-target interakciós hálózatot építettünk, hogy elemezzük a miRNS-ek szerepét az onkocitóma sejtek metabolizmusában és mitokondriális funkciójában (31B ábra).

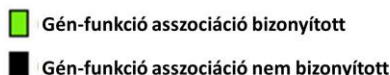
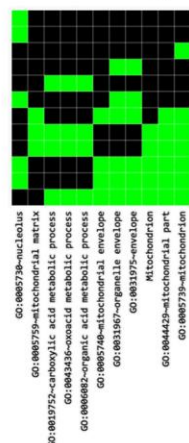
31. ábra. (A) A hipofízis onkocitómában eltérően kifejeződő gének metabolikus és mitokondriális génklaszterben dúsulnak. (Zöld szín jelöli az ismert gén-funkció asszociációt, fekete a korábban még nem leírt/bizonyított gén-funkció asszociációt). (B) A metabolikus és mitokondriális gének miRNS-interakciói. (Zöld szín jelöli a daganatban a normál szövethez képest a csökkent, piros az emelkedett expressziót).

A

Metabolikus gén klaszter

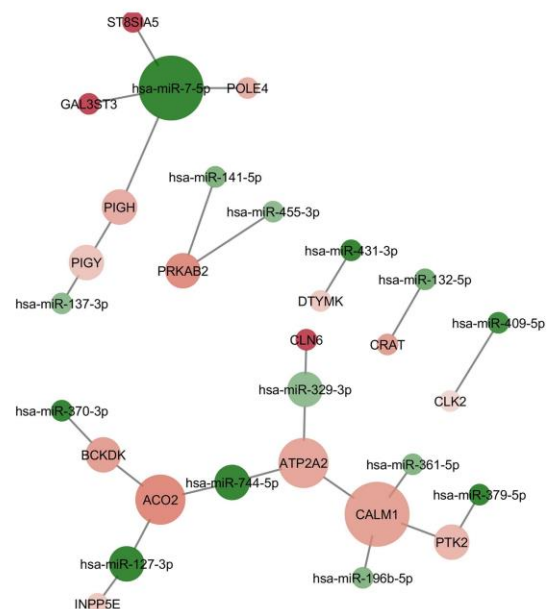


Mitokondriális gén klaszter

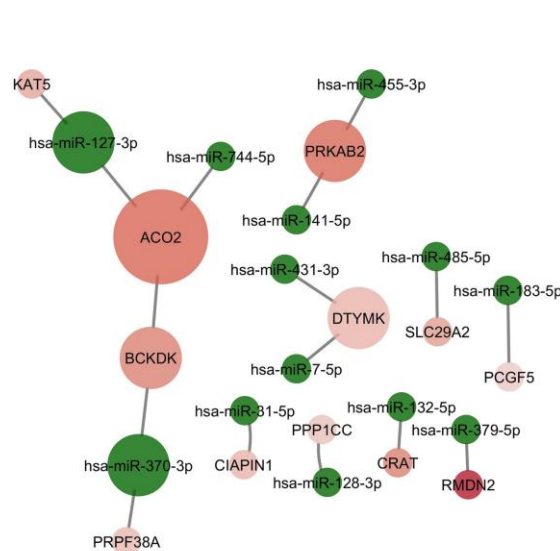


B

Metabolikus gén klaszter – miRNS interakciók



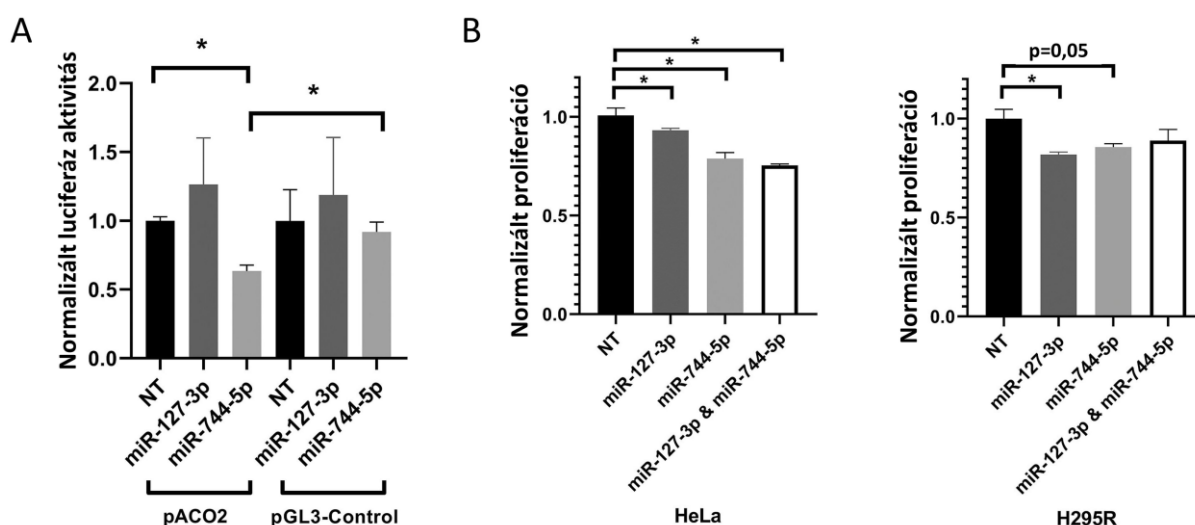
Mitokondriális gén klaszter – miRNS interakciók



Az ACO2 miRNS-ek általi regulációja. A metabolikus útvonalak és az onkocitómák korábban ismert patogenezisének figyelembevételével választottuk ki a mitokondriális Aconitáz 2 (ACO2) enzimet további vizsgálatra, mely mindkét hálózatban szerepelt. Az ACO2 szignifikánsan magasabb

expressziót mutatott a hipofízis onkocitómákban a normál szövethez képest ($\log_2\text{RQ}=2,78$, $p<0,01$). Az ACO2-t potenciálisan célzó két miRNS, a miR-744-5p és a miR-127-3p, jelentősen csökkent kifejeződése volt detektálható a daganatokban (miR-744-5p: $\log_2\text{RQ}=0,20$; $p=0,01$; miR-127-3p: $\log_2\text{RQ}=0,05$; $p<0,01$). A miR-127-3p és miR-744-5p funkciójának *in vitro* vizsgálata során a miRNS-ACO2 kölcsönhatás validálására ACO2 3'UTR riporter vektor (pACO2) és miRNS kotranszfekciót végeztünk. A miR-744-5p hatására szignifikánsan csökkent luciferáz aktivitást észleltünk a kontroll miRNS-hez képest, nem így a miR-127-3p transzfekció esetén (32A ábra). Emellett mind a miR-127-3p, mind a miR-744-5p transzfekciót követő 24 óra elteltével a sejtprolifерáció szignifikáns csökkenését detektáltuk (32B ábra).

32 ábra. (A) Az ACO2 miRNS-ek általi szabályozása. A miR-744-5p transzfekció szignifikánsan csökkentette a luciferáz aktivitást a riporter gén kísérlet során. (B) A miR-127-3p és miR-744-5p hatására csökkent a sejtprolifерáció.

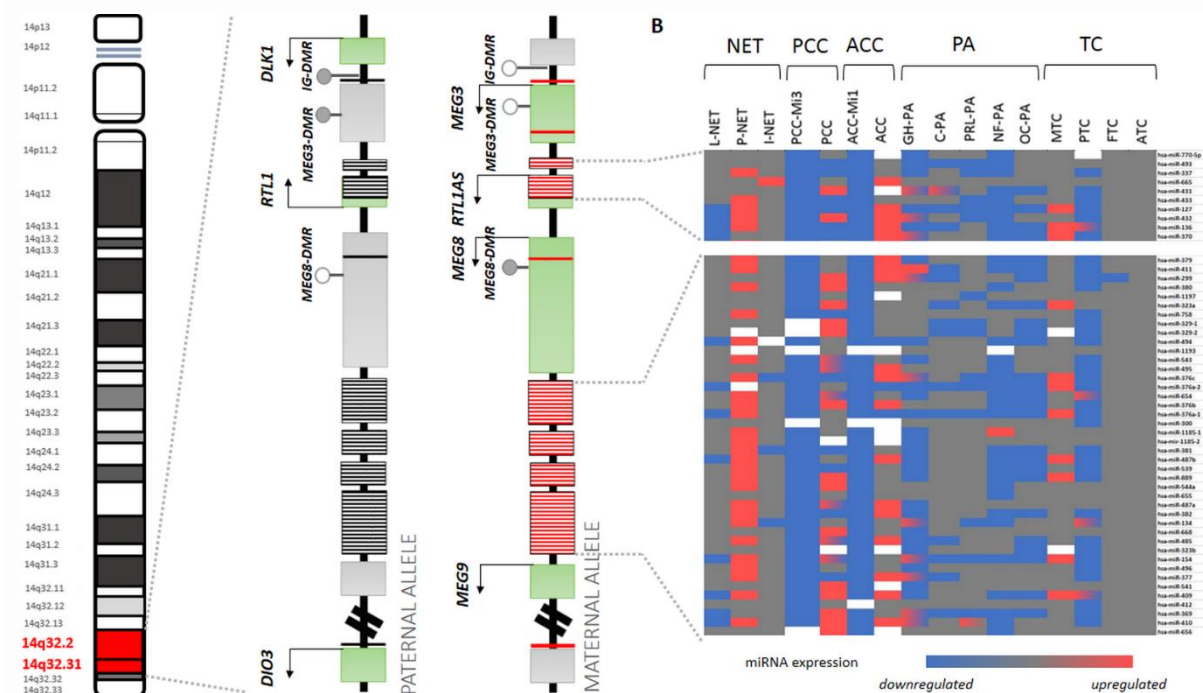


A 14q32 lókuszon kódolt miRNS-ek funkciójának *in silico* analízise. Érdekes módon a hipofízis onkocitómákban downregulált miRNS-ek 40%-a a 14q32 régióban kódolt. Az itt kódolt miRNS funkcionális analíziséhez 70, endokrin daganatszöveten elvégzett, nagyátersztőképességű miRNS expressziós mérést vizsgáló tanulmányt gyűjtöttünk össze, mérési eredményeiket újraelemeztük és szintetizáltuk, majd bioinformatikai elemzésnek vetettük alá [127]. A PitNET daganatokat, a papilláris pajzsmirigyrákot, a feokromocitómát és a mellékvesekéreggrák egy sajátos alcsoportját a 14q32 klaszter által kódolt miRNS-ek csökkent expressziója jellemzi. A hasnyálmirigy neuroendokrin tumorok, a mellékvesekéreggrákok többsége és a medulláris pajzsmirigyrákok ettől eltérően a 14q32 miRNS-eket fokozottan expresszálják. Feokromocitómában és a növekedési hormont termelő hipofízis adenómában azonban a 14q32 miRNS-klaszter tagjainak fokozott és csökkent expresszióját egyaránt megfigyelhető (33. ábra).

A 14q32 miRNS-ek funkcionális hatásának vizsgálatához targetpredikciót és génkészlet-dúsítási elemzést végeztünk, hogy megvizsgáljuk a koexpressziós mintázat nettó hatását. Több olyan molekuláris funkciót és biológiai folyamatot azonosítottunk, melyek részt vesznek a tumorok kialakulásában. Számos daganatkialakuláshoz kapcsolódó útvonalat („TGF- β signaling”, „Ras

signaling”, „ErbB signaling”), az invazivitás és metasztázis kialakulásában részt vevő útvonalakat (pl. „Proteoglycans in cancer”, „Adherens junction”) vagy a pluripotenciát és az összejt jellemzőket („stemness”) befolyásoló útvonalakat azonosítottunk potenciális funkcionális szerepként.

33. ábra. 14q32 lókuszon elhelyezkedő miRNS-ek és expressziós profiljuk különböző endokrin daganatokban (részleteket lásd a szövegben)



Megbeszélés. Az irodalomban elsőként vizsgáltuk az agyalapi mirigy onkocitómáinak miRNS expressziós profilját és a miRNS-ek jelentőségét a daganatpatogenezisben. A miRNS profil egyértelműen elkülönítette a daganatokat a normál szöveti vagy rekurrens (visszatérő) onkocitóma mintáktól, amely a miRNS-ek eltéréseinek patogenezisben való szerepére utal. Érdekes módon az onkocitómákban eltérően expresszálódó gének útvonal-elemzése főként sejtciklus-változásokat tárt fel, míg a miRNS-ek inkább az anyagcsere és mitokondriális folyamatokat szabályozták ebben a tumortípusban. A mitokondriális funkció érintettségét szintén igazoltuk az elülső lebenyből kiinduló PitNET daganatokban, ahol kimutattuk, hogy egy általánosan alacsony heteroplazmia arány mellett, a több variánst hordozó daganatok magasabb proliferációs index-szel rendelkeznek és felmerült jelentőségük a daganatok recidív tulajdonásával kapcsolatban is [187].

A mitokondriális akonitáz 2 (ACO2) miRNS-ek általi regulációját elsőként írtuk le az irodalomban. Az ACO2 részt vesz a citromsav (trikarbonsav, TCA) ciklusban és a mitokondriális légzési komplexekben (I., II. és III. komplexek) [188]. A TCA-ciklus második lépésében katalizálja a citrát izocitráttá történő átalakulását cisz-akonitáton keresztül. Az ACO2 géncsendesítés eredményeképp humán fibroblaszt sejtek a sejtciklus S fázisába történő belépése jelentősen csökkent, és a DNS-szintézis károsodását eredményezte [189]. Sajnos nem azonosítottuk olyan specifikus mechanizmust, amely tisztázná a glikolízisben és a TCA-ciklusban részt vevő enzimek pontos szerepét a DNS-replikáció

szabályozásában. Úgy tűnik azonban, hogy ezek az anyagcsere-útvonalak és a sejtciklus szabályozása, különösen a DNS-szintézis összefügg [189].

Eredményeink arra utalnak, hogy hipofízis onkocitómában a csökkent expressziójú miRNS-ek szerepet játszanak az ACO2 fokozott kifejeződésében, amely a sejtciklus fokozott működéséhez és proliferációhoz vezet ezekben a sejtekben. Mind a miR-127-3p, mind a miR-744-5p az ACO2 regulációval együtt jelentősen csökkentette a sejtproliferációt két független humán sejtvonalban, ami általános tumorsuppresszor szerepükre utalhat. E két miRNS (miR-127-3p és miR-744-5p) csökkent expresszióját több daganattípusban is igazolták, [190, 191] [192, 193]. Tumorsuppresszor hatásukat a proliferáció gátlásával fejtik ki a KMT5a (hisztón-lizin N-metiltranszferáz KMT5A), az ITGA6 (integrin, alfa 6), a MAP2K4 és a BCL2 poszttranszkripció szabályozása révén [194, 195] [192, 196]. A hipofízis onkocitómában emellett a miR-127-3p a protein kináz 2 (PKN2) és az inozitol-polifoszfát-5-foszfátáz E (INPP5E) célzásával szintén hatással lehet a sejtproliferációra [197, 198]. A miR-744-5p pedig az ATP1A4-et is valószínűleg regulálja, amely közvetetten részt vesz a szénhidrát anyagcserében. A GFRA2 (Glial cell line-derived neurotrophic factor Family Receptor Alpha 2) a miR-744-5p másik túlexpresszált célpontja hipofízis onkocitómában, amely neurotróp faktorként kulcsszerepet játszik a neuronok túlélésének és differenciálódásának szabályozásában. Az agyalapi mirigy onkocitómái rendkívül ritkák, és nincs elérhető *in vitro* (sejtvonal) vagy *in vivo* (állat) modell erre a daganattípusra, így nem lehet pontosan validálni az ACO2 túlexpresszió és a miRNS-ek valódi funkcionális hatásait. Az mRNS és miRNS expressziós profilok azonban erős sejttípus specifitást mutatnak, így eredményeink kiterjesztik onkocitómákban korábban leírt metabolikus eltéréseket a miRNS-ek általi szabályozási mechanizmusokkal.

A hipofízis onkocitómákban a miRNS-expresszió globális downregulációját detektáltuk az egészséges szövetekhez képest, melynek hátterében csökkent Drosha enzim mennyiséget mutattunk ki. Az alacsony mintaszám miatt azonban további megerősítő vizsgálatok szükségesek ennek validálásához. A csökkent miRNS-régiók kromoszóma-lokalizációjának vizsgálata a downregulált miRNS-ek 40%-a esetében a 14-es kromoszómán elhelyezkedő miRNS klaszterre 14q32 (DLK-MEG3) lokalizálódott [127]. Ennek expressziós mintázata tumortípus specifikus, többségében tumorsuppresszor funkcióval társítható. Az itt kódolt miRNS-ek pedig részt vesznek mind a daganatok kialakulásában, mind a progresszióban [127].

IV.1.4. A glükokortikoid receptor-miRNS-Wnt szabályozás működésének vizsgálata hormonérzékeny daganatokban

A Wnt jelátvitel, amely miRNS-ek általi szabályozásának szerepe van korábbi eredményeink alapján daganatok angiogenezisgátlókkal szemben kialakított rezisztenciában, részt vesz a sejtproliferáció és differenciálódás, valamint tumorgenezis folyamatokban is. Munkánk során kimutattuk, hogy mellékvesekéreg daganatokban és a legkülönbözőbb glükokortikoid érzékeny szövetekben glükokortikoidok hatására megváltozott Wnt jelátvitelt – legalább részben – miRNS-ek közvetítik. Kísérletünkben három modellt alkalmaztunk a miRNS-profilalkotás céljából. Vizsgáltuk a

miRNS-expressziós mintázat változását a hormonálisan aktív Cushing-szindrómás betegekből nyert kortizoltermelő mellékvesekéregdaganatokban a normál mellékveseszövetekhez képest. Ezután megvizsgáltuk a miRNS-expresszió változását dexametazon-kezelés előtt és után szteroidtermelő mellékvesekéreggrák (H295R) sejtekben és hormonálisan inaktív (hormont nem termelő) HeLa sejtekben (amely, egy gyakran használt, releváns sejt vonal a glükokortikoidokkal kapcsolatos hatások tanulmányozásában, mivel epitheloid eredetű, és expresszálja a glükokortikoid-receptort [24-29]). Eredményeinket glükokortikoid termelő és érzékeny humán szövetekből származó független adatszetten validáltuk.

IV.1.4.1. miRNS-profil eltérések glükokortikoid hatásra a három vizsgált modellben

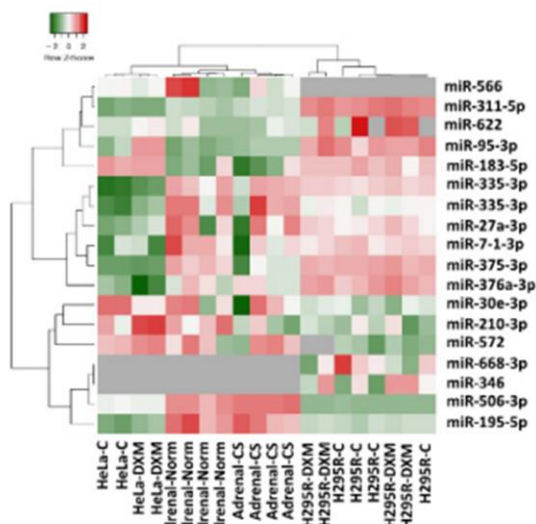
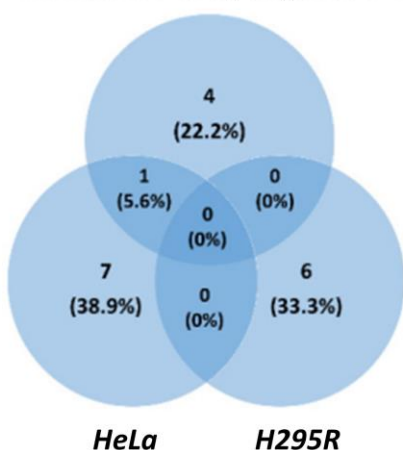
Mindhárom modellben 265 egyedi miRNS expresszióját mértük, melyek közül a mellékvesekéregdaganat szövetekben 5 miRNS, a H295R és HeLa sejtekben 6, illetve 8 miRNS expressziója mutatott statisztikailag szignifikáns változást (**34A ábra**). A mellékvesedaganat mintákban eltérően kifejeződő miRNS-ek többek között a biotin-metabolizmust, az inzulinszignalizációt, az adipocitokin útvonalat, a Wnt- és a TGF β szignalizációt regulálták. A HeLa sejtekben a miRNS-ek dexametazon kezelésre a PI3K-Akt/mTOR, Wnt és TGF β , a H295R sejtekben a „Focal adhesion”, a „Wnt signaling” és az „ErbB signaling” jelátviteli útvonalakra voltak hatással. Annak ellenére, hogy a három modell között nem voltak közös, eltérően expresszálódó miRNS-ek, figyelemre méltó átfedés volt megfigyelhető az ezen miRNS-ek által befolyásolt útvonalak tekintetében. Tizenöt útvonal (az összes 19,5%-a) volt általánosan érintett mindhárom modellünkben (**34B ábra**), melyek közül a Wnt-útvonal adódott statisztikailag a legfontosabbnak, amely jelentős szerepet játszik a glükokortikoid hatásának közvetítésében (**34B. ábra, 11. táblázat**).

34. Ábra. Glükokortikoid hatásra eltérően expresszálódó miRNS-ek és az általuk befolyásolt jelátviteli útvonalak. Mellékvesekéreg daganat szövetekben 5 miRNS mutatott szignifikánsan megváltozott expressziót a normál mellékvese szövetekhez képest, a H295R és HeLa sejtekben 6, illetve 8 miRNS expressziója mutatott statisztikailag szignifikáns változást. A kísérletek között csak egyetlen közös miRNS megváltozott expresszióját mutattuk ki: a miR-95-3p-t kortizoltermelő adenomákban és HeLa sejtekben (A). Ennek ellenére a külön kísérletekben azonosított különböző miRNS-ek által szabályozott jelentős jelátviteli útvonalak 19,5%-a közös volt (B). C: kontrol; DXM: dexametazon, Adrenal-CS: kortizol termelő mellékvesekéreg daganat

A

Eltérően kifejeződő miRNS-ek

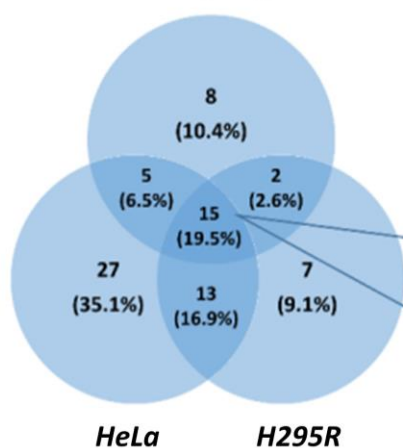
Mellékvesekéreg daganat szövet



B

miRNS-ek által szabályozott jelátviteli útvonalak

Mellékvesekéreg daganat szövet



Wnt signaling pathway
MAPK signaling pathway
TGF-beta signaling pathway
Biotin metabolism
Insulin signaling pathway
Gap junction
Chronic myeloid leukemia
Glutamergic synapse
Gastric acid secretion
Neurotrophin signaling pathway
ErbB signaling pathway
Pathways in cancer
Regulation of actin cytoskeleton
mTOR signaling pathway
Focal adhesion

11. táblázat. Glükokortikoid hatásra eltérően expresszálódó miRNS-ek a három modellben, és kapcsolatuk a Wnt-útjával. *: irodalomban leírt, validált célgénnek **: útjával elemzés alapján a Wnt-jelátvitel a legszignifikánsabb útvonalak között van. A log2RQ jelzi az expressziós változás irányát és mértékét

miRNS név	log2RQ	p-érték	Kapcsolat a Wnt-jelátvitellel
Kortizoltermelő adenóma vs. normális mellékveseszövet			miRNS-szabályzott gén(ek)*
hsa-miR-375-3p	-3,18283	0,002756	LRP5 és β -katenin
hsa-miR-566	-2,0934	0,012993	WNT6
hsa-miR-95-3p	0,435871	0,014638	DKK3
hsa-miR-506-3p	1,96571	0,021431	TCF3
hsa-miR-210-3p	-1,18389	0,038611	WNT7b, FZD5, Sclerostin
Dexametazon kezelt HeLa sejtek vs. kontroll			miRNS-szabályzott gén(ek)*
hsa-miR-183-5p	0,203726	0,037677	LRP6, DKK3
hsa-miR-195-5p	1,355332	0,043846	LRP6, WNT3A

henriettbutz_199_24

hsa-miR-26a-5p	1,321971	0,020827	SOSTDC1, Wnt5a, GSK3 β
hsa-miR-30e-3p	-0,86986	0,02123	LRP6
hsa-miR-335-3p	1,586908	0,045771	RUNX2
hsa-miR-572	1,58437	0,042381	útvonalelemzés**
hsa-miR-622	3,287344	0,03071	útvonalelemzés**
hsa-miR-95-3p	2,307738	0,040524	DKK3
Dexametazon kezelt H295R sejtek vs. kontroll		miRNS-szabályzott gén(ek)*	
miR-331-5p	2,14926	0,018581	nincs irodalmi adat
miR-7-1-3p	-0,25662	0,004913	TCF4, TCF12, TCF7L2
miR-27a-3p	0,457272	0,010971	DKK2
miR-346	0,921683	0,017707	GSK3 β
miR-376a-3p	0,581655	0,034872	útvonalelemzés**
miR-668-3p	-0,56929	0,041363	nincs irodalmi adat

WNT3A, WNT5A, WNT6, WNT7b (Wnt Family Member 3A, 5A, 6, 7B): szekretált WNT ligandok; FZD5 (Frizzled Class Receptor 5), LRP5, LRP6 (LDL Receptor Related Protein 5, 6): WNT receptorok; DKK2, DKK3 (Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor2, 3): WNT inhibitorok; SOSTDC1 (Sclerostin Domain Containing 1): WNT aktivátor az LRP4,5,6 receptorokkal való kölcsönhatásán keresztül; GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase 3 Beta): protein kináz, amely az APC, AXIN, CTNNB1 fehérjékkel képez komplexet, WNT jelátvitel mediator; TCF3, 4, 12, TCF7L2 (Transcription Factor 3, 4, 12, Transcription Factor 7 Like 2): A LEF1 transzkripciósfaktorral együtt közvetítik a WNT szignált a sejtmagban.; RUNX2 (RUNX Family Transcription Factor 2): WNT jelátvitelben másodlagos hírvívó

IV.1.4.2. WNT útvonal eltérések a glükokortikoid-termelő és glükokortikoid célszervek/szövettípusokban

Kortizol termelő daganattal rendelkező betegekből származó mellékvesekéreg és glükokortikoid célszövetek (primer csont, szinoviális fibroblaszt, szubkután és omentális zsírszövet, bőr, hipokampusz és hipotalamusz) transzkriptom-változásait elemeztük glükokortikoid hatására. A módosult expressziójú gének száma a szövettípusoktól függően 1125 és 6809 között változott. Míg a glükokortikoidok mérsékelt hatást gyakoroltak a globális transzkriptom-változásokra a glükokortikoid-termelő mellékvesekéreg daganatban (az összes profilozott gén 4-8%-a változott); a célszövetekben a gének nagyjából 10-20%-ában észleltünk jelentős változást. A glükokortikoid kezelés hatására eltérően expresszálódó gének génkészlet-dúsulási elemzése során a biológiai folyamatok közül a Wnt-szignalizáció minden szövettípusban jelentős változást mutatott (12. táblázat).

12. táblázat. A Wnt jelátvitel szignifikánsan megváltozik glükokortikoid hatására minden kísérletben

GC célszövet típusának génexpressziója	# DEG-k száma (p<0,05)	a WNT útvonal tagjainak aránya*	# érintett BP	# A WNT jelátvitellel kapcsolatos érintett BP-k száma**
emberi csontszöveti biopsziák CS betegekből, a műtét előtt és 3 hónappal a műtét után	1423	14/151	312	4
humán primer oszteoblaszt sejtek kontroll vs. dex	5343	52/151	1573	11
humán primer csontblaszt-szerű sejtek (HObS) csont explantátumból kontroll vs. dex	7279	53/151	1164	6
humán primer szinoviális fibroblasztok kontroll vagy dex	10	8/151	880	41

henriettbutz_199_24

humán primer hasi szubkután zsírszövetek kontroll vs. dex	4276	37/151	2644	16
humán primer hasi omentális zsírszövetek kontroll vs. dex	3787	32/151	2422	6
humán primer epidermális keratinociták kontroll vs. dex	1130	13/151	1753	7
sértés hipokampusz szövetei kontroll vs. im. dex kezelt	2403	34/151	1913	10
sértés hipotalamuszövet kontroll vs. im. dex kezelt malacok	2661	33/151	1850	11

DEG: eltérően kifejeződő gén (differentially expressed gene, DEG), BP: biológiai folyamat (génontológia kategória, biological process)

A Wnt-szignalizációban részt vevő gének részletes elemzése során az útvonal tagjainak magas aránya mutatott jelentős génexpressziós változást. Emellett a Wnt jelátvitel miRNS-ek általi szabályozása akkor is szignifikáns maradt, amikor az analízisbe csak olyan miRNS-eket vontunk be, amelyek a glükokortikoid hatásra legalább 6 különböző vizsgálatban egyöntetűen eltérést mutattak (**13. táblázat**).

13. táblázat. WNT jelátvitel 6 különböző vizsgálatban mért miRNS változásainak génkészlet dúsulási eredményeként is szignifikáns maradt

GO-ID	GO-BP kategória megnevezése	p-érték	q-érték FDR B&H	Gének száma a génlistában	Hit Count in Genome	Hit in Query List
GO:0090090	<i>negative regulation of canonical wnt signaling pathway</i>	0,00362	0,03835	6	190	FOXO3, FZD4, DACT1, DKK1, TLE1, SNAI2

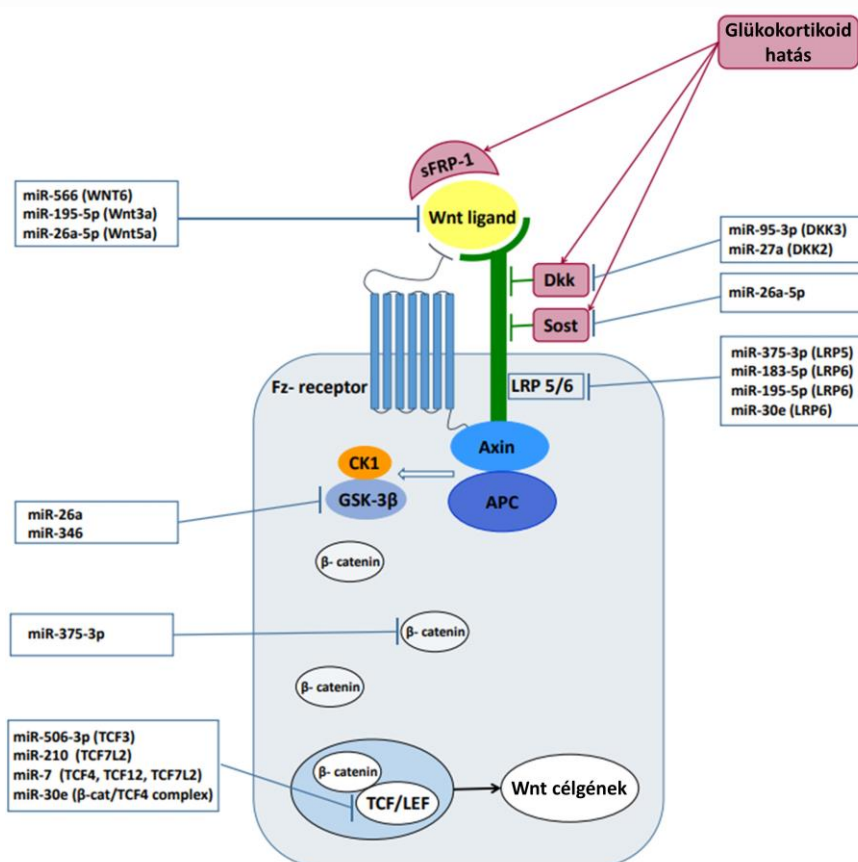
GO-BP: gén ontológia biológia folyamat (Biological Process); FDR & BH: Benjamini-Hochberg False discovery rate korrekció; FOXO3: Forkhead Box O3; FZD4: Frizzled Class Receptor 4; DACT1: Dishevelled Binding Antagonist Of Beta Catenin 1; DKK1: Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1; TLE1: TLE Family Member 1, Transcriptional Corepressor; SNAI2: Snail Family Transcriptional Repressor 2

Megbeszélés. In vitro adataink azt mutatták, hogy a glükokortikoidok valóban jelentős hatást gyakorolnak a miRNS-expressziós mintázatra minden vizsgált sejttípus esetében. Az érintett miRNS-ek számos jelátviteli utat érintenek, de legnagyobb mértékben a Wnt-szignalizációt befolyásolják. Analízisünkben egyaránt vizsgáltunk glükokortikoidokat termelő daganatokat és sejteket, valamint glükokortikoid célszöveteket, melyek miRNS analízise lehetőséget biztosított a kísérleteinkben azonosított eltérően kifejeződő miRNS-ek Wnt-jelátviteli útvonalra gyakorolt hatásának összefoglalására (**35. ábra**).

Eredményeink alapján a glükokortikoid termelő mellékvesekéreg daganatokban is valamelyest megmarad a glükokortikoidok visszacsatoló hatása a miRNS-expresszióra, de a glükokortikoidokra érzékeny szöveteken (Cushing-betegekből származó csontszövet, valamint glükokortikoid hatás alatt álló primer csont-, szinoviális fibroblaszt-, szubkután és omentális zsírszövet, bőr és agysejtek) a glükokortikoidok által szabályozott transzkriptom arány a szövettípusoktól függ.

Mivel a Wnt jelátvitelre összpontosítottunk, három megközelítéssel vizsgáltuk a teljes transzkriptom változásaiban való részvételét: (i) a globális génexpressziós profil génkészlet-dúsulási elemzés, ii) szűkített, legalább 6 különböző tanulmányban közösen megváltozott génprofil elemzés és iii) a Wnt-út vonal célzott analízise. Minden megközelítésben a Wnt-szignalizáció szignifikáns változását mutattuk ki glükokortikoid hatásra és emellett számos olyan miRNS-t azonosítottunk, amely ebben az útvonalban szerepet játszik. Bár a különböző modellekben a miRNS profil változása sejt/szövetspecifitást mutatott, érdekes módon az általuk szabályozott funkciók redundánsak voltak, és közöttük első helyen a Wnt jelátvitel szerepelt.

35. ábra. Wnt-út vonalat szabályozó miRNS-ek



A Wnt jelátvitelt befolyásoló miRNS-ek funkciói. A glükokortikoidok hatására megváltozott miRNS-ek lehetséges funkciójára nézve az irodalmi adatok azt sugallják, hogy a Wnt-szignál a sejtproliferációval és differenciálódással, és tumorigenezissel hozhatók összefüggésbe. A MiR-506-3p, amely a normál szövetekhez képest a Cushing-adenomákban fokozottan expresszáldott, neurális őssejtekben növelte a sejtek differenciálódását és csökkentette a proliferációjukat a Wnt/β-katenin út vonal befolyásolásán keresztül, a TCF3 célzott szabályozásával. [33]. A miR-195-5p az LRP6 és WNT3A fehérje expressziójának regulációja által gátolta a differenciációt [199, 200]. A tumorigenezisben való szerepre jó példa a mellékvese Cushing daganataiban, mint magas glükokortikoid koncentrációjú környezetben, a miR-566 csökkent expressziója. Emlőrák szövetekben ennek a miRNS-nek az alacsony expressziója nagyobb tumorméretre, előrehaladott tumor grádusra és a

nyirokmetasztázisok gyakoribb előfordulására hajlamosított [201]. A miR-566 fontos láncszemet jelent ebben a folyamatban azáltal, hogy a WNT6-ot célozza és megakadályozza a rosszindulatú progressziót emlőrákos betegeknél [201]. A miR-95-3p, amelynek szintje prosztata karcinóma szövetekben emelkedett, elősegítette a daganatos sejtek proliferációját, migrációját és invázióját a DKK3 elnyomása révén [202]. A miR-183-5p expressziója fokozott vastagbél-daganatokban a normál szövetekhez képest, Wnt-szabályozásban betöltött szerepét funkcionális miRNS-gátlási kísérletekkel bizonyították [203, 204].

Adataink alapján a különböző szövetekben eltérő miRNS-expressziós mintázat figyelhető meg a glükokortikoidok hatására, azonban ezek az eltérően expresszálandó miRNS-ek hasonló biológiai folyamatokat szabályoznak a különböző szövetekben, egyik legfontosabb mediátoruk pedig a Wnt-szignalizáció.

IV.2. miRNS-ek, mint potenciális extracelluláris biomarkerek vizsgálata

IV.2.1. Vizelet exoszómális miRNS-ek azonosítása, mint diagnosztikus biomarkerek és parakrin mediátorok világossejtes veserákban

A világossejtes veserák (ccRCC) diagnózisának megerősítésére az invazív biopszián kívül jelenleg nincs más eszköz, ezért fontos klinikai és kutatási kérdés, hogy a vizelet miRNS-ek biomarkerként szolgálhatnak-e a ccRCC diagnózisának megerősítésére.

IV.2.1.1. A vizelet miRNS-ek képesek elkülöníteni a ccRCC betegeket az egészséges egyénektől

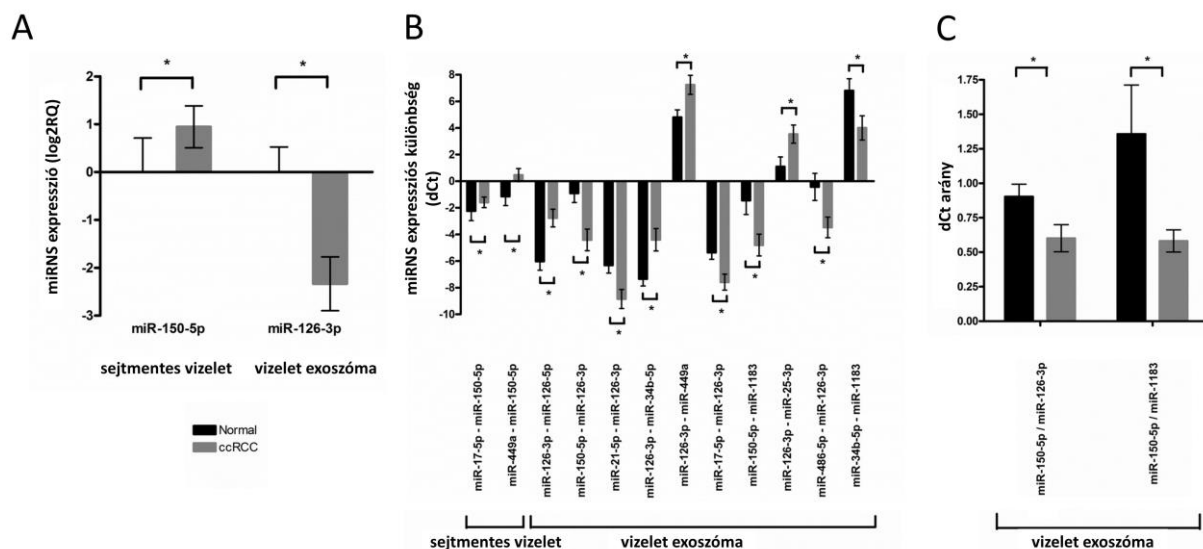
Első szűrési lépésként 754 miRNS expresszióját hasonlítottuk össze a ccRCC betegek preoperatív és egészséges személyek vizeletében. A ccRCC-szövetmintákról korábban közzétett miRNS-mikroarray adataink és irodalmi adatok alapján kiválasztottunk 48 olyan miRNS-t, amelyek potenciális diagnosztikai markerként hasznosíthatók.

A felfedező fázisban 28, szövettanilag igazolt ccRCC-ben szenvedő beteg és 18 egészséges személy műtét előtti vizeletét vizsgáltuk e 48 miRNS kifejeződésére egyedi tervezésű miRNS TaqMan-array segítségével. A sejtmentes és exoszómális miRNS-eket külön-külön vizsgáltuk. A sejtmentes miRNS-eket használva csak a miR-150-5p volt szignifikánsan felülreprezentált a ccRCC-ben a normális mintákhoz képest (log2RQ: 2,39, $p=0,030$) (**36A ábra**), azonban a ROC (Receiver Operating Characteristics) analízisben nem ért el a statisztikai szignifikanciát a két csoport között (AUC:0,66, 95CI:0,4914-0,8260, $p=0,058$). Az exoszómális miRNS-ek expresszióját mérve a miR-126-3p szignifikánsan csökkent mennyisége volt kimutatható (-5,05-szörös változás) (**36A ábra**), emellett képes volt elkülöníteni a ccRCC és a kontroll csoportokat (AUC:0,74, 95CI:0,5948-0,8880, $p=0,004$).

A jobb diszkrimináció érdekében a továbbiakban miRNS kombinációkat vizsgáltunk. A sejtmentes miRNS-ek esetében két kombináció volt képes pontosan megkülönböztetni a normál vizeletet a ccRCC-s betegek mintáitól (**36B ábra**). Az exoszómális miRNS-ek ROC-elemzése alapján

két miRNS kombinációja akár 86%-os szenzitivitást és 85%-os specificitást is képes produkálni, az AUC pedig elérte a 0,77-et.

36. ábra. (A) A miR-150-5p nagyobb mennyiségben van jelen a ccRCC-ben szenvedő betegek vizeletében az egészséges egyénekhez képest. (B-C) Az eltérően expresszált miRNS dCt különbségek/arányok sejntmentes vizelet RNS-ben és exoszomális RNS-ben ccRCC-s betegeknél és egészséges egyéneknél



Mivel a korai tumoros betegek (kis méretű daganat, small renal mass, SRM; ≤ 4 cm) diagnosztikai kihívást jelentenek, megvizsgáltuk a miRNS-ek az SRM-ek elkülönítésére való képességét. A miR-126-3p-t az SRM ccRCC-minták vizeletében szignifikánsan alacsonyabbnak találtuk (log2RQ: -5,2, $p=0,012$), és képes volt elkülöníteni az SRM-es (≤ 4 cm) betegek vizeletmintáját az egészséges mintáktól (AUC:0,74, 95CI: 0,5948-0,8880, $p=0,004$). Két miRNS különböző kombinációit használva 8 dCt-különbséget és 2 dCt-arányt generáltunk a szignifikánsabb diszkriminációhoz (14. táblázat).

Table 14. Vizeletből izolált exoszómális miRNS kombinációk ROC analízise

	Felfedező kohorsz							Validációs kohorsz					
ccRCC vs. egészséges kontroll													
miRNS kombináció	AUC	95%CI	p-érték	cut off	szenzitivitás	specificitás	AUC	95%CI	p-érték	cut off	szenzitivitás	specificitás	
miR-126-3p - miR-126-5p	0,77	0,6376 - 0,9021	0,0010	> -5,5	72,4	70,0	0,77	0,6703 - 0,8633	< 0,0001	> -2,9	70,0	75,9	
miR-150-5p - miR-126-3p	0,77	0,6316 - 0,9064	0,0010	< -1,8	72,4	80,0	0,76	0,6639 - 0,8551	< 0,0001	< 0,2	67,5	72,4	
miR-21-5p - miR-126-3p	0,77	0,6176 - 0,9031	0,0020	< -6,9	72,4	75,0	0,64	0,5363 - 0,7465	0,0245	< -6,9	70,0	55,2	
miR-126-3p - miR-34b-5p	0,75	0,6141 - 0,8928	0,0028	>-7,7	82,8	65,0	0,79	0,7013 - 0,8815	< 0,0001	> -3,4	77,5	72,4	
miR-126-3p - miR-449a	0,75	0,6080 - 0,8989	0,0028	> 5,1	82,8	70,0	0,84	0,7620 - 0,9151	< 0,0001	> -3,5	83,8	62,5	
miR-150-5p / miR-126-3p	0,75	0,6112 - 0,8853	0,0034	< 0,6	65,5	80,0	0,76	0,6646 - 0,8613	< 0,0001	< 1,1	67,5	75,9	
miR-150-5p / miR-1183	0,74	0,6009 - 0,8784	0,0047	< 0,9	86,2	55,0	0,63	0,5157 - 0,7403	0,0417	< 1,3	46,3	82,8	
miR-17-5p - miR-126-3p	0,72	0,5689 - 0,8656	0,0104	< -5,5	72,4	55,0	0,71	0,6167 - 0,8117	0,0007	< -4,2	70,0	65,5	
miR-150-5p - miR-1183	0,71	0,5551 - 0,8587	0,0147	< -0,1	86,2	55,0	0,63	0,5168 - 0,7366	0,0439	< 1,1	51,3	79,3	
miR-126-3p - miR-25-3p	0,71	0,5547 - 0,8556	0,0155	> 2,4	62,1	85,0	0,66	0,5552 - 0,7612	0,0119	> 2,6	52,5	86,2	
miR-486-5p - miR-126-3p	0,69	0,5438 - 0,8424	0,0228	< -1,4	72,4	60,0	0,78	0,6739 - 0,8803	< 0,0001	< -0,1	81,3	62,5	
miR-34b-5p - miR-1183	0,67	0,5169 - 0,8245	0,0441	< 7,7	69,0	65,0	0,72	0,6174 - 0,8136	0,0006	< 4,1	67,5	69,0	
ccRCC < 4cm vs. egészséges kontroll													
miRNS kombináció	AUC	95%CI	p-érték	cut off	szenzitivitás	specificitás	AUC	95%CI	p-érték	cut off	szenzitivitás	specificitás	
miR-150-5p - miR-1183	0,79	0,6431 - 0,9436	0,0034	< -1,5	86,7	70,0	0,60	0,4635 - 0,7313	0,1696	< 0,9	45,0	82,8	
miR-150-5p / miR-1183	0,79	0,6342 - 0,9391	0,0042	< 0,8	86,7	65,0	0,64	0,5051 - 0,7673	0,0548	< 1,4	60,0	62,1	
miR-150-5p - miR-126-3p	0,78	0,6130 - 0,9404	0,0057	< -1,4	86,7	70,0	0,77	0,6616 - 0,8815	0,0001	< 0,1	72,5	75,9	
miR-34b-5p - miR-1183	0,75	0,5758 - 0,9175	0,0137	< 7,6	80,0	65,0	0,70	0,5728 - 0,8186	0,0058	< 4,6	70,0	62,1	
miR-150-5p / miR-126-3p	0,74	0,5607 - 0,9127	0,0180	< 0,6	66,7	80,0	0,77	0,6616 - 0,8815	0,0001	< 0,1	72,5	75,9	
miR-126-3p - miR-34b-5p	0,73	0,5413 - 0,9087	0,0245	> -7,6	80,0	65,0	0,79	0,6848 - 0,8980	< 0,0001	> -3,4	77,5	72,4	
miR-21-5p - miR-126-3p	0,71	0,5188 - 0,9012	0,0358	< -6,9	73,3	75,0	0,65	0,5162 - 0,7804	0,0366	< -7,4	65,0	65,5	
miR-486-5p - miR-126-3p	0,70	0,5291 - 0,8776	0,0421	< -1,4	73,3	60,0	0,75	0,6246 - 0,8712	0,0010	< -0,1	77,5	62,5	
miR-17-5p - miR-126-3p	0,70	0,5074 - 0,8860	0,0493	< -7,1	53,3	90,0	0,76	0,6461 - 0,8746	0,0002	< -4,8	72,5	72,4	
miR-126-3p - miR-449a	0,68	0,4785 - 0,8748	0,0774	> 5,1	73,3	70,0	0,89	0,8110 - 0,9682	< 0,0001	> -2,2	77,5	91,7	

IV.2.1.2. A vizelet miRNS-ek validálása független kohorszon

Eredményeinket 81 ccRCC-beteg, 24 jóindulatú vesedaganatos beteg és 33 normál személy független csoportján validáltuk, egyedi RT-qPCR-reakciókat alkalmazva miRNS-specifikus primerekkel. Validálási eredményeink nagyon hasonlóak voltak a kezdeti felfedező kohorszon mértekhez. Például a miR-126-3p hasonló mintázatot mutatott a ccRCC-ben az alulreprezentáltság tekintetében, mint a normál esetben, jelentős diszkriminációs erővel (AUC:0,65; 95CI:0,5329-0,7645, $p=0,018$). Két miRNS kombinációját használva akár 0,84-es AUC értéket is el tudtunk érni. A modellek érzékenysége elérte a 84%-ot, a specificitás pedig a 83%-ot. A miRNS-kombinációink hasznosak voltak a kis méretű daganatokkal (SRM, ≤ 4 m) rendelkező betegek egészségesektől való elkülönítésében is (14. táblázat).

Amikor a tumorok teljes populációját (mind a ccRCC, mind a jóindulatú vesedaganatok) összehasonlítottuk az egészséges személyekkel, modellünk képes volt különbséget tenni a két csoport között. A miRNS-ek szintén szignifikánsan eltérő expressziót mutattak a normál vizelet és a jóindulatú vesedaganatos betegek között (15. táblázat). A miR-126-3p, miR-34b-5p, miR-150-5p, miR-449a és miR-486-5p kombinációi adták a legjobb megkülönböztetést a legtöbb csoportban (15. táblázat). Egy miRNS-kombináció (miR-17-5p és miR-25-3p) szignifikánsan eltérő expressziót mutatott a jóindulatú vesedaganatok és a ccRCC között ($p=0,026$; specificitás: 87,5%). A miR-17-5p és a miR-21-5p aránya szintén képes volt megkülönböztetni a jóindulatú daganatokat a SRM-ektől (15. táblázat).

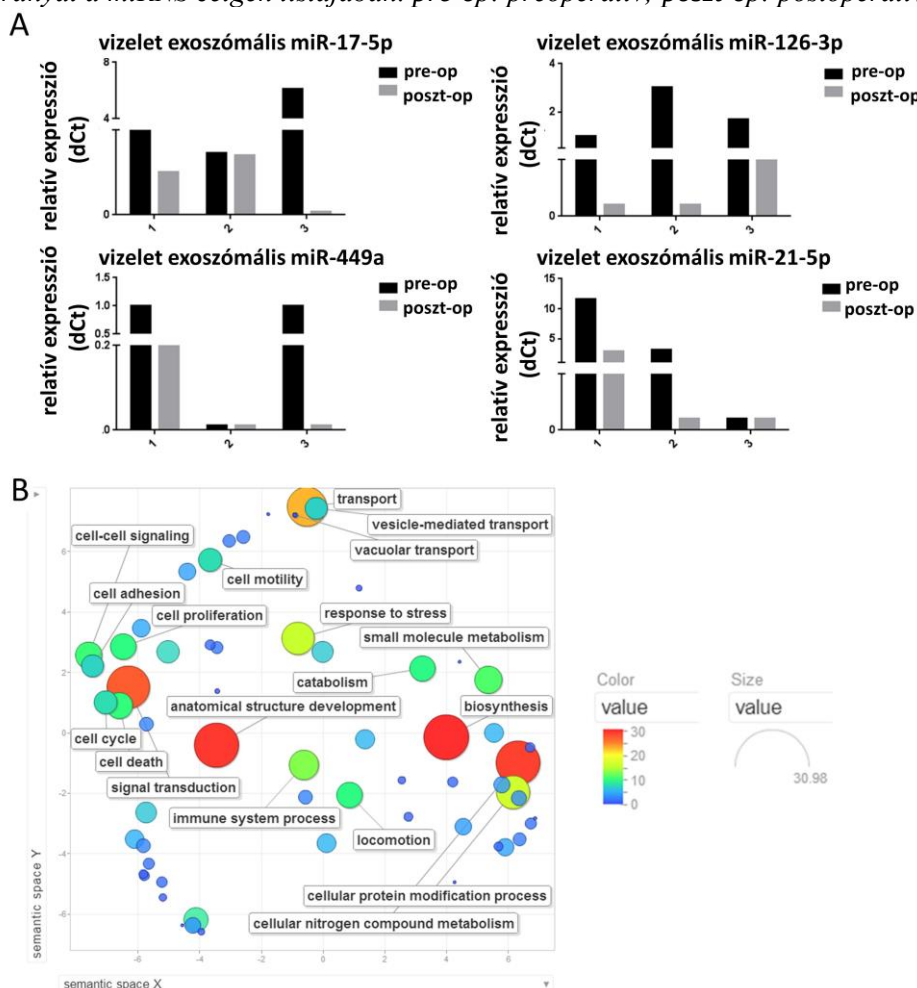
15. táblázat. A miRNS-ek diszkriminatív képessége az egészséges személyek és a jó-, illetve rosszindulatú vesedaganatos betegek között – validációs kohorsz eredményei

miRNS kombináció	AUC	95%CI	p-érték	cut off	szenzitivitás	specificitás
vesedaganat (jó és rosszindulatú) vs. egészséges kontrol						
miR-126-3p-miR-449a	0,82	0,7492 - 0,8974	< 0,0001	> -1,8	60,6	100,0
miR-126-3p-miR-34b-5p	0,80	0,7132 - 0,8823	< 0,0001	> -2,4	67,3	82,8
miR-126-3p-miR-486-5p	0,79	0,6958 - 0,8899	< 0,0001	> 0,8	52,9	95,8
miR-25-3p-miR-34b-5p	0,76	0,6656 - 0,8530	< 0,0001	> -4,9	73,1	79,3
miR-21-5p-miR-34b-5p	0,76	0,6685 - 0,8494	< 0,0001	> -10,5	74,0	72,4
miR-150-5p / miR-126-3p	0,76	0,6645 - 0,8528	< 0,0001	< 0,9	61,5	82,8
jóindulatú vesedaganat vs. egészséges kontrol						
miR-126-3p-miR-486-5p	0,85	0,7295 - 0,9615	< 0,0001	> 0,7	75,0	87,5
miR-126-3p-miR-34b-5p	0,82	0,7036 - 0,9343	< 0,0001	> -2,2	75,0	82,8
miR-21-5p-miR-34b-5p	0,77	0,6421 - 0,9067	0,0006	> -10,5	79,2	72,4
miR-126-3p-miR-449a	0,77	0,6342 - 0,9110	0,0012	> -1,8	58,3	100,0
miR-17-5p-miR-34b-5p	0,77	0,6386 - 0,8988	0,0008	> -6,3	70,8	72,4
miR-25-3p-miR-34b-5p	0,76	0,6183 - 0,8961	0,0014	> -4,8	75,0	79,3
miR-34b-5p-miR-1183	0,75	0,6168 - 0,8889	0,0017	< 4,7	75,0	62,1
jóindulatú vesedaganat vs. ccRCC						
miR-17-5p-miR-25-3p	0,65	0,5381 - 0,7609	0,0269	< -2,8	48,8	87,5
jóindulatú vesedaganat vs. ccRCC < 4cm						
miR-17-5p / miR-21-5p	0,70	0,5658 - 0,8300	0,0084	> 0,2	47,5	87,5
miR-17-5p-miR-25-3p	0,68	0,5456 - 0,8065	0,0191	< -2,8	52,5	87,5

IV.2.1.3. A vizelet miRNS-ek eredetének és funkciójának vizsgálata klinikai és in vitro mintákon

Annak további vizsgálatára, hogy a miRNS-expresszióban bekövetkező változások összefüggésben vannak-e a daganat jelenlétével, kiválasztottuk a miR-126-3p, 449a, miR-17-5p és miR-21-5p-t, és egy pilot vizsgálat keretében elemeztünk három pár, ugyanattól a betegtől származó műtét előtti és utáni vizeletmintát. Eredményeink azt mutatták, hogy a miRNS-szintek a műtét után a normálshoz hasonló szintre tértek vissza (37A ábra).

37. ábra. (A) A miR-126-3p, miR-449a, miR-17-5p és miR-21-5p expressziója pre- és posztoperatív vizelet exoszómákban három betegnél. (B) A ccRCC betegek vizelet exoszómájából kivont öt legjelentősebb miRNS várható célpontjainak funkcionális elemzése. A kifejezések a "Biological Processes" génontológiai (GO) kategóriáit képviselik. A színek és méretek jelzik a GO kifejezés használatának százalékos arányát a miRNS célgén listájában. pre-op: preoperatív; poszt-op: postoperatív.

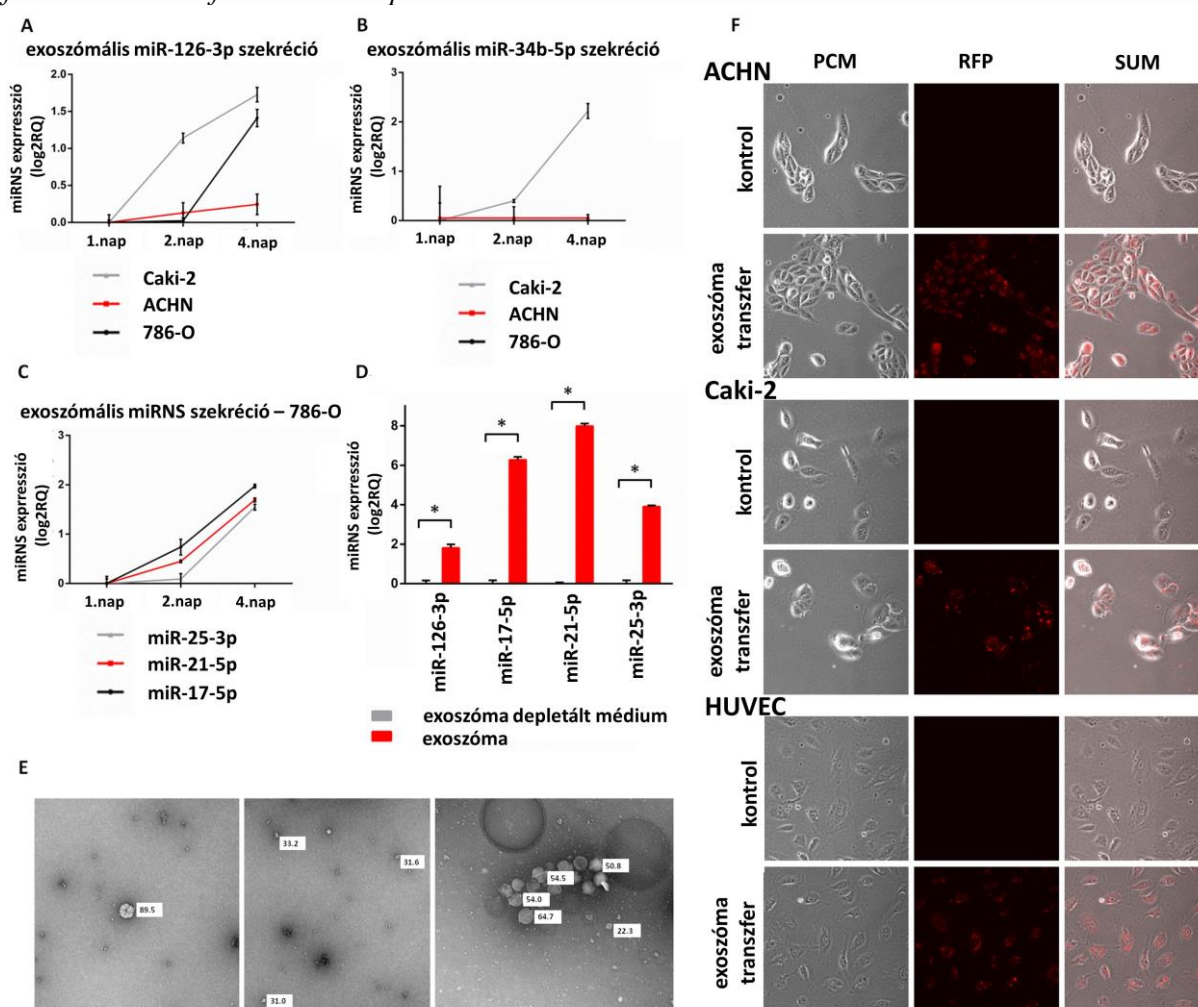


A vizelet miRNS-ek hatásának analizéséhez a ccRCC patogenezisében, 5 olyan miRNS lehetséges funkcióját vizsgáltuk, amelyek kombinációja a legjobb megkülönböztetést tette lehetővé a mintacsoportok között (miR-126-3p, miR-34b-5p, miR-150-5p, miR-449a és miR-486-5p). E miRNS-ek leginkább a sejtciklus, sejtprolifерáció, adhézio és angiogenezis folyamatait regulálták (37B ábra), mely egyértelműen jelzi e miRNS-ek aktív részvételét a ccRCC patogenezisében, és rámutat arra, hogy aktívan szekréciónal ürülnek a vizeletbe.

henriettbutz_199_24

Következő lépésben *in vitro* vizsgáltuk az exoszómális miRNS-ek szekrécióját a tápfolyadékba, és ezek internalizációját más veserák és endotél sejtekre. Primer 786-O és metasztatikus ACHN és Caki-2 sejtvonalakat tenyésztettünk, majd exoszómális RNS-t vontunk ki a tenyésztő tápfolyadékból, melyben profiloztuk azt a 10 kiválasztott miRNS expresszióját, amelyet a validációs készlethez használtunk betegmintákban. Mindhárom sejtvonal szekretált miR-126-3p-t a médiumba (**38A. ábra**). miR-34b-5p-t csak a metasztatikus Caki-2, miR-17-5p, -21-5p és -25-3p-t pedig csak a primer 786-O sejtek választottak el a médiumba (**38B-C. ábra**). Ezek a miRNS-ek kimutathatóak voltak az exoszómafrakcióban az exoszóma-mentesített médiumhoz képest, ami az exoszómákon keresztül történő aktív szekrécióra utal (**38D ábra**).

38. ábra. A szekretált exoszómális miR-126-3p (A) és miR-34b-5p (B) expresszió a három vesesejtes karcinóma (RCC) sejtvonal sejtenyésző közegében. (C) A 786-O RCC sejtek exoszómális miR-25-3p, miR-21-5p és miR-17-5p-t szekréciója a sejtenyésző médiumba az idő függvényében. (D) Négy kiválasztott miRNS jelenléte a sejtvonalak tápoldatának exoszómás komponensében, ellentétben a sejtmentes tápoldathoz képest. * $p < 0,05$. (E) Exoszómák elektronmikroszkópos felvételei tipikus morfológiával és mérettel (20–100 nm). A számok nanométereket jeleznek. (F) A 786-O által szekretált exoszómális egyszálú RNS molekulák (vörös fluoreszcens festéssel megfestve) 24 óra elteltével internalizálódtak az ACHN, Caki-2 és HUVEC endotél sejtekbe. Minden kísérlet háromszor végeztünk. HUVEC: humán köldökvénás endothel sejtek (human umbilical vein endothelial cells); RFP: vörös fluoreszkáló protein (red fluorescent protein); PCM: fázis kontraszt (phase contrast microscopy); SUM: fázis kontraszt és fluoreszcens képek összeolvasztása



Ezt követően tanulmányoztuk, hogy a miRNS-ek szerepet játszhatnak-e a sejt-sejt kommunikációban. 786-O sejtek által szekretált exoszómákat izoláltuk és az exoszómák szerkezetét és méretét elektronmikroszkópiával ellenőriztük (**38E ábra**). Az exoszómális miRNS-ek jelölése után az ACHN és Caki-2 RCC sejtvonalak és HUVEC endotél sejtek tápfolyadékába juttattuk őket. 24 óra elteltével a recipiens sejtek által internalizált exoszómális RNS-t detektáltuk (**38F ábra**). Ezek az eredmények a tumorsejtek között, valamint a tumor és az endotélsejtek közötti miRNS-közvetített kommunikáció jelenlétére utalnak világossejtes veserákban.

Megbeszélés. Eredményeink azt mutatják, hogy a vizelet miR-126-3p és miR-449a kombinációja nagy érzékenységgel képes különbséget tenni a normál egyének és a ccRCC betegek között. Ez megnyitja annak lehetőségét, hogy a vizelet miRNS-eket noninvazív biomarkerként használják a ccRCC-ben, és hogy a vizelet miRNS-vizsgálat akár az invazív biopsziát is helyettesíthesse a jövőben. Különösen hasznos lehet az egyéb társbetegségekkel küzdő idős betegek esetében, akik nem alkalmasak biopsziára. Jelenleg minden betegnél invazív biopsziára van szükség a ccRCC diagnózisának megerősítéséhez. A jelenlegi érzékenységgünkkel a betegek ~85%-ának megspórolható az invazív biopszia szükségessége. A fennmaradó betegeknél, beleértve azokat is, akiknek nincs tumoruk, és azokat is, akiknél hamis negatív eredményt kapnánk, továbbra is biopsziát kellene végezni az elváltozás jellegének megerősítésére. Adataink alapján a miRNS-mintázat a vizeletben nemcsak a nagy, hanem a kis daganatok (≤ 4 cm, SRM) kimutatására és elkülönítésére is alkalmas. Ez rendkívül fontos a klinikai gyakorlatban, biztosítva egy nem invazív biomarkert, akár a kis méretű vesedaganatok nyomonkövetésére is. A specifikus miRNS kombinációk további validálás után, akár diagnosztikai tesztként történő alkalmazásukra is sor kerülhet.

Adataink összhangban vannak egy, a munkánkkal nagyjából egyidőben végzett vizsgálattal, amely arról számolt be, hogy a miR-15a szignifikánsan nagyobb mennyiségben volt jelen RCC betegek vizeletében [205]. Ez a tanulmány azonban különbözik a jelen vizsgálatunktól abban, hogy különböző RCC altípusokat analizált. Egy másik tanulmány a vizelet exoszómális fehérjéinek LC-MS/MS-sel történő elemzése 10 fehérjéből álló mintázatot azonosított, amely eltérően fejeződött ki a normál egyének és az RCC betegek vizelete között [206].

Eredményeink alapján az azonosított miRNS-ek a daganathoz kapcsolódnak, de fontos lenne következtetéseinket nagyobb betegcsoporton validálni, beleértve az egyéb vesebetegségben és húgyúti fertőzésekben szenvedőket is. Az 5 miRNS-ből álló jelöltünk közül korábban csak a miR-34b-t említették emelkedett expresszióval ccRCC daganatszövetben [74, 205, 207]; míg egy másik tanulmány a miR-34b metilációjáról számolt be az esetek 100%-ában [208]. A miR-449a-t és a miR-486-5p-t tumorszuppresszorként azonosították számos malignitásban [209, 210]. A miR-126-3p-t normál vizeletben csökkent mennyiségben mutattuk ki a ccRCC betegek mintáihoz képest. A miR-126-3p-t máshok is alul expresszálnak írták le az RCC szövetekben és prognosztikai faktornak bizonyult metasztatikus vs. primer vesetumorokban és olyan daganatokban, amelyeknél relapszus alakult ki [211, 212]. Korábbi munkánkban azt is megállapítottuk, hogy a miR-126 negatív korrelációt mutat a

célpontjának, a VEGFA expressziójával [213], arra utalva, hogy az RCC patogenezisben központi szerepet tölthet be.

Tanulmányunk az első, amely kimutatta a vizelet exoszomális miRNS-ek lehetséges szerepét a sejt-sejt kommunikációban ccRCC-ben. Az általunk vizsgált miRNS-ek által regulált gének expressziója szerepet játszhat a sejtciklusban, a tumorigenezisben és az angiogenezisben. A szakirodalom szerint a szekretált exoszómáknak anti- és pro-tumorigén szerepe lehet azért, hogy immunológiai vagy immunszuppresszív reakciókat, apoptózist indukáljanak, elősegítik a tumor invázióját és metasztázisát, vagy támogatják a túlélést és növekedést [214]. Bemutattuk, hogy az exoszomális RNS a primer ccRCC sejtekből átvihető a metasztatikus veserák és endotél sejtekbe, és ez a nukleinsavtranszfer befolyásolhatja a befogadó sejtek viselkedését és a tumor progresszióját. Érdekes módon leírták, hogy a miR-150-et mikrovezikulák szállítják a tumor-asszociált makrofágokba, és fokozzák azok VEGF-szekrécióját, ezzel elősegítve az angiogenezist [215, 216]. Kimutatták, hogy az ACHN metasztatikus RCC sejtvonalból izolált exoszómák gátolták a Jurkat T-limfociták proliferációját és citokin termelését, valamint apoptózist indukáltak [217]. Az ACHN-ből származó exoszómák szintén fokozták ugyanezen sejtek proliferatív aktivitását és elnyomták az apoptózist. Hasonlóképpen, autokrin exoszóma által vezérelt proliferációt mutattak ki OS-RC-2 vesekarcinóma sejteken is [218].

Összességében, bizonyítékot szolgáltatunk a vizelet miRNS-ek potenciális diagnosztikai hasznosságának alátámasztására a ccRCC, különösen az SRM potenciális diagnosztikai eszközeként, és igazoltuk, hogy a miRNS-ek szerepet játszanak a sejt-sejt kommunikációban veserákban.

IV.2.2. A keringő (plazma és exoszomális) miRNS-ek mint potenciális tumormarkerek elemzése PitNET daganatokban

IV.2.2.1. miRNS-elemzés új generációs szekvenálással

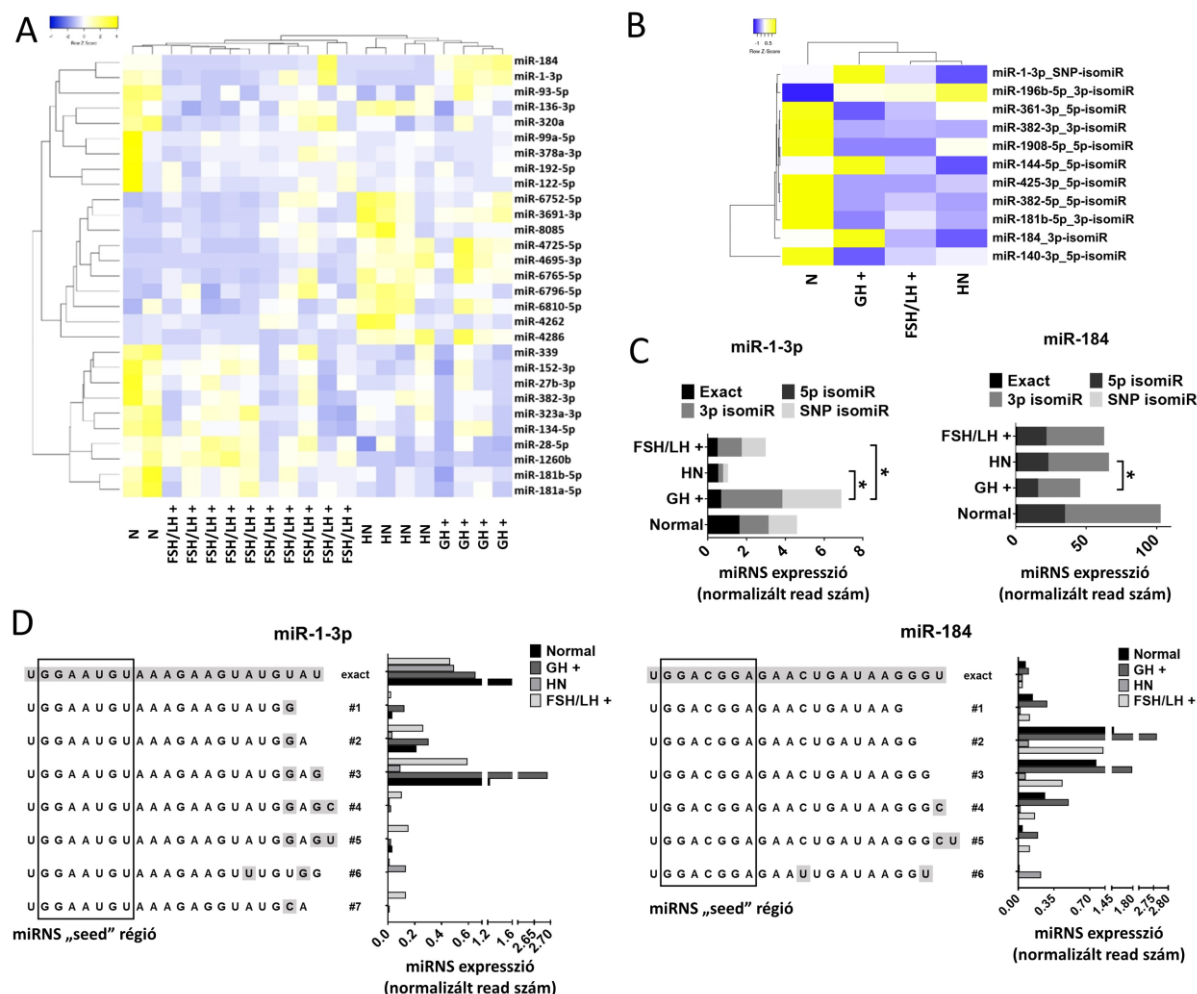
miRNS profil szekvenálást végeztünk 36 párosított plazmamintán (10-10 FSH/LH+, 4-4 GH-termelő (GH) és 4-4 hormon-immunonegatív (HN) PitNET-tel rendelkező páciensekből), amelyeket a transzsfenoidális hipofizisműtét előtt és 3 hónappal azt követően nyertünk. Az PitNET csoportokban a plazma globális miRNS expresszió alacsonyabb volt az egészséges egyének plazmamintáiban detektáltakhoz képest ($2,3 \times 10^6$ vs. $1,3 \times 10^6$; $p=0,0392$).

29 miRNS expressziója a preoperatív plazmamintákban képes volt megkülönböztetni az PitNET szövettani típusait a normál plazmamintáktól. 15 olyan plazma miRNS-t azonosítottunk, amelyek expressziója a különböző PitNET típusok között eltérő volt, valamint 14 olyan miRNS-t, amelyek az egészséges plazmában megváltozott expressziót mutattak a PitNET plazmamintákhoz képest (**39A ábra**). Mivel korlátozott számú kontroll minta vizsgálatára volt lehetőségünk, ezért elemzésünket kiegészítettük két olyan tanulmány eredményeivel, amelyekben a keringő miRNS-eket vizsgálták NGS módszerrel 18, illetve 5 egészséges személy mintáiban [219, 220]. Azt találtuk, hogy csak a miR-1260b mutatott statisztikailag eltérő expressziót ezekben a vizsgálatokban, az összes többi miRNS hasonlóan expresszáldott az általunk vizsgált kontroll mintáinkban a fent említett két NGS-vizsgálatban

henriettbutz_199_24

mértékhez viszonyítva. Így eredményeinket a miR-1260b kivételével reprezentatívnak tekintettük a kontrol populációra nézve.

39. ábra. Plazma miRNS expressziós profil hipofízis daganattal rendelkező betegeknél. A preoperatív plazmaminták hőtérképként reprezentált klaszteranalízise: (A) 29 miRNS és (B) 11 izomiR expressziója elkülöníti a különböző betegcsoportokat és az egészséges személyeket. A színek magas (sárga) és alacsony (kék) expressziót jelölnek. (C) A betegekből nyert preoperatív plazmamintákban kimutatott miR-1-3p és miR-184 izomiR típusok eloszlása. *: szignifikáns különbségek az SNP izomiR-ek (miR-1-3p) vagy 3p izomiR-ek (miR-184) expressziójában. (D) A miR-1-3p és a miR-184 izomiR formái, és azok expressziója a különböző csoportokban.



Nem találtunk összefüggést sem a miRNS-expresszió és a hipofízis hormonok, valamint az IGF1 szintek között. Nem volt összefüggés a miRNS-expresszió és az agyalapimirigy adenoma mérete, a Ki-67 proliferációs index vagy a tumor recidív jellege között sem.

II.2.2.2. IsomiR-analízis különböző PitNET altípusok preoperatív plazmamintáiban

Az NGS lehetővé teszi az összes miRNS variáns (úgynevezett izomiR-ek) kimutatását. Az izomiR típusok három fő csoportba sorolhatók Urgese et al, 2016 alapján [133]: hosszpolimorfizmusok a miRNS 3' végén (iso3p), 5' végén (iso5p) vagy szekvencia-változatok (isoSNP). A plazmamintáinkban az összes szekvenálási leolvasás 53,8%-a pontosan illeszkedett a miRBase érett miRNS szekvenciáihoz,

henriettbutz_199_24

vagyis a miRNS molekulák közel fele (46,2%) izomiR formában volt jelen, ami hangsúlyozza fontosságukat. A leolvasások 40,6%-a 3p izomiR, 1,6%-a 5p, illetve 1,2%-a SNP izomiR volt, míg a leolvasások 2,8%-a egyszerre több variáns is tartalmazott. Összesen csak 11 olyan miRNS-t találtunk, amelyek eltérő izomiR-variáns eloszlást mutattak, összehasonlítva a különböző típusú PitNET betegektől és a normál mintákból származó plazmamintákat (**39B ábra**). Az 5p és 3p izomiR-ek eltéréseire a különböző mintákban a **39C-D ábra** mutat be példákat.

IV.2.2.3. Hipofízis neuroendokrin tumor-specifikus miRNS-ek a plazmában

Irodalmi adatok és saját korábbi adataink is azt mutatják, hogy a normál hipofízis szövet és a PitNET daganatok is kifejezetten gazdagok miRNS-ekben. Kíváncsiak voltunk, hogy ezekből a szövetekből kerül-e ki a keringésbe szövetspecifikus miRNS. Ezért összevetettük az PitNET és normál hipofízis között eltérően expresszáldó miRNS-eket a PitNET betegektől nyert preoperatív vs. normál és preoperatív vs. posztoperatív plazmamintákban mért miRNS profilokkal. Összegyűjtöttük az irodalomban elérhető nagyáterestőképeségű miRNS-expressziós vizsgálatok adatait, ahol a normál szövetet használtuk referenciaként. A nem funkcionáló daganatok (NF-PitNET) tekintetében 4 tanulmányt találtunk [221–224] míg a növekedési hormont termelők (GH-PitNET) esetében 3 tanulmány eredményeit elemeztük [223, 225, 226]. Ezen adatokhoz saját, TaqMan miRNS array-kkel végzett profilalkotási adatainkat adtuk hozzá 6 GH-termelő adenomán és 5 normál szövetmintán. Azokat a miRNS-eket választottuk ki, amelyek legalább két tanulmányban azonos irányú expressziós változást mutattak (**16. táblázat**). Az NF-PitNET szöveti vizsgálatokban 31 miRNS felelt meg ezeknek a kritériumoknak. Ebből a 31 miRNS-ből 22 kifejeződött a plazma mintákban. A 22-ből 3 (miR-10b-5p, miR-182-5p, miR-26a-2-3p) azonos expressziós változást mutatott a nem funkcionális (FSH/LH+ és HN) plazmából nyert plazmában a normál plazmához képest, valamint a műtét előtti vs. utáni plazmamintákban. A GH adenomákban 7 miRNS változott ugyanabba az irányba legalább két szöveti vizsgálatban. Ezek közül 5 kifejeződött a plazmamintákban. Az öt közül a miR-29b-3p, a miR-432-5p és a miR-503-5p azonos változást mutatott a szövetekben, a preoperatív plazma vs. normál mintákban és a pre és posztoperatív plazmaminták között. Ezeknek a miRNS-eknek közös jellemzője volt, hogy rendkívül alacsony expressziós szintet mutattak a plazmamintákban.

16. Táblázat. Az PitNET szövetekben eltérően expresszált miRNS-ek összehasonlítása a plazma miRNS profillal. Azok a miRNS-ek kerültek feltüntetésre, amelyek legalább két vizsgálatban azonos irányú expressziós változást mutattak. A számok log2RQ (expressziós eltérés) értékeket jelölnek. N: normál minta; GO: gonadotrop; NF-PitNET: nem-funkcionáló PitNET; GH-PitNET: növekedési hormon termelő PitNET; HN: hormon-immunonegatív PitNET; Pre: preoperatív plazmaminta; Post: posztoperatív plazmaminta

Nem-funkcionáló (NF) PitNET									
Daganatszövet miRNS vizsgálatok						Plazma miRNS eredményeink			
miRNS	Butz et al. 2011 (N vs. NF-PitNET)	Liang et al 2013 (N vs. GO-PitNET)	Liang et al 2013 (N vs. NF-PitNET)	Cheunsuchon et al 2011 (N vs. NF-PitNET)	Bottoni et al. 2007 (N vs. NF-PitNET)	HN Post vs. Pre	HN Pre vs. N	FSH/LH+ Post vs. Pre	FSH/LH+ Pre vs. N
miR-10b-5p		5,6	2,5			-0,5	0,6	-0,2	1,2
miR-127-3p	-5,0			-0,8		0,6	-1,0	-0,4	-1,1

henriettbutz_199_24

miR-136-5p	-6,8			-9,0	-0,7	0,0	-0.1	-0.3	0.7
miR-139-5p	2,4	1,8				-0,3	0.3	0.3	-0.2
miR-140-3p	1,5	1,6				0,6	-0.8	-0.2	-0.9
miR-182-5p	2,7		2,3			-0.2	0.1	-0.2	0.1
miR-191-5p	1,0				0,6	0,7	-0.9	0.0	-0.9
miR-199b-5p		-3,3	-3,2			0,1	0.3	-0.1	0.9
miR-24-3p	-1,3				-0,9	0,5	-0.7	-0.3	-0.3
miR-26a-2-3p	1,8				1,6	-0.8	1.5	0.4	1.2
miR-323a-3p	-4,3			-5,1		0,3	-1.1	-0.3	-1.3
miR-363-3p	-3,3	-2,7	-1,9			-0.5	-0.3	0.1	0.0
miR-369-3p	-6,5			-3,6		-0.8	-0.9	-0.5	-0.8
miR-369-5p	-4,4			-4,4		0,3	-1.1	-0.5	-0.7
miR-370-3p	-5,5			-1,8		0,5	-1.0	-0.3	-1.0
miR-376c-3p	-5,4			-4,7		-0.2	-1.1	0.1	-1.3
miR-424-5p	-4,6	-1,7	-1,7			0,2	0.8	0.3	0.4
miR-432-5p	-4,9			-3,9		0,7	-0.8	-0.4	-0.9
miR-433-3p	-4,7			-3,9		1,4	0.8	-0.1	0.6
miR-450a-5p	-2,2	-3,3	-2,1			-0.7	2.3	1.2	1.6
miR-493-3p	-5,8	-2,7	-2,1			0,5	-1.5	-0.2	-1.3
miR-503-5p	-5,7	-5,3	-4,2			0,2	0.0	0.1	-0.2
miR-149-5p	2,5				1,0	nem kimutatható plazmában			
miR-20b-3p	-3,4	-4,5				nem kimutatható plazmában			
miR-31-5p	-6,1		-4,4			nem kimutatható plazmában			
miR-373	3,4		2,0			nem kimutatható plazmában			
miR-410-3p	-6,3			-4,8		nem kimutatható plazmában			
miR-506	-5,6	-4,3	-4,1			nem kimutatható plazmában			
miR-508-3p	-5,1	-5,0	-3,1			nem kimutatható plazmában			
miR-509-3p	-2,0	-4,1	-3,2			nem kimutatható plazmában			
miR-513-3p	-2,2	-4,1	-3,8			nem kimutatható plazmában			
Növekedési hormont (GH) termelő PitNET									
	Daganatszövet miRNS vizsgálatok					Plazma miRNS eredményeink			
miRNS	D'Angelo et al. 2012 (N vs. GH-PitNET)	Mao et al. 2010 (N vs. GH-PitNET)	Jelen vizsgálat (N vs. GH-PitNET)	Cheunsuchon et al 2011 (N vs. GH-PitNET)		GH-PitNET Post vs. Pre		GH-PitNET Pre vs. N	
miR-29b-3p		1,3	2,8	nem mutatott közös miRNS-eket a többi vizsgálattal		-0.2		0.8	
miR-378a-3p		1,9	6,9			0,1		-1.5	
miR-432-5p	-2,6		-6,2			0,3		-1.1	
miR-503-5p		-1,1	-7,6			0,2		-0.6	
miR-510-3p		-2,3	-9,7			-0.8		1.9	
miR-657	-3,0	1,3				nem kimutatható plazmában			
miR-801	-3,8	-1,6				nem kimutatható plazmában			

IV.2.2.4. miRNS expresszió összehasonlítása preoperatív és posztoperatív mintákban

Annak érdekében, hogy elkerüljük a miRNS expressziójára gyakorolt perioperatív hatásokat, a pre- és késői posztoperatív plazmamintákat (amelyeket a műtét után 3 hónappal gyűjtöttünk)

henriettbutz_199_24

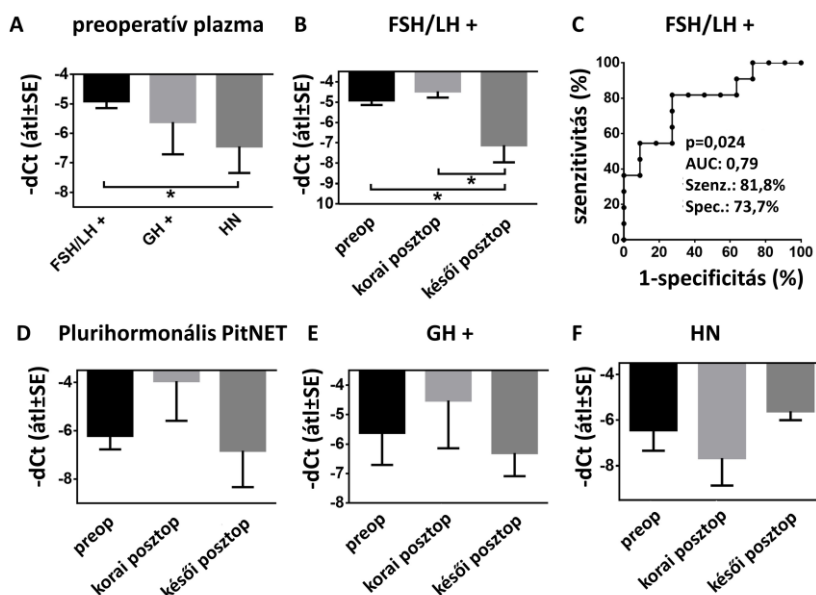
használtuk össze különböző szövettani típusok szerint csoportosítva. A GH, FSH/LH+ és HN csoportokban 3, 7 és 66 eltérően expresszálódó miRNS-t azonosítottunk. A posztoperatív állapotot a műtétet követő 3 hónapban klinikai értékeléssel, laboratóriumi hormon vizsgálatokkal (többek között FSH, LH vizsgálatokkal) és 6-9 hónap múlva MRI-vel (reziduális/recidív státusz) ellenőriztük. Valamennyi reziduális/recidiváló esetben jelentős daganat eltávolítást értek el a műtét során. Ezek közül a miRNS-ek közül kijelöltünk néhányat további validálás céljából. Első lépésként az egyedi TaqMan-próbával validálható leolvasásszám határértékének meghatározásához a miRNS-eket a <50, 50-100 és >=100 normalizált leolvasásszám tartományban választottuk ki. A legérzékenyebb RT-qPCR módszert használtuk, amelynek reverz transzkripciója preamplifikációs lépést is tartalmaz. A legalacsonyabb tartományban (miR-6514-3p, miR-6850-5p és miR-6867-5p) az RT-qPCR nem mutatott ki amplifikációt. Így második lépésben a szignifikáns miRNS-ek közül a nagyobb lefedettségű miRNS-eket jelöltük ki teljes körű validáláshoz, melyben a felfedezési kohorszt további mintákkal egészítettük ki. A miR-143-3p-t az FSH/LH+, a miR-26b-5p-t, a miR-126-5p-t és a miR-148b-3p-t a HN, valamint a miR-150-5p-t a GH előtti és utáni mintákban vizsgáltuk. A miR-143-3p csökkenését a posztoperatív FSH/LH+ mintákban megerősítettük a validálás során. Bár a miR-26b-5p, a miR-126-5p, a miR-148b-3p és a miR-150-5p expressziójának változása RT-qPCR segítségével hasonló volt az NGS eredményekhez, ezek a változások nem voltak szignifikánsak. A GH-t termelő adenoma csoportban az IGF1 csökkenése nem mutatott szignifikáns különbséget a reziduális/recidív daganatokban a teljes eltávolítással kezelt csoporthoz képest. Az IGF1 szintje nem korrelált az NGS vagy RT-qPCR által mért miR-150-5p expresszióval sem a pre-, sem a posztoperatív mintákban.

A miR-143-3p szintjének csökkenése a műtét után kizárólag az FSH/LH+ adenómák esetében volt megfigyelhető (**40A ábra**). Nem volt összefüggés a miR-143-3p expressziója és az PitNET mérete vagy a Ki-67 proliferációs indexe között. A késői posztoperatív mintákkal ellentétben a korai posztoperatív FSH/LH+ mintákban (1-3 nappal a műtét után) nem csökkent a miR-143-3p expressziója (**40B ábra**). A plazma miR-143-3p szintje nem változott a GH, HN és plurihormonális (FSH/LH+ mellett további hormonpozitivitás) PitNET mintákban sem a korai, sem a késői posztoperatív mintákban a műtét előtti párjukhoz képest (**40D-F ábra**), ami az FSH/LH+ tumorokra való specifitásra utal. Érdekes módon a hormonimmunnegatív-SF-1+ gonadotróp csoportban a miR-143-3p nem mutatott expressziós változást sem a korai, sem a késői posztoperatív mintákban a preoperatív mintákhoz képest. A miR-143-3p szintjének ROC-elemzése során a műtét előtti és utáni plazmapárokban a görbe alatti terület (AUC) 0,79 (p=0,024) volt az FSH/LH+ daganattal rendelkező betegek esetében. A -dCT=-5,14 cut-off érték mellett a miR-143-3p érzékenysége 81,8%, míg a specifitása 72,7% volt az FSH/LH+ PitNET betegek pre- és késői posztoperatív állapotából nyert plazmaminták megkülönböztetésében.

Az NF-PitNET daganatok leggyakrabban gonadotróp tumorok, esetenként mérhető, bár klinikailag nem releváns, megnövekedett FSH/LH-szintekkel és -aránnal. Ezért vizsgáltuk az FSH/LH arányt a műtét előtti és utáni mintákban annak kimutatása érdekében, hogy a hormonszintek korrelálnak-e a miR-143-3p szintjével. Nem mutattunk ki azonban korrelációt. Továbbá, a miR-143-3p nem mutatott

releváns változást az első alkalommal operált betegeknél összehasonlítva a korábban PitNET eltávolításon átesett betegeknél.

40. ábra. A miR-143-3p expressziója preoperatív, korai és késői posztoperatív mintákban a különböző csoportokban. GH: növekedési hormon termelő; HN: hormon-immunnegatív csoportok; AUC: görbe alatti terület. * szignifikánsan eltérő kifejezést jelez ($p < 0,05$). A hibasávok standard hibát (SE, standard error) jelölnek



A miR-143-3p szintjében nem volt jelentős különbség azokban az esetekben, ahol sikerült a daganat teljes eltávolítása, szemben azokkal, ahol képalkotó eljárással reziduális/recidív tumort észleltek. Meg kell azonban jegyezni, hogy a pozitív képalkotás ellenére ezeknek a daganatoknak a mérete is jelentősen csökkent, ami a miR-143-3p szint csökkenését eredményezheti. Egyetlen beteg volt, akinél posztoperatív hipothireózis és hipadrenia alakult ki, ezért hormonpótlásban részesült. A miR-143-3p expressziója ennek a betegnek a pre, korai és késői posztoperatív plazmamintáiban nem mutatott különbséget a többi beteghez képest.

IV.2.2.5. Az extracelluláris vezikulához kapcsolódó miRNS-ek

Korábbi munkáinkban [34, 227, 228] kimutattuk, hogy a testfolyadékokban található miRNS-ek extracelluláris vezikulákhoz társulhatnak, és potenciálisan érzékenyebb biomarkerekként szolgálhatnak a frakcionálatlan miRNS-ekhez képest. Az exoszómák jelenlétének áramlási citometriával és tunable resistive pulse sensing analízissel történő megerősítése után azt találtuk, hogy a sejtmentes plazmában nem kimutatható miRNS-ek (miR-6514-3p, miR-6850-5p és miR-6867-5p) az exoszómális vezikulumokban (EV) sem voltak kimutathatók. A HN-PitNET és GH-PitNET plazmamintákban kimutatható összes miRNS (miR-26b-5p, miR-126-5p, miR-148b-3p, miR-150-5p) mérhető volt az EV-kben is, és hasonlóan ezek sem mutattak szignifikáns változást a műtét előtti és utáni minták között. Érdekes módon a miR-143-3p szintjének változása az FSH/LH+ mintákban szintén nem volt szignifikáns az EV-kben, ami arra utal, hogy a miR-143-3p a plazmában inkább fehérjéhez asszociáltan van jelen, nem pedig vezikulában.

Megbeszélés. Vizsgálatunk célja a hipofízis neuroendokrin tumorok eltávolítása előtt és után nyert plazmamintákban keringő miRNS-ek jellemzése volt, hogy azonosítani tudjunk e daganattípusra jellemző potenciális miRNS biomarkeret. Az expresszált miRNS-ek interindividális variabilitásának kizárása érdekében ugyanazon egyénekből származó preoperatív és posztoperatív minták párpait hasonlítottuk össze. Kimutattuk, hogy a miRNS-ek, amelyek lefedettsége a mi kísérleti beállításainkban 50 leolvasásnál alacsonyabb (read number <50) volt, nem voltak validálhatók RT-qPCR-rel, ami rontja biomarkerként való alkalmazásukat. A miRNS expressziós szintjének globális csökkenését mutattuk ki a PitNET betegek plazmájában a kontroll mintákhoz képest. Ezenkívül az érett miRNS és az izomiR profil képes volt megkülönböztetni a különböző altípusú PitNET betegektől és a kontrolltól származó plazmamintákat. Az izomiR-ek az összes miRNS jelentős részét képviselték, melyek funkciójukban a szekvenciaeltérések következtében eltérést mutathatnak. Jellegzetes tulajdonságaik miatt kimutatásuk többnyire csak NGS-sel lehetséges. Bár bizonyos daganatos szövetekben már leírták a különböző izomiR-változatok szerepét [229, 230], plazmamintákban való expressziójukról korlátozottak az ismereteink. Vizsgálatunkban az isomiR profil nagymértékű varianciáját detektáltuk a különböző betegcsoportokban. Funkciójukat tekintve az 5p izomiR-ek jelentős potenciállal rendelkezhetnek az mRNS-csökkentés befolyásolásában, hiszen érinthetik a funkciót alapvetően meghatározó ún. “seed” régiót. A miR-140-3p 5p izomiR-jeiben jelentős különbséget találtunk a GH-PitNET betegek plazmamintáiban a kontroll mintákhoz képest. Érdekes módon az 5p deléciót és annak előre jelzett és funkcionális következményeit már leírták az endometriumban és a kondrocitákban [231, 232] bár szerepüket a keringésben nem vizsgálták. További vizsgálatokra van szükség a PitNET betegek plazmájában bekövetkező izomiR-változatok okainak és szerepének tisztázásához.

Elemzésünk kimutatta, hogy a miR-143-3p szignifikánsan nagyobb mennyiségben van jelen a preoperatív FSH/LH+ PitNET betegek plazmamintáikban, akár a késői posztoperatív párpjukhoz, akár a preoperatív HN mintákhoz képest. A miR-143-3p csökkenése az FSH/LH+ PitNET betegekre volt jellemző, függetlenül a daganat eltávolításának kiterjedésétől, és nem változott a plurihormonális, GH-termelő és hormon negatív SF1+ gonadotrop PitNET betegek plazmájában, függetlenül a recidív/reziduális státusztól. Az FSH/LH+ PitNET betegeknél a miR-143-3p a műtét után 3 hónappal a műtét előtti állapothoz képest csökkenést mutatott, nem így a korai posztoperatív (1-2 nappal a műtét után) fázisban gyűjtött mintákban. Bár a tumorhoz kapcsolódó miRNS-ek felezési ideje a vérben nem meghatározott, korábban azt feltételezték, hogy kevesebb, mint 14 nap [233]. Bala és munkatársai, 2015-ben állatmodellben elemezték az exoszomális miRNS-ek felezési idejét. MiR-155 szintetikus miRNS-t (exo-miR-155 mimics) tartalmazó exoszómákat használtak miR-155 knockout (KO) egér modellrendszerben, és azt találták, hogy az exo-miR-155 intravénás beadás esetén rövid időn belül (30 perc) eliminálódott a keringésből, és szintje a recipiens miR-155 KO egerek plazmájában még 4 óra elteltével is hosszabb ideig fennmaradt, ha intraperitoneálisan adták be [234]. A PitNET plazmamintáinkban nem találtunk különbséget a kiválasztott exoszomális miRNS-ek tekintetében sem a korai, sem a késői posztoperatív mintákban a preoperatív megfelelőjükhöz képest. Ezek az adatok és

az exoszomális vs. teljes sejtmentes miRNS-expressziós eredményeink arra utalnak, hogy a miR-143-3p inkább fehérje-, mint exoszóma-asszociált. A miR-143-3p hosszabb felezési ideje vizsgálatunkban (nem változott a korai, de csökkent expressziót mutatott a késői posztoperatív mintákban) a miRNS-ekhez társuló fehérjék felezési idejét tükrözheti. Mivel a GH és HN adenomákban a miR-143-3p expressziós szintje stabil volt, kizárhattuk a műtéttel kapcsolatos általános hatások (anesztézia, fájdalomcsillapítás stb.) szerepét.

A miR-143-3p downregulációját különböző daganatos szövetekben is leírták [235, 236], ami felveti a tumorszupresszor jellegének lehetőségét [237]. PitNET daganatokra vonatkozóan, Amaral és munkatársai a miR-143-3p csökkent expresszióját találták az ACTH-t termelő tumorokban a normál hipofízis szövetekhez képest, de nem tudtak összefüggést kimutatni az expresszió és a tumor mérete vagy a műtét utáni remisszió aránya között [238]. Ezzel szemben számos más tanulmány, amely különböző hormontermelő és nem-funkcionáló PitNET szöveteket elemzett a normál hipofízishez képest, nem talált szignifikáns különbséget a miR-143-3p expressziójában [221, 224, 226, 239]. Érdekes módon Zhang és munkatársai egy nemrégiben megjelent publikációjában kimutatták, hogy a miR-143 PitNET daganatokban csökkent mennyiségben van jelen a normál szövetekhez képest, és a miR-143-3p fokozott expressziója gátolta a sejtproliferációt a K-Ras onkogén downregulációján keresztül [240]. Meg kell jegyezni, hogy a vizsgálatban felhasznált daganatszövetek típusát nem tüntették fel, de az elemzett sejtek (GH3 és MMQ) GH- és prolaktin-termelő sejtek voltak. Emellett, a miR-143 daganatszövetekben történő downregulációja mögött álló mechanizmust nem elemezték.

A plazma potenciális hipofízis eredetű miRNS-einek meghatározásához a normál és PitNET szövetek között eltérően expresszálódó miRNS-eket vetettünk össze a műtét előtti és utáni plazma- és normál mintáinkkal. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a daganatszövetekben eltérően expresszálódó miRNS-ek rendkívül alacsony mennyiségben vannak jelen a plazmában, így biomarkerként való alkalmazásuk kihívást jelent [104]. A műtét előtti és utáni plazmamintákban eltérően expresszálódó miRNS-ek nem mutattak eltérő expressziót a PitNET szövetekben, ami felveti, hogy ezek a miRNS-ek nem közvetlenül PitNET daganatokból származnak. Lehetséges, hogy a vérben lévő miRNS-profil hormonális hatásokat tükröz még akkor is, ha az adenomák klinikailag nem-funkcionálóak, esetleg hibás, inaktív hormonokat vagy olyan alegységeket szekretálhatnak, amelyek a hagyományos hormonvizsgálatokkal nem mutathatók ki. Egy másik lehetőséget támogatnak Michaels és munkatársai eredményei, melyben a miR-143/miR-145 transzkripciója és érése nem változott a tumorokban a normál szövetekhez képest, így az általuk plazmában mért miRNS szintjének különbsége a keringésben az érett miRNS tumorokban való csökkent visszatartása miatt következett be [241]. Ezen adatok alapján az is felvethető, hogy a gonadotrop PitNET daganatos betegeknél a keringésben lévő magasabb miR-143-szint az érett miR-143-3p szekréció növekedésének lehet a következménye.

IV.2.3. A diagnosztikus pontosság növelése keringő miRNS-ek segítségével metasztatikus hasnyálmirigy neuroendokrin tumorokban

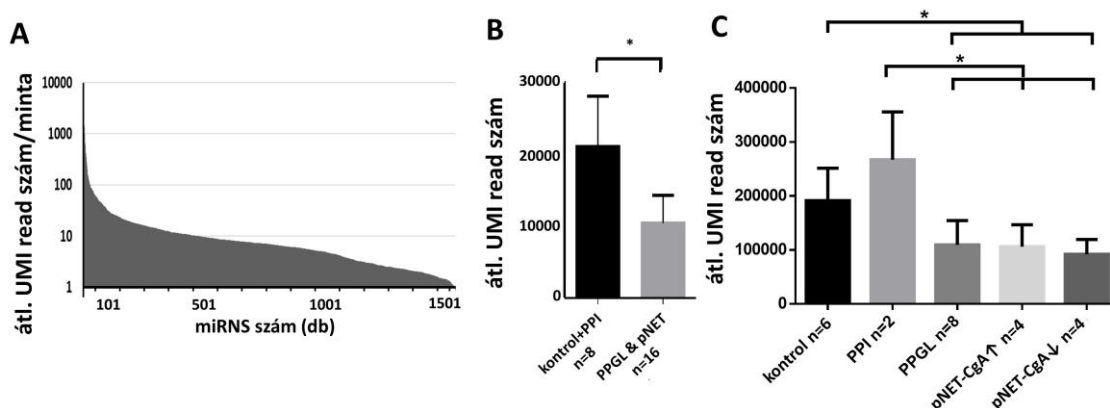
A kromogranin A (CgA) a neuroendokrin tumorok (NET) legszélesebb körben elfogadott biomarkere, de diagnosztikai pontossága függ a tumor típusától és a protonpumpagátlók (proton pump inhibitor, PPI) használatától. Vizsgáltuk a keringő miRNS-ek diagnosztikus értékét a CgA mellett hasnyálmirigy neuroendokrin tumorban (pNET). PPGL betegek és egészséges egyének szérumból mintáit analizáltuk az azonosított miRNS-ek diagnosztikai hasznosságának tanulmányozásához. 74 szérumból mintát gyűjtöttünk pNET-ben (n=25, nem-funkcionáló), feokromocitómában/paragangliómában (PPGL, n=20) szenvedő betegektől, és egészséges, normál CgA szinttel rendelkező személyektől (n=29), beleértve 5 egészséges személy 10 mintáját, akik aktuális PPI-kezelésben részesültek, illetve nem részesültek.

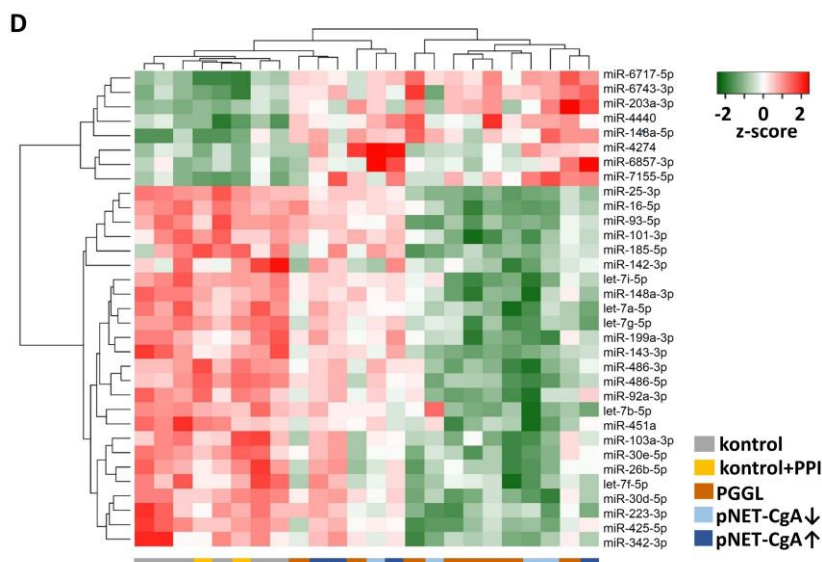
Elsőként az szérumból minták sejt-szennyeződését zártuk ki klasszikus laboratóriumi és molekuláris genetikai módszerekkel. Sem hemolízist (Coulter® AcT diff Analyzer és spektrofotometriával), sem pedig sejtkontaminációt nem detektálunk (vörösvérsejt- vagy trombocita specifikus miR-142-3p és miR-451a/miR-23a-3p arány mérésével) [242–245].

IV.2.3.1. A keringő miRNS-profil elemzése újgenerációs szekvenálással

Összesen 1525 miRNS-t mutattunk ki a teljes szérumból minták NGS-profilozása során. Míg kilenc miRNS volt a legnagyobb mennyiségben jelenlévő, >500 UMI leolvasás/mintánként, ami az összes detektált miRNS 0,05%-át képviselte, a miRNS-ek nagy többsége (1525-ből 1461, 95%) az alacsony expressziós tartományban volt (<50 UMI leolvasás/mintánként) (**41A ábra**). A pNET-ben vagy PPGL-ben szenvedő betegek teljes (globális) miRNS-expressziója szignifikánsan csökkent a normál kontrollokhoz képest (**41B-C ábra**).

41. ábra. (A) MiRNS-ek expressziója az individuális miRNS szám függvényében. (B-C) Globális miRNS-expressziós szint a normál kontrollok és a pNET/PPGL minták között. A hibaszávok az átlag±SE értéket jelzik. *: $p < 0,05$. (D) A különböző csoportok között eltérően expresszálandó 33 miRNS képes megkülönböztetni a kontroll és a pNET/PPGL mintákat. zöld alacsonyabb, piros magasabb expressziót jelez



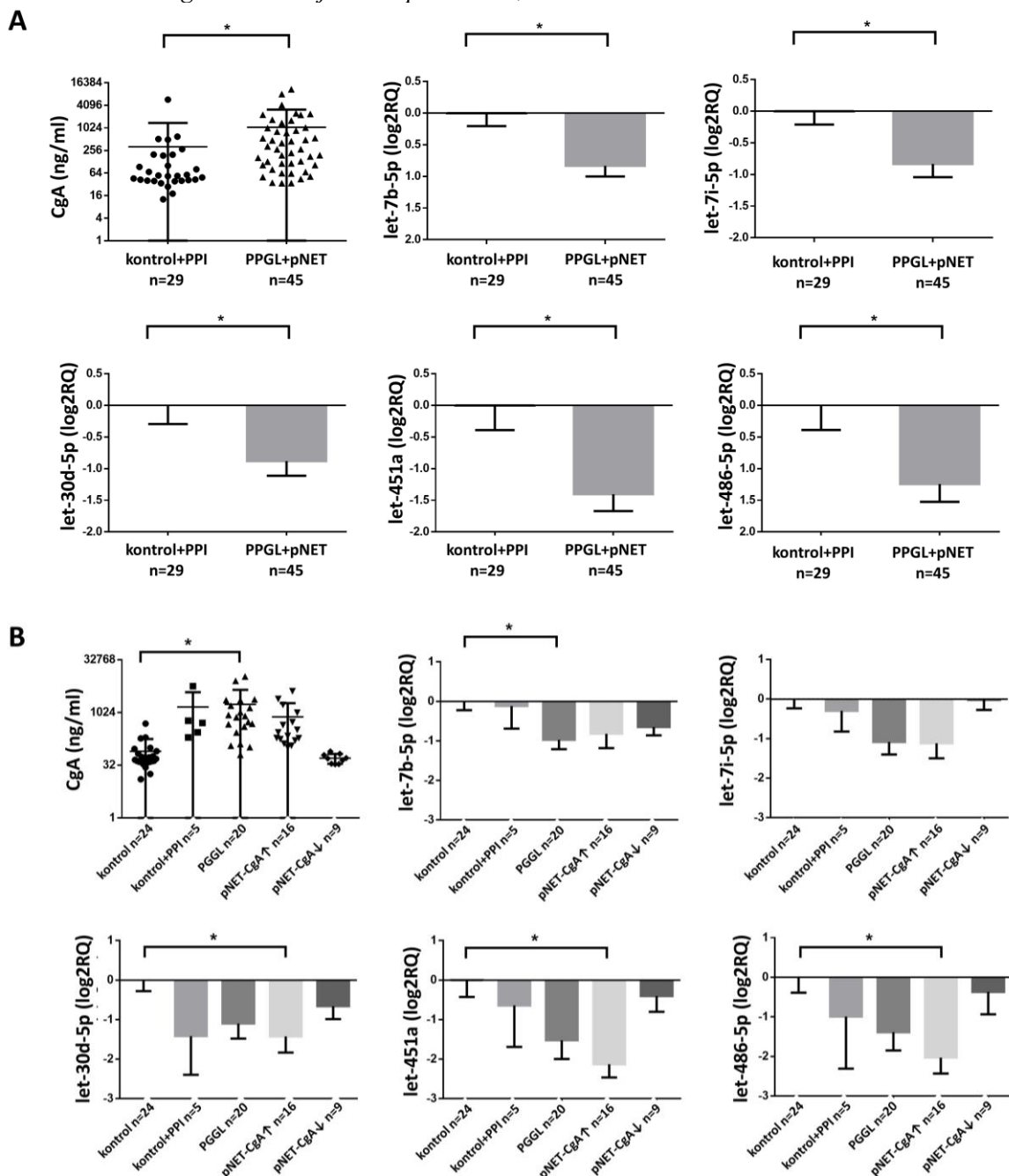


Az alacsony abundanciájú (<50 UMI olvasási szám) miRNS-eket kizártuk a további elemzésből, mivel ezeket a miRNS-eket nem tudtuk validálni qRT-PCR-rel a korábbi kísérleti elrendezésünkben. [246]. 33 miRNS különböztette meg a pNET/PPGL betegeket a normál kontrolloktól, függetlenül a PPI-kezeléstől (**41D ábra**). pNET-ben 19 alul, illetve 7 felülreprezentált miRNS-t, míg a PPGL-ben 25 csökkent, illetve 6 fokozottan expresszáldó miRNS-t detektáltunk az egészséges kontrollokhoz képest. A pNET és PPGL betegeket azonban nem lehetett megkülönböztetni a szérumban miRNS-expresszió alapján (**41D ábra**). Emellett az egészséges kontrolloknál sem a PPI-kezelés előtt, sem után nem találtunk szignifikáns miRNS-változást. 19 miRNS expressziója mutatott szignifikáns korrelációt a szérumban CgA-szintekkel, amelyek közül a hsa-let-7g-5p mutatta a legerősebb összefüggést ($R < -0,71942$; $p = 0,03077$).

IV.2.3.2. Kiválasztott miRNS-ek validálása

A kontrollok és a tumoros szérumban minták között szignifikánsan eltérő expressziójú 33 miRNS közül 6 csökkent expressziójú miRNS-t (let-7b-5p, let-7i-5p; miR-143-3p; miR-30d-5p; miR-451a; miR-486-5p) választottunk ki további vizsgálatra. Emellett a pNET/PPGL mintákban leginkább overexpresszáldó miR-203a-3p-t is validáltuk, annak ellenére, hogy összességében alacsony szinten fejeződött ki a plazmában. A kiválasztott miRNS-eket 25 pNET, 20 PPGL és 29 egészséges személyből (5 esetben PPI-kezeléssel, 24 PPI-kezelés nélkül) álló, kibővített mintakohorszton analizáltuk. Mind a 6 miRNS esetében RT-qPCR-rel módszerrel is megerősítettük a csökkent expressziót (**42A ábra**). A tumorcsoportok szétválasztása után a miR-30d-5p, a miR-451a és a miR-486-5p csökkent expresszióját mutattuk ki a magas CgA-szinttel rendelkező pNET betegeknél, és csökkent let-7b-5p szintet detektáltunk a PPGL eseteknél az egészséges kontrollokhoz képest (**42B ábra**). A miR-203a-3p emelkedett expresszióját RT-qPCR méréseink nem tudták megerősíteni egyetlen mintában sem, kivéve egy pNET-páciensnél, akinél a CgA értéke rendkívül magas volt (2490,8 ng/ml).

42. ábra. A-B CgA szintek és miRNS expresszió a kontrollok és a pNET/PPGL minták között. A hibasávok az átlag $\pm$ SE értéket jelzik. * p -érték $<0,05$.



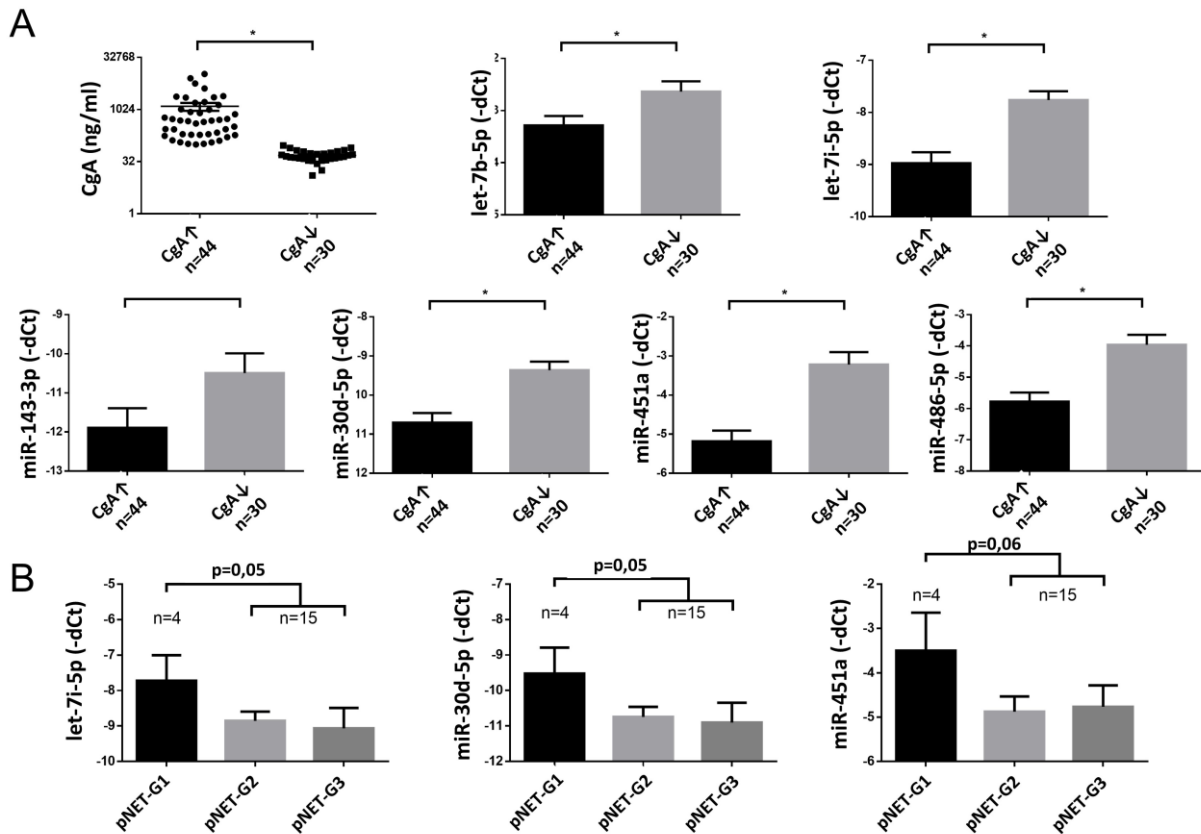
IV.2.3.3. A miRNS-expresszió és a klinikopatológiai paraméterek közötti összefüggések elemzése

Nem találtunk különbséget a PPI-val kezelt pNET/PPGL minták miRNS-expressziós profiljában a PPI-val kezelt egészséges kontrollokhöz képest. A let-7b-5p, let-7i-5p; miR-143-3p; miR-30d-5p; miR-451a és miR-486-5p azonban alacsonyabb expressziót mutatott a magas (>100 ng/ml) CgA-szintű mintákban a normál CgA-szintű (≤ 100 ng/ml) mintákhoz képest (43A ábra). Mind a 6 miRNS expressziója negatív korrelációt mutatott a szérumban CgA-szinttel, amikor az összes mintát bevontuk az elemzésbe. A korreláció vizsgálata során a különböző betegcsoportokban a miRNS-ek és a CgA közötti

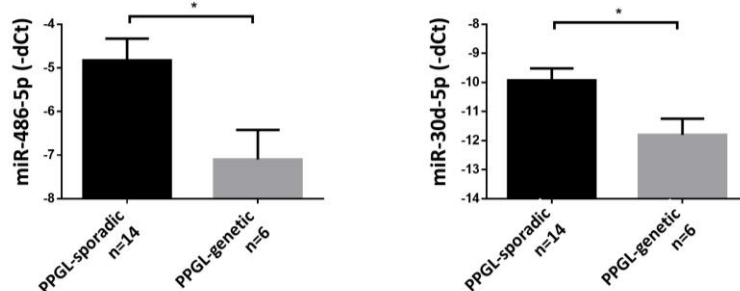
negatív korreláció csak az egészséges kontrollcsoportban maradt szignifikáns, de a pNET- vagy PPGL-csoportban nem (17. táblázat).

A pNET betegeknél a let-7i-5p, miR-30d-5p és miR-451a és a tumor grádus közötti inverz korrelációt figyeltük meg (43B ábra). A PPGL-betegektől nyert mintákban csak a miR-486-5p mutatott fordított korrelációt a CgA-val (17. táblázat). A csírvonal-mutációval (*SDHB*, *RET*, *VHL* vagy *NF1*) rendelkező PPGL-betegekből nyert szérummintákban a miR-486-5p és a miR-30d-5p a sporadikus betegekhez képest csökkent mennyiségben volt jelen (43C ábra). Az *SDHB* csírvonal-mutációval rendelkező betegeknél a miR-30d-5p és a miR-486-5p csökkent expressziója mellett a let-7b-5p és a let-7i-5p is csökkent expressziót mutatott az *SDHB*-ra vad típusú betegek szérum mintáihoz képest (43D ábra).

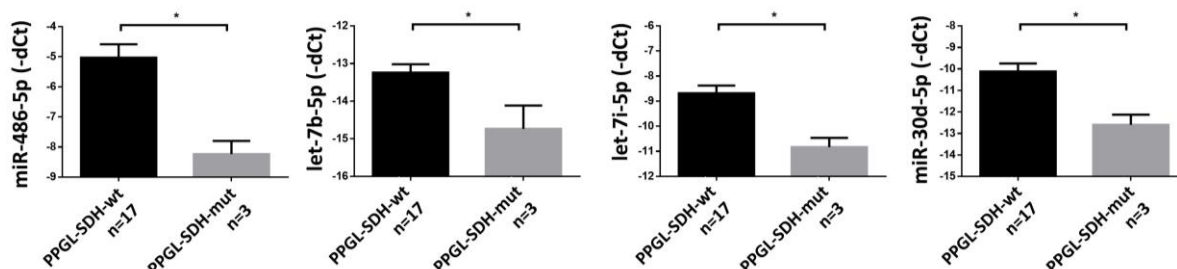
43. ábra. A miRNS-ek egyedi qPCR validálása CgA-magas vs. CgA-alacsony mintákban (A), különböző grádusú pNET minták között (B), sporadikus vs. genetikai hajlammal rendelkező PPGL betegeken (C), valamint *SDHB* mutációval társult vs. nem társult PPGL esetekben (D). A hibasávok az átlag $\pm$ SE értéket jelzik. * p-érték <0,05.



C



D



17. táblázat. CgA korreláció a miRNS expresszióval a validációs minta készletben (CgA szint vs. -dct_{miRNS})

Minden minta			Egészséges kontrollok (PPI-vel és PPI nélkül)		
Korreláció	Spearman R	p-érték	Korreláció	Spearman R	p érték
CgA és hsa-let-7b-5p	-0,29	0,0125	CgA és hsa-let-7b-5p	-0,27	0,1599
CgA és hsa-let-7i-5p	-0,46	0,0000	CgA és hsa-let-7i-5p	-0,42	0,0249
CgA és hsa-miR-143-3p	-0,34	0,0029	CgA és hsa-miR-143-3p	-0,4	0,0293
CgA & hsa-miR-30d-5p	-0,39	0,0007	CgA & hsa-miR-30d-5p	-0,39	0,0377
CgA és hsa-miR-451a	-0,5	0,0000	CgA és hsa-miR-451a	-0,4	0,0334
CgA és hsa-miR-486-5p	-0,39	0,0006	CgA és hsa-miR-486-5p	-0,17	0,3852
PPGL			pNET		
Korreláció	Spearman R	p-érték	Korreláció	Spearman R	p érték
CgA és hsa-let-7b-5p	-0,05	0,8256	CgA és hsa-let-7b-5p	-0,04	0,838
CgA és hsa-let-7i-5p	-0,42	0,0655	CgA és hsa-let-7i-5p	-0,22	0,2838
CgA és hsa-miR-143-3p	-0,37	0,1069	CgA és hsa-miR-143-3p	-0,14	0,5116
CgA & hsa-miR-30d-5p	-0,35	0,1317	CgA & hsa-miR-30d-5p	-0,02	0,9157
CgA és hsa-miR-451a	-0,38	0,1009	CgA és hsa-miR-451a	-0,32	0,1198
CgA és hsa-miR-486-5p	-0,45	0,0451	CgA és hsa-miR-486-5p	-0,18	0,3892

IV.2.3.4. A keringő miRNS-ek diagnosztikai értéke PPGL/pNET-ben

A miRNS-ek kombinációira, valamint a CgA és a miRNS-ek kombinációira bináris logisztikus regressziós modelleket hoztunk létre. Összesen 6 miRNS-t (let-7b-5p, let-7i-5p, miR-143-3p, miR-30d-5p, miR-451a és miR-486-5p) vizsgáltunk egyedileg és kombinációkban (18. táblázat). A pNET-csoportban a CgA-hoz képest a let-7b-5p, a miR-30d-5p, a miR-451a és a miR-486-5p a ROC-analízisben jobb diszkriminációt eredményezett (18. táblázat). Emellett a CgA és a 4 (let-7b-5p, let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, miR-30d-5p) miRNS-ből álló panel kombinációjának regressziós modellje 72,2%-

henriettbutz_199_24

os pontossággal (AUC: 0,751; 75,8%-os érzékenység; 68%-os specificitás) a legjobb diszkriminációt eredményezte (**18. táblázat**).

Klinikailag a legnagyobb kihívást a normál szérumban CgA-szinttel (<100 ng/ml) rendelkező pNET betegek jelentik. Ezért a miRNS-expressziós profilok különösen érdekesek ezeknél a betegeknél. A let-7b-5p vagy a miR-143-3p egyedi expresszióinak használata a CgA-hoz képest jobb elkülönítő képességet eredményezett az egészséges kontrolloktól (**18. táblázat**). Azonban a CgA és 4 miRNS kombinációja mutatta a legjobb diszkriminációs képességet az alacsony-CgA-pNET csoport és az egészséges kontrollok között (AUC: 0,904, szenzitivitás: 66,6%, specificitás: 96,5%) (**18. táblázat**).

A mintáinkban minden PPGL-betegnél emelkedett volt a CgA-szint, és ezzel összhangban a CgA 81,6%-os pontossággal (accuracy) (AUC: 0,889; 75%-os érzékenység, 86%-os specificitás; $p=0,0007$) a legmagasabb diszkriminációs értékkel rendelkezett. A bináris logisztikus regressziós modell segítségével a CgA és 3 miRNS (let-7b-5p, miR-143-3p és miR-486-5p) kombinációja 83,6%-os pontossággal (accuracy) magasabb specificitást eredményezett a normál minták PPGL-mintáktól való megkülönböztetésében, azonban alacsonyabb érzékenységgel (AUC: 0,862; 85%-os érzékenység; 82,7%-os specificitás), összehasonlítva a „csak” CgA diagnosztikus teljesítményével (**18. táblázat**).

18. táblázat. A CgA, az egyes miRNS-ek és a CgA és a miRNS-ek legjobb kombinációjának diagnosztikus teljesítménye a különböző csoportok között

PPGL vs. kontrollok PPI kezeléssel és anélkül		AUC	cutoff*	Érzékenység %	Specificitás %	p-érték
CgA		0.890	> 102.3	95.0	72.4	< 0.0001
Egyedi miRNS-ek	hsa-let-7b-5p	0.707	> 12.5	90.0	48.3	0.0147
	hsa-let-7i-5p	0.710	> 5.7	100.0	3.4	0.0135
	hsa-miR-143-3p	0.598	> 7.7	100.0	27.6	0.2463
	hsa-miR-30d-5p	0.643	> 9.9	65.0	65.5	0.0914
	miR-451a	0.678	> 5.8	45.0	86.2	0.0353
	miR-486-5p	0.660	> 7.3	30.0	96.6	0.0586
Bináris logisztikus regressziós modell		AUC	cut-off**	Érzékenység %	Specificitás %	p érték
Az összes kombináció közül a legjobb	CgA+hsa-let-7b-5p+hsa-miR-143-3p+hsa-miR-486-5p	0.862	0.4	85.0	82.8	0.0085
pNET vs. kontrollok PPI kezeléssel és anélkül		AUC	cut-off*	Érzékenység %	Specificitás %	p érték
CgA		0.672	> 102.5	64.0	72.4	0.0308
Egyedi miRNS-ek	hsa-let-7b-5p	0.702	> 12.9	80.0	62.1	0.0111
	hsa-let-7i-5p	0.661	> 7.9	80.0	51.7	0.0433
	hsa-miR-143-3p	0.661	> 9.0	100.0	41.4	0.0433
	hsa-miR-30d-5p	0.675	> 9.7	76.0	62.1	0.0276
	miR-451a	0.692	> 2.9	96.0	41.4	0.0159
	miR-486-5p	0.712	> 4.2	88.0	58.6	0.0078
Bináris logisztikus regressziós modell		AUC	cut-off**	Érzékenység %	Specificitás %	p-érték
Az összes kombináció közül a legjobb	CgA+hsa-let-7b-5p+hsa-let-7i-5p+hsa-miR-143-3p+hsa-miR-30d-5p	0.752	0.5	75.9	68.0	0.0351

CgA alacsony pNET vs. kontrollok PPI kezeléssel és anélkül		Terület	cut-off*	Érzékenység %	Specifititás %	p-érték
CgA		0.613	< 79.6	100.0	37.9	0.3112
Egyedi miRNS-ek	hsa-let-7b-5p	0.651	> 12.9	77.8	62.1	0.1751
	hsa-let-7i-5p	0.517	< 8.8	100.0	20.7	0.8772
	hsa-miR-143-3p	0.646	> 9.9	100.0	48.3	0.1920
	hsa-miR-30d-5p	0.577	> 9.4	77.8	55.2	0.4923
	miR-451a	0.527	> 2.9	88.9	41.4	0.8101
	miR-486-5p	0.561	> 4.2	66.7	58.6	0.5828
Bináris logisztikus regressziós modell		AUC	cut-off**	Érzékenység %	Specifititás %	p érték
Az összes kombináció közül a legjobb	CgA+hsa-let-7b-5p+hsa-let-7i-5p+hsa-miR-143-3p+hsa-miR-30d-5p+hsa-miR-486-5p	0.904	0.55	66.7	96.6	0.0342

*: A CgA határértékek ng/ml-ben, a miRNS-ek dCt-ben kerültek megadásra; **: Cut-off értékek bináris logisztikus regressziós modellben. AUC: görbe alatti terület.

IV.2.3.5. pNET/PPGL tumorszöveti miRNS-ek vizsgálata szérumban

A szérumban lévő szövetspecifikus miRNS-ek vizsgálata érdekében összegyűjtöttük 12 olyan tanulmány adatait, amelyek miRNS-expressziós profilt közöltek 7 pNET [247–253] és 5 PPGL [254–258] vizsgálatban. A pNET-ben a szérummintákban kapott eredményeinket a szöveti miRNS-expresszió-változással összevetve 9 miRNS a pNET-ben és 3 miRNS a PPGL-ben mind a szövetekben, mind a szérumban eltérően expresszáldott (**19. táblázat**). Ezek közül csak a miR-203a-3p volt mind a pNET-szövetben, mind a szérumban felülreprezentált. Az összes többi miRNS a tumorszövetekben fokozottan, a szérummintákban pedig csökkent módon expresszáldott. PPGL-ben, míg a miR-101-3p magasabb expressziót mutatott a malignus vs. benignus PPGL-ekben, a szérumban viszont a kontrollokhoz képest ennek ellentétét mutatta. A miR-16-5p és a miR-451a mint feltételezett tumorsupresszor miRNS-ek azonban mind a szövetekben, mind a szérumban csökkent mennyiségben voltak kimutathatók (**19. táblázat**).

19. táblázat. A pNET/PCC tumorszövetekben és a szérumban eltérően expresszáldó miRNS-ek összehasonlítása. A szövetekben és a szérummintákban egyaránt gyakori miRNS-eket a táblázatban jelöljük. UMI: egyedi molekuláris index (unique molecular index); pNET: hasnyálmirigy neuroendokrin tumor; PAcT: hasnyálmirigy acináris tumor; INS: insulinoma; GEP-NET: gasztroenteropankreatikus neuroendokrin tumor; PCC: feokromocitóma; NP: normál hasnyálmirigy szövet (normal pancreas)

pNET					
miRNS	korrigált p-érték	Kontrol	pNET	Hivatkozás	
		átlagos UMI szekvencia olvasat szám (read number)			
miR-103a-3p	0,0371	109	65	Roldo et al. 2006 (23)	túlreprezentált a pNET+PAcT vs. NP összehasonlításban
				Zimmermann et al. 2018 (25)	negatív korreláció a Ki-67-tel GEP-NET-ben
miR-26b-5p	0,0423	115	73	Roldo et al. 2006 (23)	túlreprezentált a pNET+PAcT vs. NP összehasonlításban
miR-143-3p	0,0240	110	43	Jiang et al. 2015 (19)	túlreprezentált az INS vs. hasnyálmirigy-szigetsejtekben

henriettbutz_199_24

miR-451a	0,0257	198	74	Jiang et al. 2015 (19)	túlreprezentált az INS vs. hasnyálmirigy-szigetsejtekben
miR-25	0,0153	383	138	Zimmermann et al. 2018 (25)	túlexpresszált a metasztatikus vs. primer GEP-NET-ben
miR-425-5p	0,01781	111	47	Zimmermann et al. 2018 (25)	túlexpresszált a metasztatikus vs. primer GEP-NET-ben
miR-93-5p	0,0240	286	117	Grolmusz et al. 2018 (24)	magasabb expresszió a magasabb grádusú pNET-ben
miR-16-5p	0,0320	9670	3475	Zimmermann et al. 2018 (25)	negatív korreláció a Ki-67-tel GEP-NET-ben
miR-203a-3p	0,0715	19	56	Roldo et al. 2006 (23)	túlreprezentált az INS vs. NF-pNET összehasonlításban
PCC					
miRNS	korrigált p-érték	Kontrol	PCC	Hivatkozás	
		átlagos UMI szekvencia olvasat szám (read number)			
miR-101-3p	0,0273	209	56	Zong et al.2015 (26)	magasabb expresszió a malignus vs. jóindulatú PCC-ben
				Patterson et al. 2012 (29)	magasabb expresszió az SDHD mutációval társuló tumorokban a sporadikus esetekhez képest
miR-16-5p	0,0139	9670	2423	Meyer-Rochow et al. 2010 (27)	a malignus vs. jóindulatú PCC között eltérően expresszáldott
miR-451a	0,005	198	39	Meyer-Rochow et al. 2010 (27)	alulreprezentált a malignus vs. jóindulatú PCC-ben

Megbeszélés. Adataink alacsony globális miRNS-expressziót (abundanciát) mutattak a pNET/PPGL betegek szérumban a normál kontrollokhöz képest, hasonlóképp a PitNET betegektől nyert vérmintákhoz [121]. Érdekes módon a tumorszövetekben a miRNS-ek általános downregulációját is kimutatták az egészséges szövetekhez képest, ami arra utal, hogy a miRNS-ek onkogén helyett általános tumorszuppresszív szerepet játszanak ebben a tumortípusban [259]. Az egyedi miRNS-mérések alapján Mitchell és munkatársai szerint a tumor jelenléte nem vezet a keringő miRNS-ek általános növekedéséhez. Azonban egy-egy specifikus, tumorból származó miRNS fokozott expressziót mutathat a keringésben [260]. További kutatásra várnak mind az endokrin tumorokkal kapcsolatos csökkent globális miRNS-expresszió okai, mind a keringésben betöltött szerepük.

A nagy abundanciájú sejtmentes keringő miRNS-ek elsősorban a vérből és az endotélsejtekből származnak. A tumorból származó miRNS-ek valószínűleg a mérsékelt vagy alacsony abundanciájú miRNS-ek között vannak, ami kiemeli az ebben a tartományban expresszáldó miRNS-ek pontos kimutatásának fontosságát [260–262]. A kontrollokhöz képest emelkedett expressziót mutató miRNS-ek származhatnak közvetlenül a tumorszövetekből is [260]. Ezeket a szöveti miRNS-expresszióval való összevetésével 3 miRNS-t azonosítottunk, amelyek mind a szövetekben, mind a keringésben általánosan diszreguláltak. A miR-203a-3p mind a pNET-szövetben, mind a szérumban felülreprezentált volt. A mi eredményeinkhez hasonlóan emlőrákban ugyanaz a miR-203a-3p mind szöveti szinten, mind a tumorsejtek által szekretált exoszómákban szintén felülreprezentált volt [263, 264]. Funkcionálisan onkogén hatást fejt ki vastagbél- és emlőrákban a Myc-en keresztül, és befolyásolja a

taxánérzékenységet [263, 265, 266]. Ezek az adatok felvetik annak lehetőségét, hogy a miR-203a-3p potenciálisan tumorsejtekből származhat, és oncomiR-nek tekinthető. A NET-ben szenvedő betegek szérumban való alacsony előfordulása azonban korlátozza széles körű klinikai alkalmazhatóságát tumormarkerként. A szérumban csökkent expressziót mutató miRNS-ek közül a miR-16-5p és a miR-451a PPGL szövetekben is hasonlóan kisebb mennyiségben expresszálódik az egészséges szövetekhez képest, ami felveti potenciális tumorszuppresszor szerepét, melyet más daganatokban is leírtak már [267, 268].

Míg a 33 miRNS expressziós mintázata alapján még PPI-kezelés mellett is el tudtuk különíteni a pNET/PPGL betegeket a normál kontrolloktól, addig a szérumban miRNS profilja alapján nem tudtuk megkülönböztetni a pNET és a PPGL betegek mintáit. Ez tükrözheti a daganatok közös enterokromaffin sejtípus eredetét [269].

Az NGS-adatok alapján számos miRNS mutatott (többnyire inverz) korrelációt a szérumban CgA-szinttel, amely validálás után csak az egészséges egyéneknél maradt szignifikáns, pNET vagy PPGL betegeknél azonban nem (kivéve a PPGL betegeknél a miR-486-5p-t). Ennek oka lehet a CgA-val korrelációt mutató miRNS-ek nagy többségének a tumorigenezis során bekövetkező elvesztése vagy technikai problémák. A PPI-kezelés hatására megnövekedett CgA-szint csökkenti a CgA klinikai hasznosságát neuroendokrin tumorokban. A pNET-mintákban a CgA önmagában kevésbé hatékony az egészséges kontrolloktól való elkülönítésben, míg miRNS-ek hozzáadása a CgA-hoz növelte a CgA diagnosztikai értékét. Talán a legfontosabb, hogy a normál CgA-szinttel rendelkező pNET betegeknél, ahol a CgA önmagában nem volt informatív, a CgA és egy miRNS panel kombinációja magas diagnosztikai értéket tudott elérni (AUC: 0,904). A pNET betegeknél a Ki-67 proliferációs index alapján meghatározott tumor grádus fontos hatással van a prognózisra. (44). Bár vizsgálatunk korlátját az alacsony mintaszám jelenti, de a miR-451a, a let-7i-5p és a miR-30d-5p expressziója pNET-betegeknél tendenciaszerűen inverz korrelációt mutatott a grádussal.

Korábban pNET-ben csak egy tanulmány vizsgálta a keringő miRNS-szinteket az egészséges kontrollokhoz képest [248]. A szerzők nagyon hasonló miRNS-expressziós profilt találtak az egészséges önkéntesekéhez képest [248]. Egyedül a miR-193b-t írták le, amely a betegek szérumban nagyobb mennyiségben fordult elő, és a pNET-szövetben is nagyobb mennyiségben fordult elő, mint a szigetsejtekből [248]. Egy másik vizsgálatban 5 miRNS-t azonosítottak, amelyek a pNET-hez képest eltérően expresszálódtak a hasnyálmirigy duktális adenokarcinómával rendelkező betegek szérumban, de nem végeztek összehasonlítást a pNET és az egészséges kontrollok között. [270]. Ezen 5 miRNS egyike sem mutatott átfedést a pNET vs. kontrollok összehasonlításában kapott eredményeinkkel. Egy friss publikációban 6 emelkedett és 11 csökkent expressziójú miRNS-t azonosítottak nem ismert szövettani típusú pNET betegek plazma exoszómafrakciójában, összehasonlítva a krónikus hasnyálmirigy-gyulladásos betegekkel [271]. Ezzel a vizsgálat szintén nem mutatott hasonlóságot adatainkkal, bár más volt a kiindulási anyag (plazma exoszóma vs szérumban), más a mérési módszert alkalmazták, és krónikus pankreatitishoz hasonlították az adataikat.

IV.3. A DNS metiláció-demetiláció, mint epigenetikai módosító mechanizmus vizsgálata hipofízis neuroendokrin tumorok viselkedésében

IV.3.1. A DNS metilációs-demetilációs eltérések és azok klinikopatológiai paraméterekkel való összefüggéseinek vizsgálata hipofízis neuroendokrin tumorokban

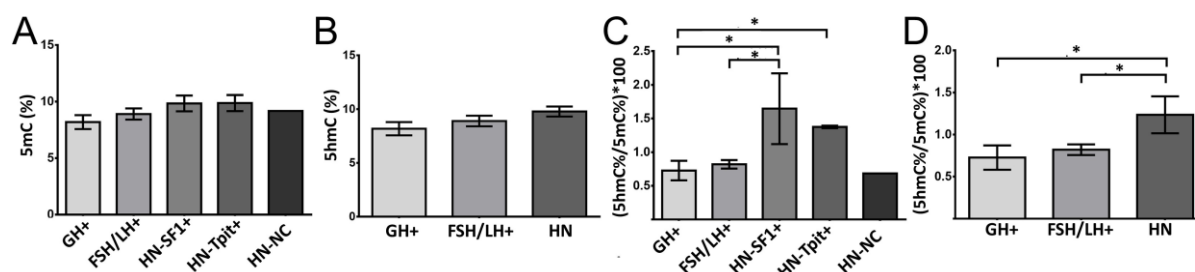
A PitNET-szövetekből származó globális DNS metilációs-demetilációs státuszának meghatározásához a citozin három különböző formáját (citozin (C), 5-metil-citozin (5mC) és 5-hidroximetilcitozin (5hmC)) mértük tömegspektrometriás módszerrel. Vizsgáltuk az 5hmC/5mC arányt is ((5hmC/5mC)*100) a demetilációs állapot jellemzésére.

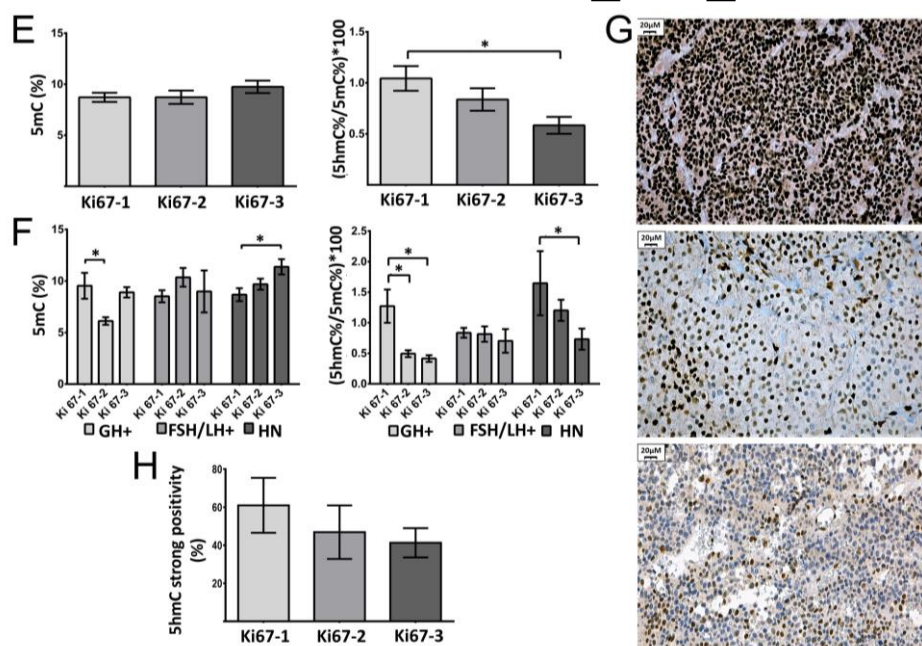
IV.3.1.1. DNS metiláció-demetiláció PitNET szövetekben

45 friss fagyasztott PitNET szövetből kivont DNS-mintát elemezve nem mutattunk ki statisztikailag szignifikáns különbséget az 5mC% tekintetében a különböző szövettani csoportokat összehasonlítva, azonban az FSH/LH+ és HN mintákban növekvő tendenciát figyeltünk meg a GH+ tumorokhoz képest (**44A-B ábra**). Az 5hmC% és az 5hmC%/5mC% arány magasabb szintje igazolódott viszont a HN-SF1+ és HN-Tpit+ csoportokban az FSH/LH+ és GH-termelő PitNET daganatokhoz képest (**44C-D ábra**).

Alacsonyabb 5hmC%-ot és 5hmC%/5mC% arányt észleltünk a magas proliferációval rendelkező (Ki-67-1: 1-2%; Ki-67-2: 3-4% és Ki-67-3: >4%) tumorokban ($p=0,021$), függetlenül a tumorcsoporttól (**44E ábra**). A szövettani csoportok szétválasztása után azonban ez a jelenség leginkább a HN adenomákra volt jellemző, ahol az 5mC nőtt, az 5hmC pedig csökkent a magasabb Ki-67 indexű mintákban (**44F ábra**). Negatív korrelációt találtunk az 5hmC%/5mC% arány és a Ki-67 proliferációs index között (Spearman $R=-0,40$; $p=0,005$). Hasonlóképp, immunhisztokémiai vizsgálattal a magasabb Ki-67 proliferációs aktivitással rendelkező mintákban detektáltunk alacsonyabb az 5hmC-szintet (**44G-H ábra**).

44. ábra. PitNET szövetek DNS-metilációja/demetilációja. (A-D) 5mC%, 5hmC% és 5hmC/5mC arány különböző PitNET altípusokban. (E-F) PitNET daganat szövetek DNS metilációja/demetilációja a különböző Ki67 csoportok függvényében. Ki67-1 csoport: 1-2%; Ki67-2 csoport: 3-4%; Ki67-3. csoport: >4%. (G) Az 5hmC immunhisztokémia reprezentatív PitNET és normál hipofízis mintái. (H) Az 5hmC immunhisztokémia kvantitatív elemzése Ki-67 csoportok függvényében hasonló eredményt adott a HPLC-MS/MS módszerrel mértekhez



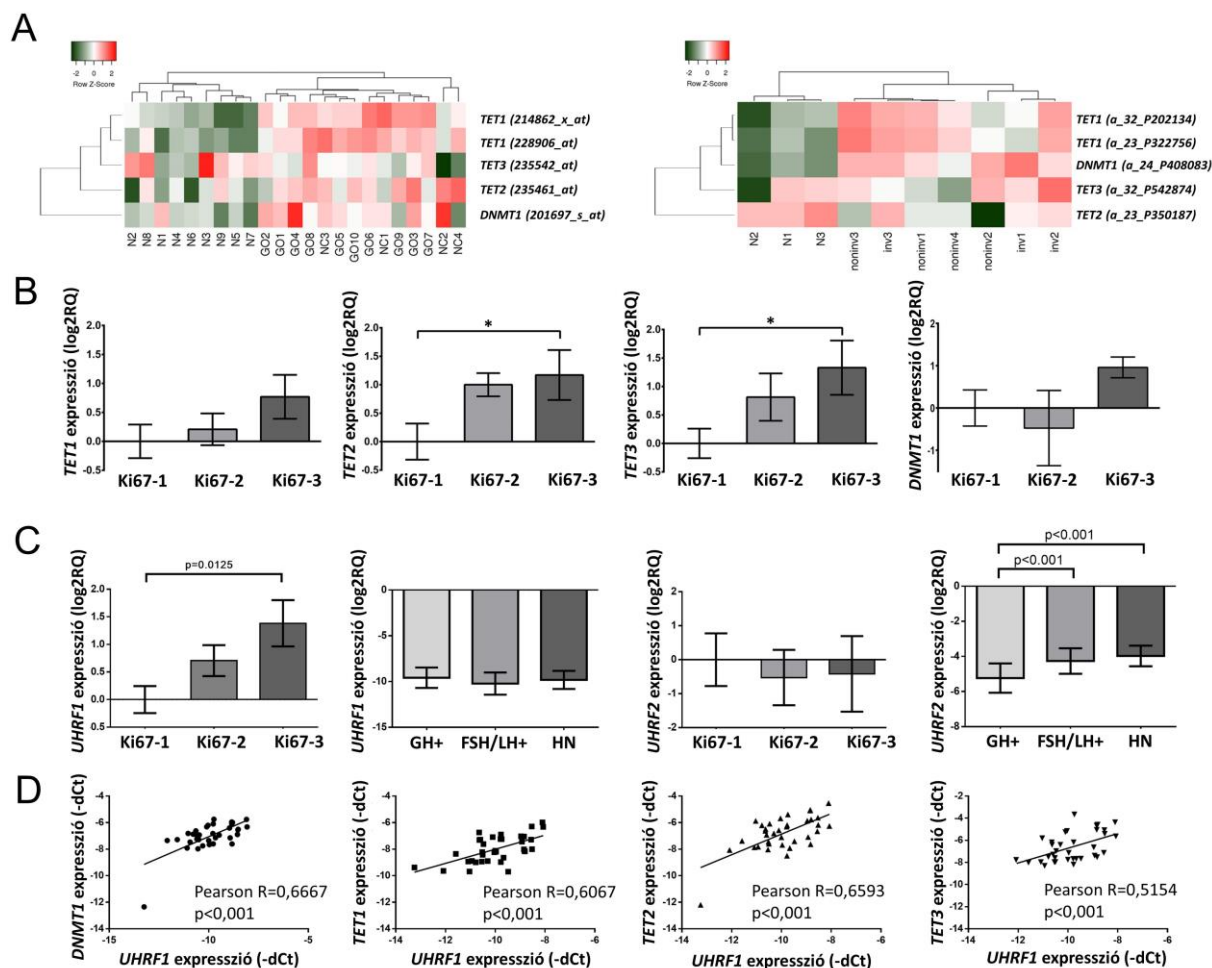


IV.3.1.2. DNMT1 és TET enzimek és kofaktoraik expressziója a demetilációs eltérések hátterében

Mivel a DNMT1 és a TET (ten-eleven transzlokáz) enzimek részt vesznek a metilációs-demetilációs folyamatban, a Gene Expression Omnibusból kikerestük génexpressziójukat PitNET daganatokban (GSE26966 és GSE51618 tanulmányok) [272, 273]. A DNMT1 és a TET gének expressziója alapján a normál hipofízis és a PitNET szövetek hierarchikus klaszterelemzéssel egyértelműen elkülöníthetők voltak egymástól. Emellett expressziójuk magasabb volt a PitNET szövetekben, de a szövettani típus vagy az invazív/nem invazív státusz alapján nem volt megfigyelhető egyértelmű különbség (45A ábra). Validálásként 41 PitNET-szövetmintában qRT-PCR-rel a TET2 és a TET3 expressziója szignifikánsan magasabb volt a magasabb proliferációs rátájú adenomákban, a TET1 ehhez hasonló tendenciát mutatott (45B ábra).

Az UHRF1 (DNMT1 kofaktor) fokozatosan emelkedett expressziót mutatott a jobban proliferáló daganatokban, függetlenül a szövettani altípustól, míg az UHRF2 (TET enzimek kofaktora) génexpressziója alacsonyabb volt a GH-termelő PitNET-ben a gonadotrop daganatokhoz képest, de expressziója nem különbözött a proliferációs arány szerint (45C ábra). Az UHRF2 expresszió és az 5hmC szint között pozitív korrelációt (Pearson R: 0,370; p=0,026) mutattunk ki, míg az UHRF1 expresszió és az 5mC szint között nem találtunk szignifikáns összefüggést (p=0,88). Az UHRF1 expressziója korrelált a DNMT1 és a TET1-3 gének expressziójával is (45D ábra).

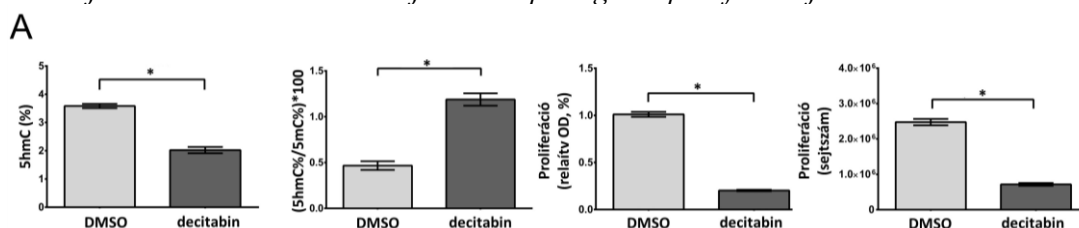
45. ábra. (A) TET1-3 és DNMT1 expresszió PitNET szövetekben a Gene Expression Omnibus (GEO) GSE26966 és GSE51618 vizsgálatokból (GSE26966: 9 normál, 10 gonadotróp, 4 nullsejtes; GSE51618: 3 normál, 3 invazív, 4 nem invazív PitNET minta). A zöld az alacsonyabb, a piros a magasabb expressziót jelzi. (B) A TET1-3 és DNMT1 expresszió a Ki-67 által meghatározott csoportokban. (C) Az UHRF1 és UHRF2 expresszió különböző típusú PitNET szövettani csoportokban és a Ki-67 függvényében. (D) Korreláció az UHRF1 és DNMT1, TET1-3 expressziók között

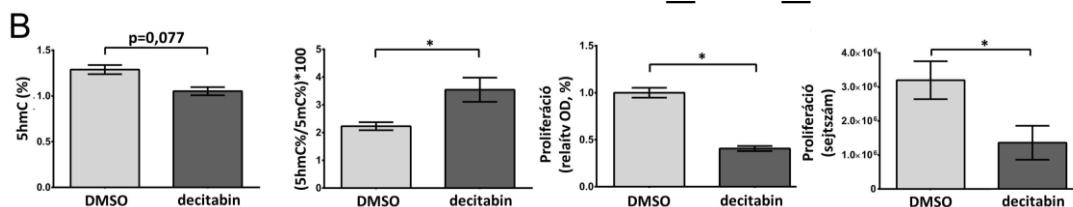


IV.3.1.3. In vitro decitabin kezelés pitNET sejteken

A decitabin (5-Aza-2'-deoxicitidin) a DNMT1 gátlása mellett bizonyítottan emeli az 5hmC szintjét (22). PitNET RC-4B/C és GH3 sejtek decitabine kezelés (10 μ M) hatására mindkét sejtvonalban csökkent 5mC és megnövekedett 5hmC szintet mutattunk ki (46A-B ábra). Emellett a sejtek életképességének és proliferációjának csökkenése volt megfigyelhető (46A-B ábra).

46. ábra. Az 5mC, 5hmC/5 mC arány és a sejtproliferáció (metabolikus teszttel és abszolút sejtszámmal) változása decitabin kezelés hatására (A) GH3 és (B) RC-4B/C PitNET sejtekben. A kezelés mindkét sejtvonalon jelentősen csökkentette a sejtek életképességét és proliferációját





Megbeszélés. Az elmúlt évtizedekben számos betegségben, köztük a daganatokban is felmerült az epigenetikai változások, például a DNS citozin bázisok metilációjának jelentősége [274]. Később az 5-hidroximetilcitozin (5hmC) jelentőségét és szintjét, mint stabil epigenetikai jellemzőt több tanulmány leírta [47, 275].

PitNET daganatokban a teljes genom metilációt olyan nagyátersztőképességű metilációs vizsgálatokkal elemezték, amelyek "csak" a gének promótereinek bizonyos CpG-szigeiteit célozzák. Jelen munkánkban a teljes genomi DNS metilációs-demetilációs mértékét vizsgáltuk nagy teljesítményű folyadékkromatográfiás tandem tömegspektrometriával (HPLC-MS/MS), amely érzékenysége mellett a különböző citozin intermedierek, mint például az 5mC és 5hmC megkülönböztetésére is képes az array-alapú módszerekkel ellentétben.

A sejtdifferenciálódás és a proliferáció két fontos folyamat, amelyek nagymértékben befolyásolják a DNS metilációs-demetilációs szintjét [276]. A fejlődési folyamatokban az 5hmC-nek kulcsszerepe van, amely különbözik az 5-metilcitozin (5mC) szerepétől. Különösen a sejtek dedifferenciált állapotaiban dúsul az 5hmC a felnőtt szövetekhez képest [277]. Ez összhangban van eredményeinkkel, melyekben az 5hmC (és az 5hmC/mC arány) szignifikánsan magasabb volt az előző lebeny hormon-negatív (HN) PitNET-ekben az FSH/LH+ és GH+ tumorokhoz képest. Hasonlóképpen, a gonadotrop daganatok tekintetében az 5hmC (és az 5hmC/5mC) szintén emelkedett volt a HN-SF1+ adenomákban, amelyek a gonadotrop vonal kevésbé differenciált állapotának tekinthetők az FSH/LH+ PitNET-hez képest.

A sejtproliferáció vonatkozásában, az 5hmC csökkenését több olyan sejttípusban is megfigyelték, amelyek erősen proliferatívak a legkülönbözőbb daganattípusokban [50]. Ezzel egyhangzóan a PitNET szövetekben is alacsonyabb 5hmC-szintet (és a demetilációt jelző 5hmC/5mC arányt) észleltünk a magasabb Ki-67 indexű mintákban.

A metilációs-demetilációs folyamat fő szabályozói a DNS-metiltransferázok (DNMT-k) és tíztizenegy transzlokáz (TET) enzimek [50]. A PitNET-szövetekben magasabb *DNMT1* és *TET* enzim expressziót találtunk a normál hipofízis szövetekhez képest, de nem figyeltünk meg ezek összefüggését szövettani típussal vagy az invazív/nem invazív státusszal. Emellett a *TET2* és *TET3* gének expressziója szignifikánsan magasabb volt a magasabb proliferációs rátával rendelkező PitNET-ben a kevésbé proliferatív tumorokhoz képest, míg a *TET1* és a *DNMT1* hasonló tendenciát mutatott mindkét csoportban. Ezek az adatok összhangban vannak a microarray adatokkal, ahol a DNMT-k overexpresszióját mérték PitNET szövetekben, és a magasabb expresszió szignifikánsan agresszívabb fenotípussal társult. Sőt, a *DNMT1* overexpressziója szignifikánsan magasabb volt a makroadenomákban és az invazív PitNET-ben a kisebb, illetve a nem-invazív daganatokhoz képest

[278]. A *DNMT1*-gyel ellentétben a *TET* gének expressziójára vonatkozóan a PitNET szövetekből korábban állt rendelkezésre adat. Vizsgálatunkban a magasabb proliferatív tumorokban fokozott *TET1-3* expressziót találtunk, ami csökkent 5hmC/mC aránnyal társult, ami egyben csökkent enzimaktivitásra utal. Hasonlóképp, Chen és munkatársai vesedaganatokban erős TET enzim expressziókat írtak le alacsony 5hmC-szinttel társulva [279].

Az UHRF (Ubiquitin-like with containing PHD and RING Finger domain) fehérjecsalád fontos szerepet játszik a metilációs-demetilációs folyamatban. Az UHRF1 egy multidomain fehérje, amely felismeri a hemimetilált DNS-t és a DNMT1-et a replikációs fókuszokhoz lokalizálja, ezért felelős a DNS-metilációs mintázat öröklődésének megőrzéséért a sejtciklus során [280]. Az *UHRF1*-et a ciklinfüggő kináz 2 és a ciklin A szabályozza, és a proliferáló sejtekben nagymértékben expresszálódik [280, 281]. Számos daganatban fokozott expresszióját írták le, és az *UHRF1* kiütése csökkentette a sejtek növekedését, migrációját, invázióját, valamint elősegítette az apoptózist [280]. Ezzel összhangban a Ki-67 index alapján fokozatosan megnövekedett expresszióját találtuk PitNET daganatokban. Az *UHRF2* az *UHRF1* közeli rokona és szerkezetileg hasonló homológja, működésük mégsem redundáns [282, 283]. Potenciális tumorsuppresszor génként írják le, mivel képes apoptózist indukálni [282]. PitNET sejtekben pozitív korrelációt találtunk az 5hmC-szintekkel, hasonlóan más tumorokhoz [283]. Ezért az UHRF család tagjai potenciálisan epigenetikai markerek lehetnek az 5hmC-szinttel együtt a PitNET-ben, ami a proliferatív viselkedést jelzi [280, 284].

A szakirodalmi adatok és eredményeink (magasabb 5mC és alacsonyabb 5hmC és 5hmC/5mC) azt sugallták, hogy a metiláció megváltoztatása a PitNET új terápiás megközelítése lehet. Ezért az FDA által jóváhagyott DNS-metiltranszferáz (DNMT) gátlóval, decitabinnal (5-aza-2'-deoxicitidin) kezeltünk PitNET sejteket [285]. A decitabin csökkenti az 5mC globális szintjét, és a TET enzimek DNS-hez kötött frakciójának fokozása révén paradox módon az 5hmC növekedését is eredményezi [286]. Ezzel összhangban decitabin kezelés hatására az 5mC szintje csökkent, az 5hmC szintje pedig nőtt mindkét PitNET sejtvonalban. Emellett a decitabin kezelés jelentősen visszaszorította a sejtek életképességét és a sejtproliferációt is. A decitabin más tumorsejtek, többek között a krónikus mielomonocitás leukémia, az akut mieloid leukémia, a petefészekrák, a vastagbélrák sejtvonalak és a hasnyálmirigy neuroendokrin tumorsejtek proliferációját is gátolta [124, 287]. A DNS-metiláció globális gátlásával hat mind a daganatsejtekben kórosan, mind az egészséges sejtekben epigenetikus folyamatok által elnémított génekre [288]. A tumor kialakulása során számos, a sejtnövekedéshez hozzájáruló vagy túlélési előnyt biztosító útvonal elnémul, ezért a decitabin kezelés kedvező hatást fejthet ki ezen jelátviteli útvonalak aktiválásával [288]. Az agyalapi mirigyet illetően egy DNMT és egy hiszton-deacetiláz (HDAC) inhibitor kombinált *in vitro* adása helyreállította az epigenetikusan elnémított dopaminreceptor (*DRD2*) gén expresszióját a *DRD2* promóter részleges demetilálása révén [289]. Ez arra utal, hogy az epigenetikai modulátorok potenciális új terápiás megközelítések lehetnek, különösen kombinációban (akár HDAC-gátlókkal, akár hagyományos terápiával), ami a terápiarezisztens PitNET daganatok potenciális reszenzibilizációjához vezethet [290].

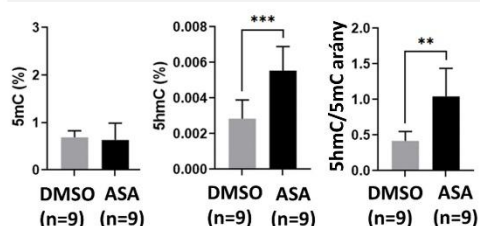
IV.3.2. Az epigenetikai módosítók hatásmechanizmusa és potenciális terápiás alkalmazása hipofízis neuroendokrin tumorokban

IV.3.2.1. DNS metiláció-demetiláció változás aszpirin kezelés hatására

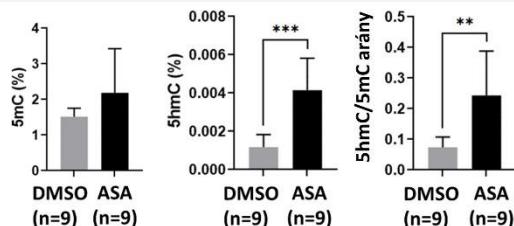
A globális metiláció-demetiláció szinteket HPLC-MS/MS módszerrel határoztuk meg RC-4B/C és GH3 sejtekben végzett aszpirin (ASA) kezelést követően. RC-4B/C sejtekben 5hmC (FC: 1,95; $p=0,0003$) és 5hmC/5mC (FC: 2,49; $p=0,0012$) arány szignifikáns növekedését detektáltuk (**47A ábra**). GH3 sejtekben hasonló eredményeket találtunk: mind az 5hmC (redőváltozás: 3,5; $p=0,0005$), mind az 5hmC/5mC arány emelkedett (hajtváltozás: 3,28; $p=0,0078$) a kezelés hatására (**47B ábra**). A metiláció-demetiláció kört szabályozó enzimek és kofaktoraik expressziója ennek megfelelően változott (**47C-D ábra**). A *Tet1*, 2 és 3 gének kifejeződése szignifikáns korrelációt mutatott az 5hmC-vel mindkét sejtípusban (**47E ábra**).

47. ábra. Az ASA hatása a DNS-metiláció-demetilációra. A globális metiláció-demetiláció változása RC-4B/C (A) és GH3 (B) sejtekben. Génexpressziós változások (*Dnmt1*, *Tet1-3*) a globális metiláció/demetiláció mögött RC-4B/C (C) és GH3 (D) sejtekben. (E) Az 5hmC és a demetilációs enzimek közötti korreláció

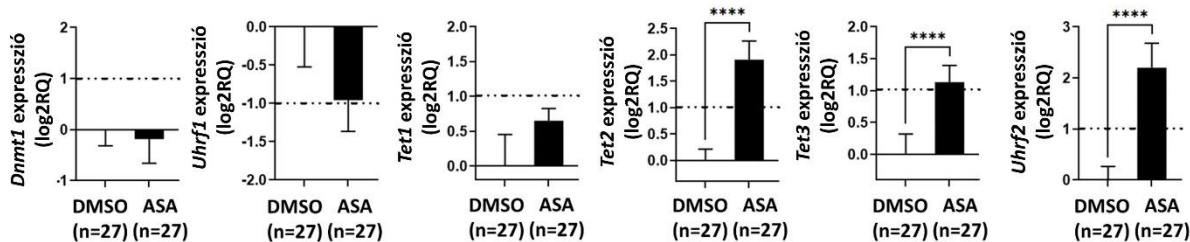
A Globális metiláció/demetiláció változás – RC-4B/C



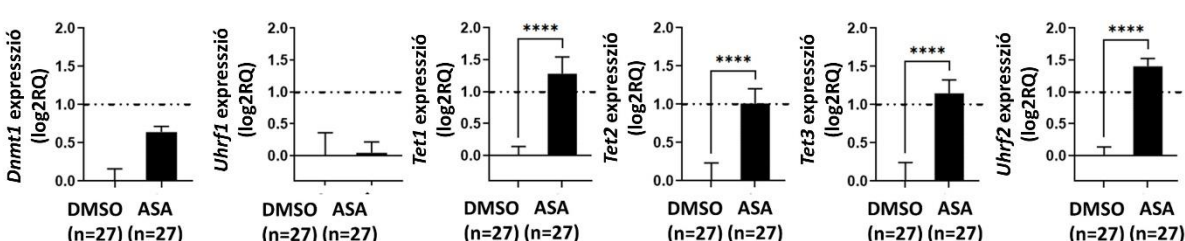
B Globális metiláció/demetiláció változás – GH3

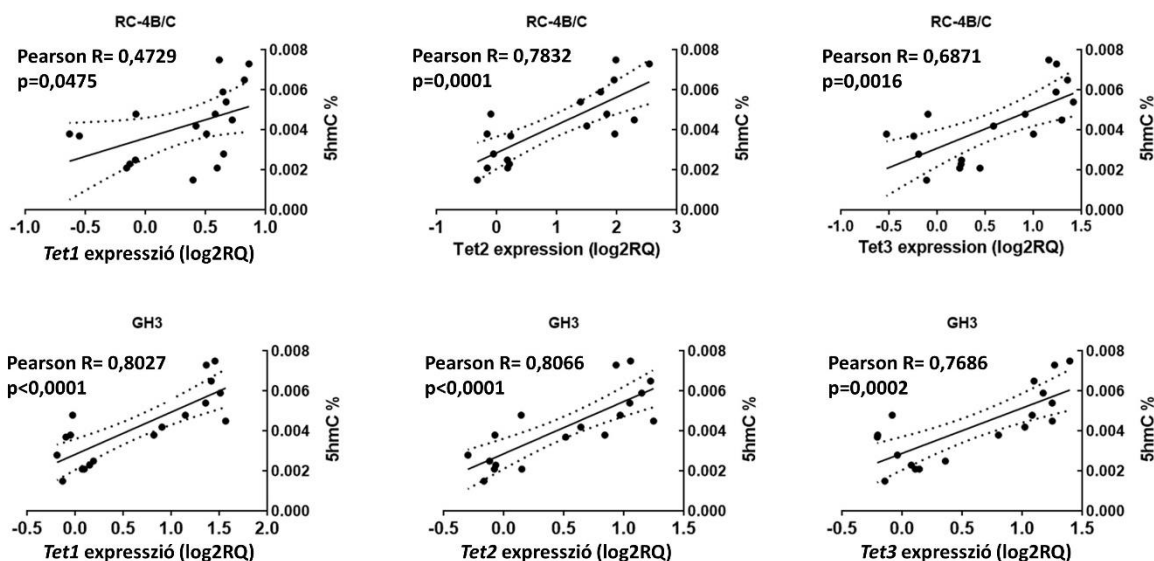


C Génexpressziós változások a globális metilációs/demetilációs eltérések mögött – RC-4B/C



D Génexpressziós változások a globális metilációs/demetilációs eltérések mögött – GH3

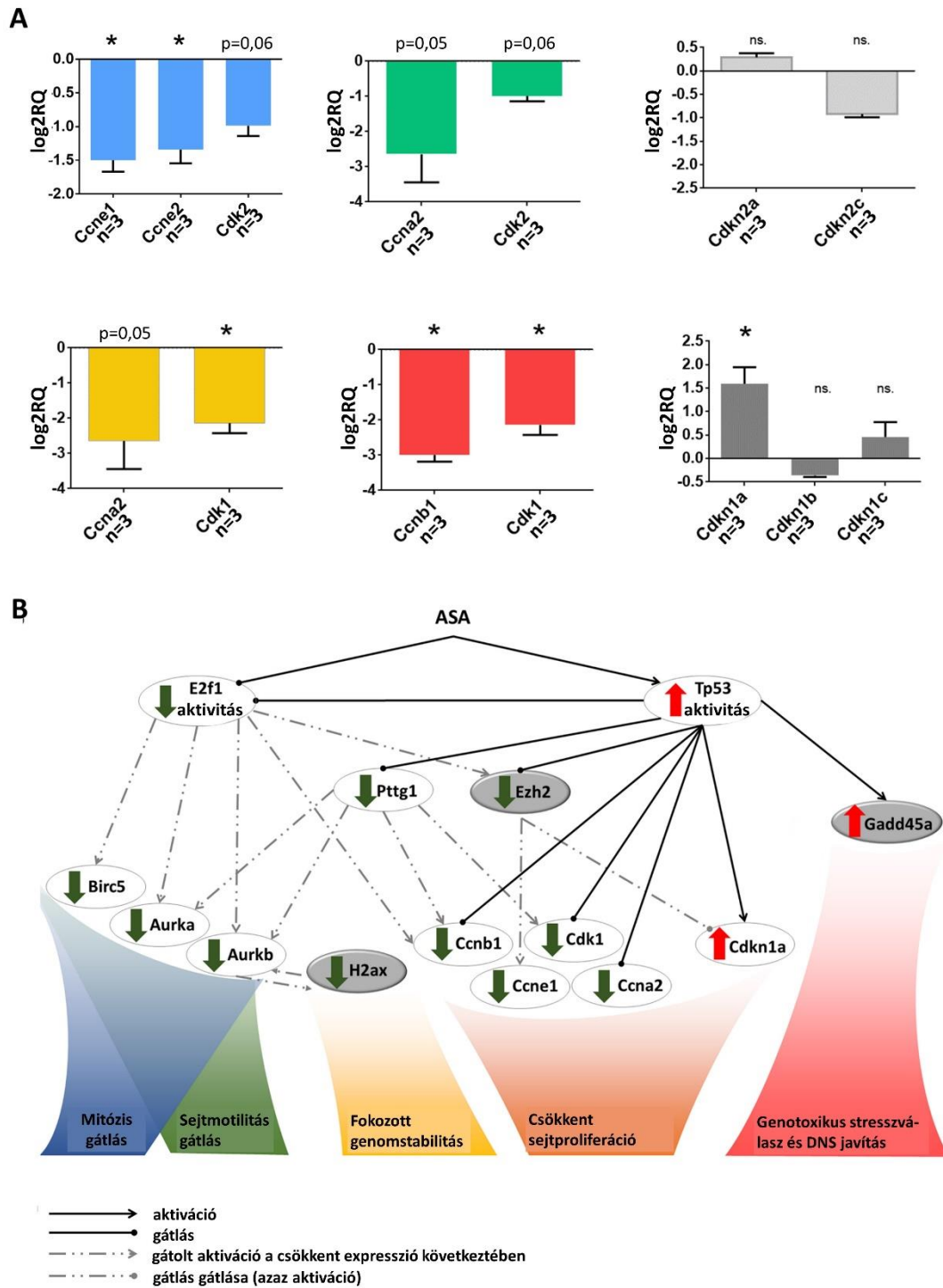




IV.3.2.2. A globális transzkriptom változás aszpirin kezelést követően a sejtciklus és a proliferáció gátlását jelzi

Mivel a globális DNS-demetiláció jelentős változást mutatott az ASA-kezelés után, megvizsgáltuk annak következményét, a globális transzkriptom változását 5 mM ASA kezelést követően PitNET sejtekben. Mind a hierarchikus klaszterezés, mind a dimenzióredukciós analízis alapján az ASA jelentős hatással volt a teljes génexpressziós profilra. Az útvonal- és génontológiai elemzés alapján a leginkább érintett útvonal a sejtciklus („Cell cycle”) volt. Ezt megerősítette a génközösinterakció hálózatelemzése is, amely feltárta az ASA tumorelles hatását szabályozó 10 legfontosabb gént transzkripció szinten (*Mad2l1*, *Pcna*, *Ube2c*, *Mcm4*, *Chek2*, *Brca1*, *Smc4*, *Cdc45*, *Cdk2*, *Rbx1*), melyek sejtproliferációt, sejtosztódást, DNS-károsodásra adott választ és az ubiquitinációt szabályozzák. Az ASA sejtciklusra gyakorolt hatásának nettó kimenetelét a Ki-67 jelentős csökkenése képviselte (log2FC: -2,66; p = 2,71E-04). Ezenkívül több, a proliferációban, a DNS-javításban és a genom stabilitásában szerepet játszó gén expressziós változását azonosítottuk (48A-B ábra).

48. ábra. (A) A génexpresszió változása a sejtciklus és a proliferáció megváltozása aszpirin (ASA) hatásra. A G1, S, G2 és M sejtciklus fázisokban érintett gének expresszióját sorrendben kék, zöld, sárga és piros szín jelzi. A sejtciklust gátló gének kifejeződéseit szürke szín szemlélteti. (B) Az aszpirin (ASA) genomikus hatása PitNET daganatokban. A szürkével jelölt gének a transzkripció és az epigenomikus szint közötti kapcsolatot képviselik

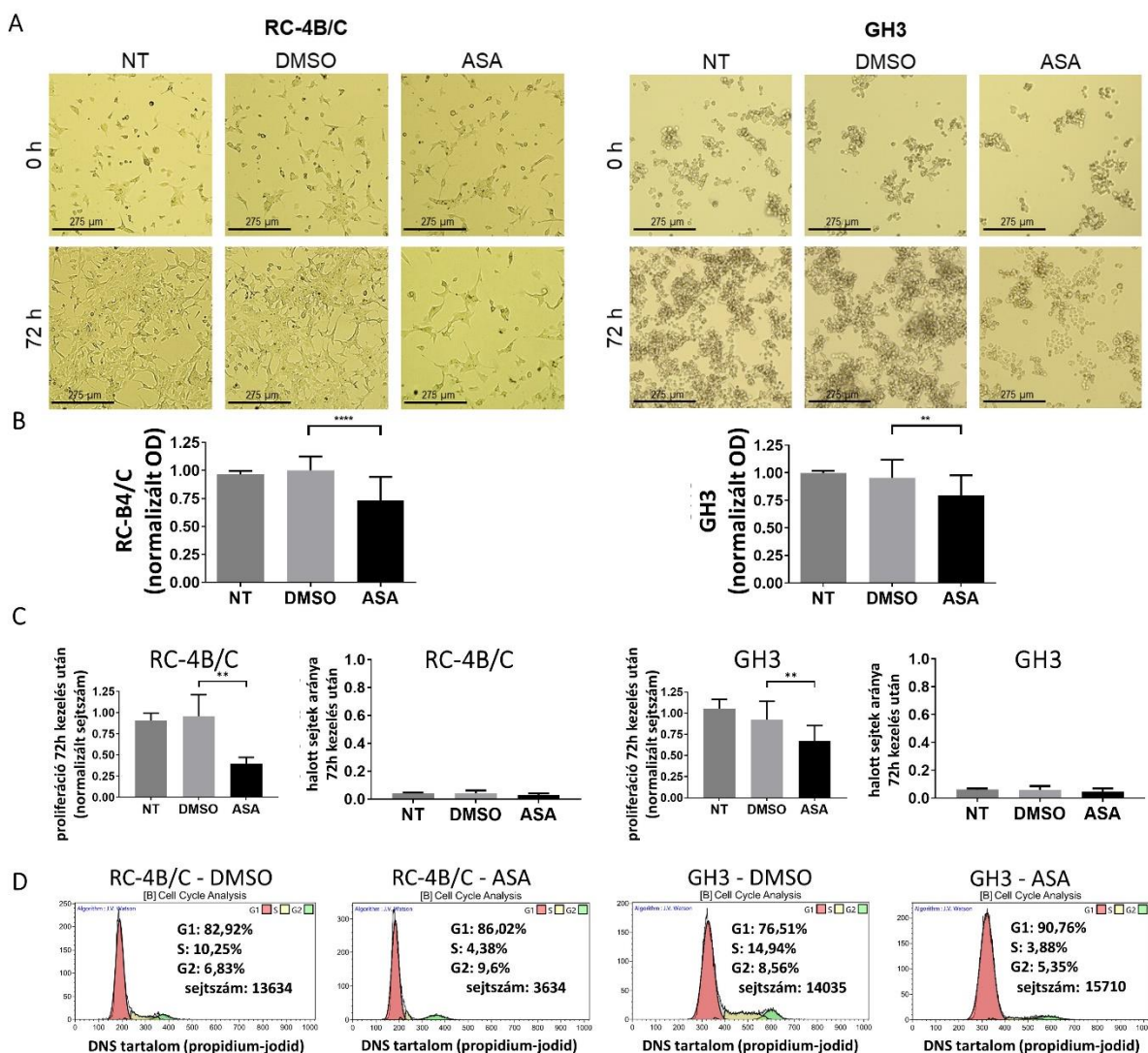


IV.3.2.3. Az aszpirin életképességre, proliferációra és sejthalálra gyakorolt hatásainak *in vitro* funkcionális vizsgálata

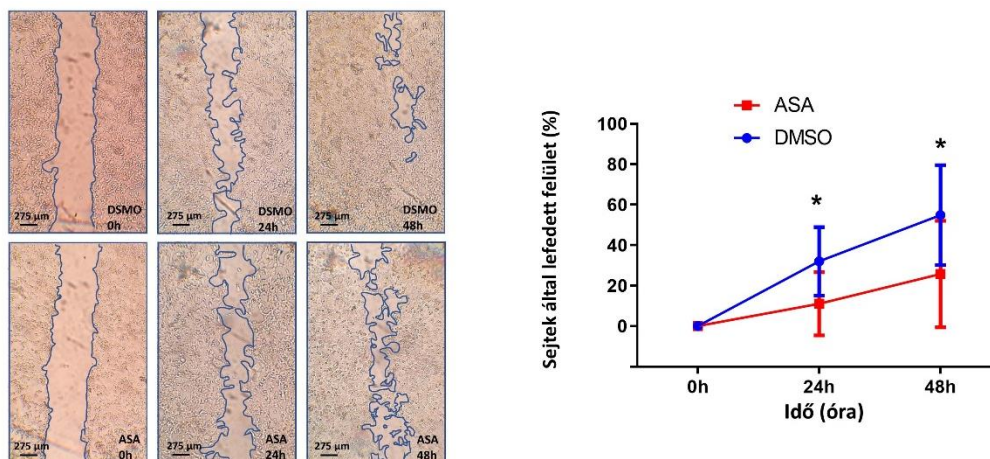
A transzkripciós eredményeket RC-4B/C és GH3 sejtek metabolikus életképességének, sejtprolifерációjának és sejthalálának *in vitro* vizsgálatokkal validáltuk. Az 5 mM ASA kezelés mindkét sejtvonal életképességének és proliferációjának csökkenéséhez vezetett (49A-C ábra). Az áramlási citometriával végzett sejtciklus elemzés alapján csökkent a sejtciklusba belépő sejtek számában és az S fázisban lévő sejtek száma ASA hatására a kontrollhoz képest (4,38% vs. 10,25% és 3,88% vs. 14,94% az RC-4B/C és GH3 sejtekben) (49D ábra). Ezt az ASA kezelést követő csökkent Ki-67 festés is

igazolta a kontroll kezeléssel szemben: 0,09% vs. 0,34% az RC-4B / C sejtekben és 0,34% vs. 1,48% a GH3 sejtekben. Az ASA elhanyagolható hatást fejtett ki az apoptózisra, melyet nem tudtunk bizonyítani sem DNS-degradációs, sem pedig kaszpáz-3 aktivációs teszttel (2,5 mM vagy 5 mM ASA koncentrációknál). Azonban csökkent sejtmigrációt figyeltünk meg az ASA-kezelés során (49E ábra).

49. ábra. Az ASA in vitro funkcionális hatása PitNET sejtekre. (A) RC-4B/C és GH3 sejtek mikroszkópos képei ASA-kezelés után morfológiai értékelés céljából. Az RC-4B/C adherens morfológiát mutat, a GH3 részben adherens, részben lebegő sejtpopulációkkal. A DMSO- vagy ASA-kezelés esetén szignifikáns morfológiai változások nem figyelhetők meg, az ASA-csoportban azonban csökkent sejtszám figyelhető meg. (B) Az ASA-kezelést követően a csökkent proliferációt detektáltunk a kontrollokhoz képest metabolikus teszttel vizsgálva. A DMSO citotoxikus hatását nem észleltük a nem kezelt (NT) csoportban a DMSO kontrollhoz képest. (C) A sejtproliferáció (abszolút sejtszám) csökkent ASA hatásra, szemben a DMSO kontrollal mindkét sejttípusban. A kezelés után egyik sejtvonalon sem detektáltunk megnövekedett élő/halott sejt arányt. (D) Az áramlási citometriával végzett sejtciklus-elemzés a sejtciklusba belépő sejtek számának csökkenését és az S fázisban lévő sejtek számának csökkenését mutatta ASA-kezelés és kontroll kezelés után (4,38% vs. 10,25% és 3,88% vs. 14,94% az RC-4B/C és GH3 sejtekben). (E) Az ASA 34%-ra ($p=0,01$) és 47%-ra ($p=0,02$) csökkentette az RC-4B/C sejtek migrációját 24 és 48 órával a kezelést követően



E



IV.3.2.4. Az aszpirin hatása a transzkripciós faktorok aktivitására

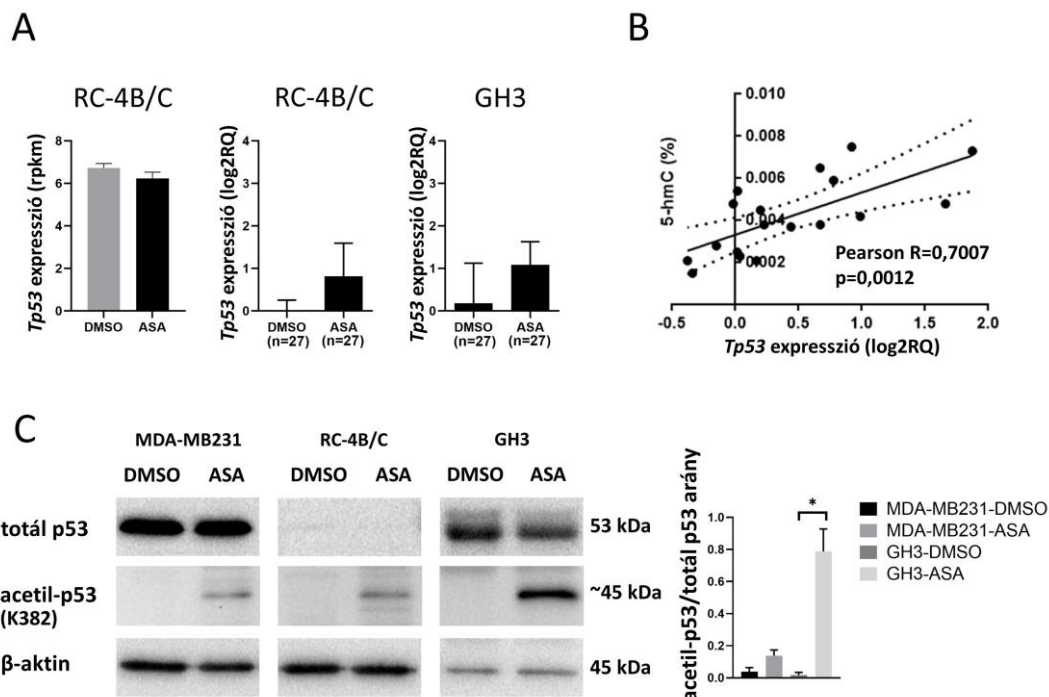
Az ASA kezelést követően 12 transzkripciós faktor genomikus hatását mutattuk ki (20. táblázat). Ezek közül a p53 aktivitás volt a legjelentősebb, számos (n=25) p53 által szabályozott gén mutatott szignifikáns expressziós változást. Ezek között az onkogén hatású *Pttg1* expressziója csökkent ($\log_2FC = -2,36$; $p = 3,275E-05$), a tumorsuppresszor *Gadd45 α* expressziója pedig emelkedett ($\log_2FC = 1,90$; $FDR\ p = 0,0007$) ASA kezelés hatására. Az E2f1 transzkripciós faktor aktivitását az ASA is modulálta, amit a *Birc5* (Survivin) downregulációja is támogatott ($\log_2FC = -1,72$; $FDR\ p = 0,052$).

Bár maga a *Tp53* expresszió nem változott ($p = 0,475$) sem a transzszkriptom adatokban, sem a RT-qPCR validációs méréseink során, az ASA a fehérje acetilációjához vezetett a K382 pozícióban, és szignifikáns pozitív korrelációt mutatott az 5hmC szinttel (50A-C ábra).

20. táblázat. A transzkripciós faktorok aktivitása megváltozott az aszpirinkezelést követően

Transzkripciós faktor	Korrigált p-érték	A transzkripciós faktor által szabályozott gének
TP53	5,28E-06	MCM7; MKI67; FOXM1; AQP3; EGFR; RECQL4; CCNB1; PTTG1 ; GPNMB; CHEK2; CASP3; E2F7; PDGFRB; PLK3; SMAD3; GADD45A; GDF15; PLK1; CCNA2; PRC1; CDK1; KRIAB; ATF3; MAD1L1; EZH2
E2F1	2,47E-05	TOP2A; RRM1; RRM2; HSPA5; PLK1; FANCA; CDC6; FOXM1; AURKB; AURKA; DHFR; CCNB1; RAD51; CHEK2; DDIT3; CDK1; MYBL2; KIF2C; MCM5; ECT2; ASF1B; BIRC5
E2F4	3,52E-04	PLK4; CCNB1; RAD51; PLK1; PCLAF; MCM10; TTK; AURKB
E2F3	7,85E-04	CCNA2; CCNB1; PLK1; CDK1; CDC6; AURKA
TRP53	0,001445	PDGFRB; DUSP4; PLK3; SMAD3; MCM7; GADD45A; GDF15; INSR; FOXM1; CKS1B; CCNA2; PER2; CCNB1; GAP43; KRT19; COL2A1; CASP3; PCBP2; PTGDS; ATF3
E2F4	0,002076	PLK4; MAP1LC3B; RAD51; E2F2; MYBL2
TFAP2A	0,009333	ACHE; CCNB1; CRABP2; GALNT3; TH; CYP11A1; MCAM; CGA; ADRA1A; KRIAB; EGFR
ATF1	0,021081	TOP2A; LDHA; MAP1LC3B; TH; SLC20A1; CGA
ATF4	0,025929	MAP1LC3B; HSPA5; DDIT3; TRIB3; NDC80; ATF3; DDR2
TFDP1	0,025353	DHFR; RRM1; CDK1; MYBL2
XBP1	0,038652	ERN1; HSPA5; GAD1; DDIT3; ERP29
ARNT	0,045694	JUN; GAD1; BHLHE40; AHR; MFSD2A

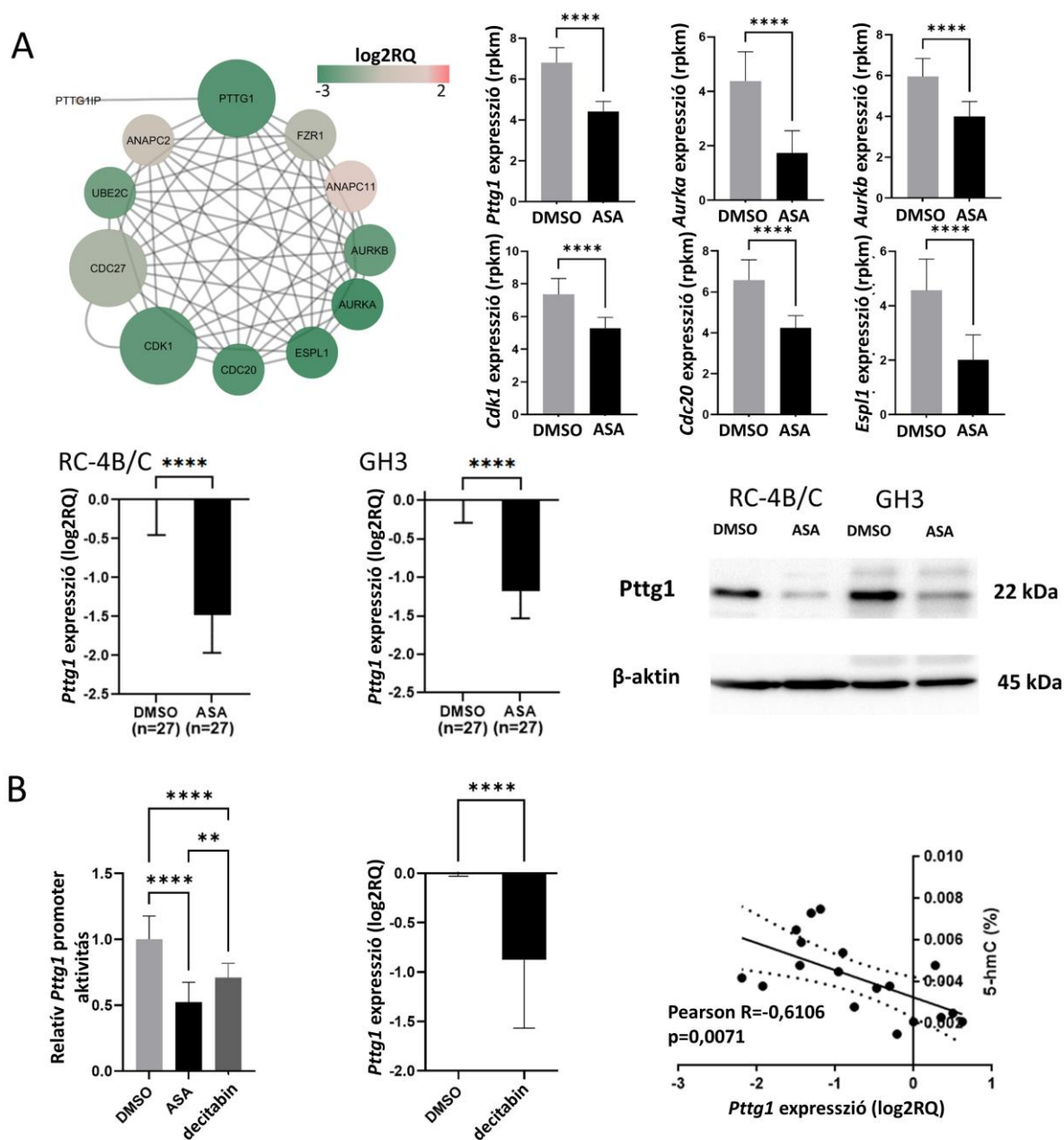
50. ábra. (A) *Tp53* expresszió transzkriptom és RT-qPCR mérésekben (rpkm: Reads Per Kilobase per Million mapped reads, normalizált read szám). (B) A *Tp53* expresszió szignifikánsan korrelált az 5hmC szinttel. (C) A Western blot nem mutatott változást a p53 fehérje összmenyiségében, azonban a kezelés p53 acetilációt indukált K382 pozícióban. Denzitometria, amely az acetil-p53/totál p53 arány ábrázolja. Mivel az RC-4B/C sejtekben nem tudtunk kimutatni p53 fehérjét western blot módszerrel, az acetil-p53/összes p53 arányt csak az MDA-MB231 és a GH3 sejtekre adtuk meg



IV.3.2.5. Az aszpirin hatásmechanizmusa PitNET daganatokban – a demetiláció-p53-*Pttg1* szabályozó kör

Mivel a *Pttg1* tagja a p53 interakciós hálózatának, és a PitNET daganatok tumorogenezisének fő onkogén tényezője, tovább vizsgáltuk funkcióját az ASA kezelés hatására. Mind a *Pttg1*, mind a *Pttg1* interakciós partnereinek expressziója csökkent ASA kezelést követően (51A ábra). A csökkent expresszió hátterében riporter rendszer segítségével vizsgálva a *Pttg1* promoter aktivitás jelentős csökkenését figyeltük meg ASA kezelést követően. Továbbá, mivel az ASA alkalmazásakor szignifikáns negatív korrelációt figyeltünk meg a *Pttg1* expresszió és az 5hmC szint között (51B ábra), vizsgáltuk a globális demetilációs szer, a decitabin hatását is a *Pttg1* promoterre. Azt találtuk, hogy a decitabin *in vitro* csökkentette a *Pttg1* promoter aktivitását.

51. ábra. (A) A *Pttg1* és interakciós partnereinek transzkripciós változása ASA hatására. A *Pttg1* csökkent szintjét RT-qPCR és western blot kísérletek is megerősítették. (B) In vitro luciferáz kísérlet csökkent *Pttg1* promotor aktivitást mutatott ASA és decitabin kezelés után. ASA alkalmazásakor szignifikáns negatív korrelációt figyeltek meg a *Pttg1* expresszió és az 5hmC szint között

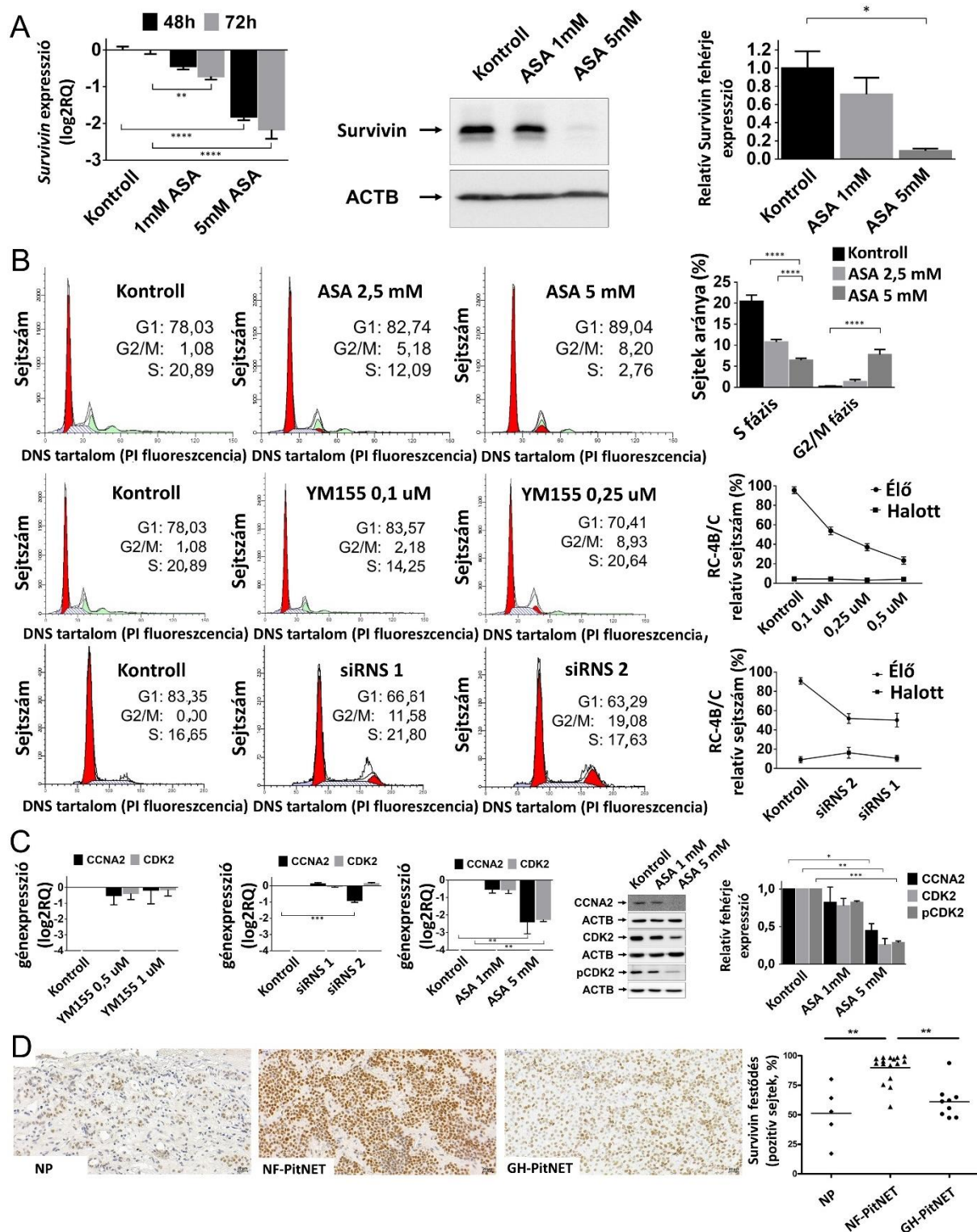


IV.3.2.6. Az aszpirin hatásmechanizmusa PitNET daganatokban – survivin gátlás és sejtciklus szabályozás

Transzkriptom eredmények alapján a Survivin (*Birc5*) az E2f1 transzkripciós hálózatban található célmolekula, amely csökkent expresszióját mutattuk ki ASA kezelés hatására. Ezt megerősítettük mind RNS, mind fehérje szinten: 1 mM és 5 mM ASA-kezelés fokozatosan csökkentette a Survivin mennyiségét mind mRNS, mind fehérje szinten PitNET sejtekben (52A ábra).

hennriettbutz_199_24

52. ábra. A Survivin változása aszpirin kezelés hatására PitNET sejtekben. (A) ASA kezelésre a Survivin expressziója csökken mind RNS, mind fehérje szinten. (B) Sejtciklus és sejtprolifерáció változás ASA, Survivin inhibitor (YM155) és Survivin géncsendesítés (siRNS) hatására. (C) CCNA2 és CDK2 expressziós változások ASA, Survivin inhibitor (YM155) és Survivin géncsendesítés (siRNS) hatására mRNS és fehérje szinten. (D) Survivin fehérje expresszió humán PitNET daganatokban



Annak bizonyítására, hogy az ASA a Survivinen fejt ki hatását, gátoltuk a Survivint egy specifikus kismolekulájú inhibitorral, az YM155-tel, valamint specifikus siRNS-ek alkalmazásával. Mivel mind az ASA, mind a survivin gátlás (siRNS és YM155) növelte a G2/M fázisban felhalmozódó sejtek számát,

henriettbutz_199_24

de csak az ASA csökkentette az S fázisban lévő sejtek százalékos arányát (**52B ábra**), megvizsgáltuk, hogy a kezelések hogyan hatottak a G1/S ellenőrzőpont szabályozókra (CCNA2, CDK2 és p-CDK2). Kimutattuk, hogy a CCNA2, CDK2 és p-CDK2 fehérjék mennyisége mind csökkent ASA-kezelés után, míg a YM155 kezelés vagy a Survivin siRNS transzfekció nem változtatta meg ezeket (**52C ábra**).

34 NF-PitNET, 12 GH-PitNET és 10 normál hipofízis vizsgálatával kimutattuk, hogy a Survivin magasabb expressziót mutat az NF-PitNET ($\log_2\text{RQ}=5,1$; $p=0,0004$) és GH-PitNET ($\log_2\text{RQ}=4,4$; $p=0,0060$) mintákban, melyet immuhisztokémiával is megerősítettünk (**52D ábra**). Így mind funkcionális vizsgálataink, mind a daganatszövetek vizsgálata alátámasztja a survivin esetleges szerepét, mint terápiás célpont.

IV.3.2.7. Az aszpirin által szabályozott gének expressziós mintázata eltérést mutat a humán PitNET daganatokban

Az ASA-hatás klinikai jelentőségének vizsgálatához elemeztük 76 PitNET és 34 normál kontroll minta transzkriptom és fehérjeexpressziós adatait. Az normál és daganatos szövetek között eltérően expresszált gének (3755 gén) felhasználásával kiszűrtük azokat, amelyeket az ASA is szabályozott: a két kohorsz között a gének nagy aránya, 20,15%-a (757/3755) közös volt. A 757 közös gén leginkább a sejtproliferációban, a sejtciklusban játszott szerepet – beleértve a p53 aktivitást és funkciót, de köztük kimutathatóak volt sejt migrációt és genomstabilitást is reguláló gének is (**21. táblázat**).

21. táblázat. A humán PitNET vs. normál hipofízis szövet és az aszpirin által szabályozott gének közötti átfedő gének útvonalelemzése. B&H: Benjamini-Hochberg FDR korrekció

Kategória	Név	Forrás*	q-érték FDR B&H	az érintett gének #/ az útvonal génjeinek #	az érintett gének aránya az útvonalon
p53-hoz kapcsolódó útvonalak	p53 Jelátviteli útvonal	1	3,507E-2	5/16	0,312
	Közvetlen p53 effektorok	2	4,360E-2	15/132	0,113
Proliferációval és sejtosztódással kapcsolatos útvonalak	Retinoblasztóma gén a rákban	1	6,484E-6	20/88	0,227
	DNS-szál megnyúlása	4	9,949E-5	11/32	0,343
	DNS-replikáció	3; 1	1,188E-3	10/36	0,277
	A nukleáris SMAD2/3 jelzés szabályozása	2; 1	2,005E-2	12/77	0,155
	G1-S cellaciklus szabályozás	1	3,507E-2	10/64	0,156
Genomstabilitással kapcsolatos útvonalak	Az ATR aktiválása replikációs stresszre adott válaszként	4	2,193E-2	8/37	0,216

Források*: 1: MSigDB C2 BIOCarta (v7.3); 2: BioSystems: Pathway Interaction Database; 3: BioSystems: KEGG; 4: BioSystems: REACTOME.

Megbeszélés. Eredményeink alapján, azaz, hogy a PitNET daganatokban a DNS-demetiláció megváltozott, és korrelációt mutatott a proliferatív viselkedéssel és a differenciáltsággal [124], valamint irodalmi adatok alapján, hogy az aszpirin epigenetikai hatást fejthet ki bizonyos daganatokban [291] az aszpirin kezelés komplex genomikai és epigenomikai következményeit elsőként vizsgáltuk PitNET-ben.

henriettbutz_199_24

Az aszpirin kezelést követően fokozott globális DNS-demetilációt figyeltünk meg. Ezzel összhangban találtuk a DNS demetilációért felelős enzimek és kofaktoraik expresszióját (*Tet1*, 2, 3 és *Uhrf2*). Érdekes módon a DNS metiláció és az azt szabályozó gének nem mutattak szignifikáns változást (5mC, *Dnmt1*, *Uhrf1*). Mivel a demetiláció (5hmC) pontos mérése és kimutatása kihívást jelent, és speciális műszereket igényel, csak kevés információ áll rendelkezésre az aszpirin kezelés során bekövetkező demetilációs változásokról az irodalomban. Egy metiláció-specifikus PCR-t alkalmazó vizsgálatban Guo és munkatársai kimutatták, hogy az aszpirin a Forkhead Box D3 (FOXO3) gén demetilációját és fokozott expresszióját indukálta [292]. Valamint bizonyították, hogy az aszpirin rendszeres használata drasztikusan csökkentette a tüdőmetasztázisok számát immunhiányos egerekben az FOXO3-OLA1P2-STAT3 tengely szabályozásán keresztül [292]. Vizsgálatainkban az aszpirin egy ettől független szabályozó körét írtuk le PitNET daganatokban, melyben kimutattuk, hogy az aszpirin, valamint a decitabin csökkentette a *Pttg1* promotor aktivitását és a *Pttg1* expresszióját (**53. ábra**). Emellett negatív korrelációt figyeltünk meg a *Pttg1* expresszió és 5hmC szint között, amely jelzi az aszpirin, a demetiláció és a *Pttg1* expresszió összefüggését. Az ASA általi globális demetiláció következtében szignifikáns transzkriptom változást találtunk, mely elsősorban sejtciklussal és proliferációval összefüggő géneket érintett, és melyet *in vitro* funkcionális vizsgálatokkal is megerősítettünk (**53. ábra**).

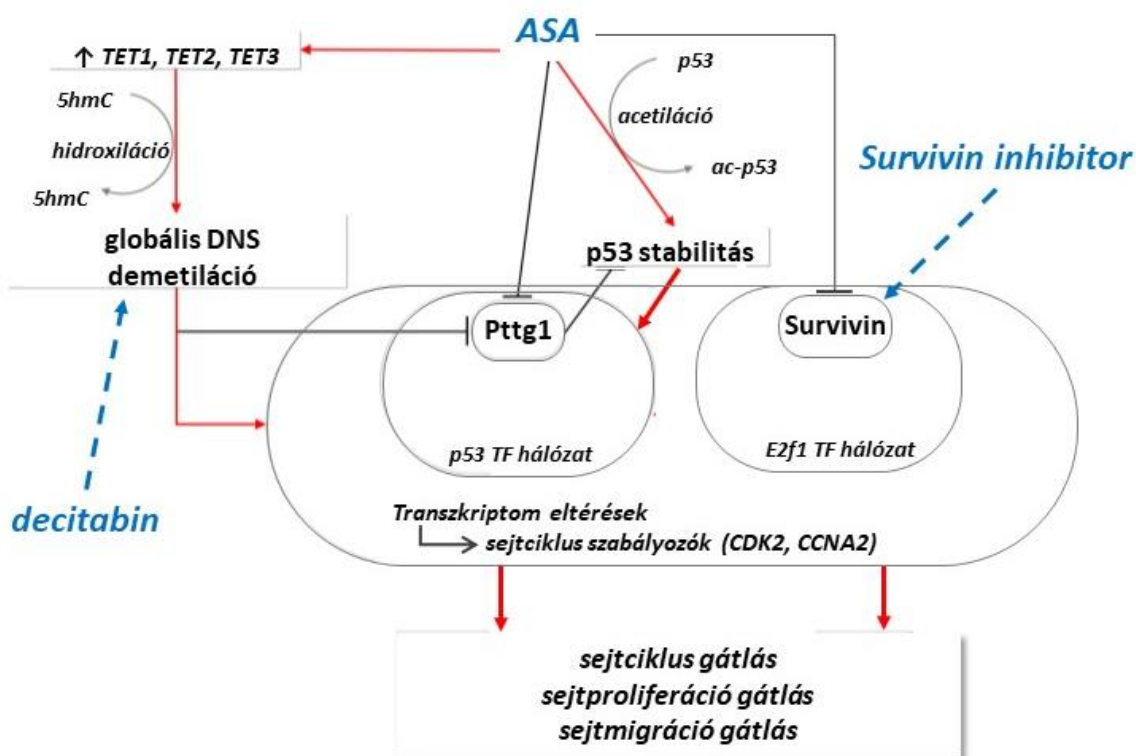
Mindez összhangban van korábbi eredményünkkel, miszerint a demetiláció globális növekedése korrelált a humán PitNET daganatszövetekben mért Ki-67 proliferációs indexszel [124]. Érdekes módon, emellett kísérleteinkben a PitNET sejtek migrációját is gátolta az aszpirin. A pontos mechanizmust feltárása további vizsgálatot igényel, azonban feltételezhető, hogy ez a *Pttg1* által szabályozott *Aurka* és *Aurkb* csökkent expressziójának köszönhető [293, 294].

A transzkripciós faktor regulációs hálózat elemzése, a p53 és E2f1 transzkripciós faktorok eltérő aktivitását jelezte. Míg *Tp53* gén expressziója nem változott szignifikánsan aszpirin hatásra, aktivitásának változását a transzkriptom változások egyértelműen jelezték. Ennek háttérben a p53 fehérje 382 pozícióban elhelyezkedő lizin aminosav fokozott acetilációját azonosítottuk, amelyről korábban kimutatták, hogy hatására stabilizálódik p53 fehérje és emellett fokozódik a transzkripciós aktivitása (**53. ábra**) [295]. A *Tp53* expresszió pozitív korrelációt mutatott az 5hmC szinttel is. Ezenkívül a PitNET sejtekben az aszpirin hatására emelkedett a *Cdkn1a* (p21-et kódoló gén) expressziója, amely szintén tükrözi a fokozott p53 transzkripciós aktivitását.

A *PTTG1* a humán PitNET daganatokban kulcsfontosságú onkogén, az esetek körülbelül 90%-ában fokozottan expresszáldódik [296], és tagja a p53 interakciós hálózatának. Az aszpirin hatékonyan csökkentette *Pttg1* expressziót mind RNS, mind fehérje szinten is patkány PitNET sejtekben. Ezenkívül a *Pttg1* fehérje által szabályozott molekulák is csökkent expressziót mutattak, amely igazolja a *Pttg1* csökkent aktivitását. Negatív korrelációt találtunk a *Pttg1* expressziója és az 5hmC mennyisége között, jelezve a kettő közötti kapcsolatot. Az aszpirin által szabályozott gének és a humán PitNET daganatokban diszregulált gének között nagy átfedést igazoltunk (20,15%). Ezért feltételezhetjük az aszpirin tumorgátló hatását ebben a daganattípusban. Ez összhangban van korábbi adatokkal, miszerint

a PTTG1 csökkenti a p53 fehérje stabilitását a PTTG1-kötő faktoron (PTTG1 binding factor) keresztül [297].

53. ábra. Epigenetikai módosítók daganatellenes hatása PitNET daganatokban. A PitNET sejtekben az ASA fokozta a globális demetilációt a TET1-3 enzim szintjének emelésével. A globális DNS-metiláció globális transzkripció változást indukál, beleértve a Pttg1 csökkent expresszióját, amelyet decitabin-kezelés eredményei támasztottak alá. Ezenkívül az ASA gátolja a Pttg1 promotor aktivitását. Ettől függetlenül az ASA a p53 acetilációján keresztül fokozott p53 fehérje stabilitáshoz és transzkripcióhoz vezet. A Pttg1 gátolja a p53 aktivitást, mivel csökkenti a p53 fehérje stabilitását és elnyomja transzkripció aktivitását. A p53 szabályozása mellett, ASA hatására csökkent az E2f1 transzkripció faktor aktivitás, mely csökkent Survivin expresszióhoz, s következményesen gátolt sejtproliferációt eredményez. Összefoglalva, az ASA kezelés során a globális demetiláció transzkripció változásokhoz vezet. A fokozott p53 és csökkent E2f1 aktivitás a sejtciklus gátlását, proliferáció csökkenését eredményezi. A piros nyilak az aktivációt/következményt, a szürkék a gátlást jelölik- TF: transzkripció faktor



A p53 mellett az aszpirin egy másik transzkripció faktor, az E2f1 aktivitását is befolyásolta (53. ábra). Az E2f1 kulcsfontosságú sejtciklus-szabályozó, és a G1/S átmeneten keresztül a sejtciklus progresszióját szabályozó fehérjéket kódoló gének kifejeződését szabályozza [298]. S valóban, az aszpirin-kezelés során csökkent E2f1 aktivitást megerősítették *in vitro* funkcionális eredményeink, köztük a Survivin csökkent expressziója és a sejtciklusanalízis. Géncsendesítéssel és kismolekula inhibitorral bizonyítottuk, hogy az aszpirin többek között a közvetlen Survivin gátláson keresztül fejti ki daganatellenes hatását. Míg a Survivin gátlás a sejtciklus G2/M fázisában stoppot eredményez, az aszpirin ettől függetlenül gátolja az S fázist is a CCNA2 és CDK2 fehérjéken keresztül. A Survivin transzaktivációjához egy transzkripció faktor komplex kötődésére van szükség a promóterhez. A

henriettbutz_199_24

Survivin kismolekula inhibitor YM155 gátolja a *Survivin* promoterhez kötődő Sp-1 transzkripció faktort, az ASA pedig az E2f1 kötődését a *Survivin* promoterhez, így mindkét szer gátolja a transzaktivátor komplex kialakulását. A *Survivin* YM155 vagy siRNS által közvetített csendesítéssel történő gátlása utánozta az ASA hatását, jelezve, hogy a *Survivin* ígéretes célpont az NF-PitNET-ek kezelésében. A human PitNET daganatokban emelkedett *Survivin* fehérje mennyiséget találtunk az egészséges hipofízis szövetekhez képest, ami szintén támogatja ezt a hipotézist. Ezzel összhangban a *Survivin* emelkedett expressziója potenciálisan összefüggésbe hozható PitNET daganatok invazivitásával is [299]. Emellett a *Survivin* magas expressziója PitNET szövetekben felveti a daganatok epigenetikai terápiára nézve prediktív jelentőségét, amelyet azonban további vizsgálatokban szükséges megerősíteni.

Az NF-PitNET-ek esetében tehát mind az ASA, a decitabin vagy a *Survivin* inhibitorok ígéretes terápiás lehetőségek lehetnek. Az ASA előnye, hogy széles körben használják tromboembóliás profilaxisban, fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő szerként. Az egyetlen aggodalom az ASA-val, mint potenciális antitumor gyógyszerrel szemben, a fokozott vérzés kockázata: akár gasztrointesztinális, akár tumor apoplexia. Az irodalomban található olyan közlemény, melyben relatív ellenjavallatként van megfogalmazva az antikoaguláns terápia makroadenomával rendelkező szenvedő betegeknél [300]. Azonban a közleményekben bemutatott PitNET apoplexiában szenvedő betegek mind agresszív antikoagulatív és trombocita-ellenes terápiát kaptak (ASA klopidogréllel és teljes dózisú enoxaparinnal kombinálva), ezért nem világos, hogy az ASA individuális terápiaként történő alkalmazása növeli-e a hipofízis apoplexia kockázatát [300, 301]. Semple és munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy az agyalapimirigy apoplexia leggyakoribb kiváltó okai az agyalapi mirigy stimulációja, a műtét, különösen a koszorúér-műtét és a koagulopátia [302]. Ezt a megfigyelést Vargas és munkatársai is megerősítették, akik két- és többváltozós analízissel sem tudták megerősíteni a trombocita-ellenes terápia szerepét az agyalapimirigy apoplexiában [303]. Összességében tehát úgy tűnik, az ASA önmagában nem növeli az PitNET daganatok bevézésének kockázatát, amely azonban további vizsgálatokat igényel. Az ASA hatékony, jól tolerálható, olcsó lehetőség, különösen más kemoterápiás gyógyszerekhez képest. Természetesen az ASA daganatellenes és/vagy megelőző hatása az NF-PitNET daganatokban további vizsgálatokat igényel.

V. Összefoglalás: epigenetikai mechanizmusok és potenciális alkalmazásuk

Többszintű (DNS, mRNS-, miRNS- és fehérje) genomikai adatok összeillesztéséhez komplex bioinformatikai folyamatot állítottunk össze, melyben génontológia, útvonal és hálózatelemzéssel integráltuk saját mérési eredményeinket számos omikai adatbázis adataival, köztük fehérje-fehérje, fehérje-DNS, fehérje-RNS és miRNS-mRNS kölcsönhatásokat. Az elemzés fő ereje a minták nagy száma, a különböző betegcsoportok és platformok kombinációja, valamint a felfedező kohorszok mellett egy vagy több független validációs csoport használata [21]. Szakirodalmi adatok támasztják alá, hogy a különböző platformokon elemzett, hasonló biológiai kísérletekből származó eredmények kombinációja teljesebb omikai profilt ad, és informatívabb, mintha külön-külön vizsgálnánk őket [88]. A vizsgálatok ilyen jellegű kombinációja, a kísérletek számának növelésével segíti a kísérleti tervezés robusztusságát, korlátozza a nemkívánatos hatásokat és az expressziós profilok torzítását, különösen két vagy több platform összehasonlításakor [89]. Ezzel a megközelítéssel azokat az útvonalakat próbáltuk azonosítani, amelyek a legtöbb független tanulmányban közös jellemzőként szignifikánsak voltak, mintsem az egyes minták közötti tumorok heterogenitását elemezni. Az így kapott eredményeket először a lehető legtöbb molekuláris biológiai, genetikai és sejtbológiai funkcionális vizsgálattal validáltuk, majd, második lépésben alkalmazhatóságukat klinikai mintákon validáltuk. Az azonosított miRNS-ek, gének, fehérjék alkalmazását potenciális biomarkerekként, szintén bizonyítottuk.

V.1. Az aril-hidrokarbon receptor jelátvitel, a sejtciklus, az EMT és a TGFβ jelátvitel miRNS-ek általi szabályozása világossejtes veserákban

Világossejtes veserákban elsőként mutattunk rá az *AHR* tumorigenezisben betöltött szerepére. Az *AHR*, az *AHR* jelátvitel központi receptoraként közvetíti a környezet kémiai és genotoxikus jelzéseit, valamint szerepet játszik a celluláris homeosztázisban és befolyásolja az immunválaszt. Vizsgálatunk alapján ccRCC szövetek fokozott *AHR* kifejeződése, legalább részben, a csökkent expressziójú miR-124-3p-nek köszönhető [115].

Azonosítottuk a legfontosabb szereppel bíró tumorszuppresszor miRNS-eket ccRCC patogenezisében. A három központi tumorszuppresszor funkciót ellátó miRNS (miR-124-3p, miR-200c-3p és miR-30a-5p) önállóan kisebb mértékben, elsősorban a miR-124-3p, illetve a miRNS-ek kombinációja, a tumor sejtek proliferációjában is részt vesz [116]. Fő funkciójuk azonban a daganatsejtek migrációs és inváziós képességének szabályozása, amely a normál szövet-primer daganat-metasztázis szövetekben mutatott graduálisan csökkenő expressziójukban is megmutatkozik. A csökkent miRNS expresszió révén a tumorsejtek migrációs/inváziós képessége fokozódik elősegítve a tumor progressziót. Ezen folyamatokban egyértelműen kimutattuk a *TGFBI* (Transforming Growth Factor Beta) és a *ITGB* (Integrin Subunit Beta 1) szerepét, melyek az ECM (extracelluláris mátrix) és EMT jelátviteli útvonalakat regulálják. Emellett a miR-124-3p célmolekuláiként azonosítottuk a *CAV1* és *FLOT1* géneket, melyekről egyértelműen bizonyítottuk, hogy szerepük van a tumorsejt migrációban és invázióban. Ezzel egyetértésben mind a miR-124-3p-t, mind a *CAV1* és *FLOT1* fehérjéket

prognosztikai markerként is azonosítottuk ccRCC-ben, melyek expressziója szignifikánsa hatással van a betegek túlélésére.

Kísérleteink alapján tehát a miR-124-3p, a CAV1 és FLOT1 fehérjék prognosztikus jelentőséggel bírnak, és a tumorsuppresszor miRNS-ek szintjének helyreállítása vagy célmolekuláik gátlása potenciális terápiás stratégiának tekinthető a világossejtes veserák progressziójának gátlásában.

V.2. miRNS-ek jelentősége a szunitinib és szorafenib rezisztencia hátterében – migrációs fenotípus, EMT-szerű molekuláris folyamatok és a környező szövetek ereinek befogása

Az angiogenezis gátlás vonzó terápiás megközelítés a daganatellenes kezelésben. Sajnos azonban a kezdeti pozitív terápiás választ követően a daganatok előbb-utóbb rezisztenciát mutatnak a kezelésekkel szemben. Rendkívül fontos feltárni a rezisztencia hátterében álló mechanizmusokat, mivel ezek ismerete hozzásegíthet új kombinációs terápiák, vagy más, hatékony terápiák felfedezéséhez. Világossejtes veserákban alkalmazott szunitinib és a hepatocelluláris rákok esetében alkalmazott szorafenib ellen kialakuló rezisztencia hátterét, valamint ezekben a miRNS-ek szerepét vizsgáltuk *in vitro* és *in vivo* módszerekkel. Mindkét angiogenezis gátló gyógyszer hatására hasonló folyamatokat figyeltünk meg a rezisztencia kialakulására vonatkozóan. Fenotipikus, immunhisztokémiai, mRNS és miRNS eredményeink alátámasztják a sejt migráció központi szerepét adaptációs mechanizmusként. A tumorsejtek (a rebound angiogenezis helyett) vándorló fenotípust vesznek fel és a befogadó szövet már meglévő ereihez/ereibe vándorolnak. Hipotézisünk az, hogy a "migrációs fenotípusra való áttérés" az antiangiogén tirozinkináz inhibitorok iránti rezisztencia hátterében egy univerzális adaptív mechanizmus lehet, amely biztosíthatja a tumorsejtek túlélését, valamint segíti őket a további növekedésben és terjedésben. A klinikai menedzsmentre vonatkozóan fontos eredményünk, hogy kimutattuk, ezek közül a változások közül sok részben visszafordítható a terápia leállításával, ami a későbbi on-off terápia bevezetésének molekuláris alapját adta [85, 132]. A migrációs fenotípus mögött EMT-szerű molekuláris változásokat tudtunk kimutatni mindkét esetben. Az általunk azonosított miR-663a és miR-1 által szabályozott *MDGA1* és *FRAS1* veserákban potenciális adjuváns terápiás célpontok lehetnek, melyek segítségével gátolni tudtuk a daganatsejtek migrációját, ezáltal potenciálisan lassítható vagy késleltethető lenne a metasztázisok kialakulása. A migrációs fenotípus következményeként a befogadó szövet ereinek koopcója történik. Az érbefogás által közvetített szerzett rezisztencia megelőzése érdekében szükség lehet az antiangiogén terápia kombinálására olyan gyógyszerekkel, amelyek a tumorsejtek migrációs képességét, illetve invazivitását célozzák meg.

Mindkét daganattípusban elsőként írtuk le a környező szövet ereinek tumorsejtek általi befogását, mint rezisztenciamechanizmust a szunitinib és szorafenib rezisztencia kialakulásának hátterében. Eredményeink egy multifaktoriális mechanizmust fedtek fel, melyben a sejt migráció és az EMT-t szabályozó miRNS-ek központi szerepet játszanak [67, 85, 132].

V.3. Szöveti miRNS-ek, mint sejtciklus és mitokondriális funkció szabályozók hipofízis neuroendokrin tumorokban

Hipofízis neuroendokrin tumorokban (PitNET) elsőként vizsgáltuk szisztematikusan a sejtciklus G2/M átmenetét viszonylag nagyszámú klinikai minta felhasználásával szöveti microarray-en. Eredményeink azt sugallják, hogy a *CDK1* és a *CDC25A* túlzott expressziója szerepet játszik a klinikailag nem funkcionáló, NF-PitNET sejtek növekedésében a sejtciklus G2/M átmenetének diszregulációján keresztül. Ezért feltételezhető, hogy a *CDC25A-CDK1* útvonal potenciális terápiás célpontként is tekinthető ezekben a daganatokban. Kimutattuk, hogy a *CDC25A* emelkedett mennyisége egyértelműen a tumorsuppresszor miRNS-ek (miR-424 és miR-503) csökkent expressziójának a következménye [118].

A hipofízis hátsó lebenyéből kiinduló, ritka onkocitómák esetében, elsőként írtuk le az erre a daganattípusra jellemző tumorspecifikus „miRNome” változásokat. Kimutattuk, hogy a globális miRNS expresszió mögött a daganatokban a Drosha enzim csökkent mennyisége állhat [125]. Feltártuk, hogy a megváltozott expressziójú miRNS-ek befolyásolják a sejtproliferációt, a szénhidrát- és lipidanyagcserét, ami kiterjeszti a korábbi ismereteinket, amelyek a szöveti metabolom analízisen alapuló csökkent citrát-ciklust és a pentóz-foszfát és foszfolipid szintézis fokozódását mutatták. A diszregulált miRNS-ek közül a miR-127-3p és a miR-744-5p funkcionális vizsgálatokban is tumorsuppresszor hatásának bizonyult. Bizonyítottuk a mitokondriális Aconitáz 2-t (*ACO2*) célzó miR-744-5p központi szerepét az onkocitómák citrát-ciklus szabályozásában. Mivel a korábbi irodalmi adatok alapján az onkocitómákban talált komplex I mutációk önmagukban nem elegendőek a mitokondriális proliferációhoz, arra a következtetésre jutottunk, hogy az eltérően expresszált miRNS-ek kiegészítő szerepet játszanak a tumorigenezisben, a mitokondriális diszfunkcióban és az anyagcserében.

A hipofízis onkocitómákban downregulált miRNS-ek 40%-a a 14q32 kromoszóma régióban kódolt, beleértve a miR-127-3p-t is. Ez az egyik legnagyobb miRNS klasztert kódoló régió és gyakran dereguláltak daganatokban [304, 305]. A 14q32 lókuszon kódolt miRNS-ek funkcióját tekintve számos daganatpatogenezishez és progresszióhoz kapcsolódó útvonalat, beleértve a TGF β , EMT, Ras, PI3K/AKT/mTOR és ErbB jelátvitelt, az invazivitás és metasztázis kialakulásban részt vevő útvonalakat (pl. proteoglikánok, adherens junction, fokális adhézio, mitogén-aktivált protein kináz) vagy a pluripotenciát és összejt jellemzőket befolyásoló útvonalakat azonosítottunk [127], melyet az irodalmi adatok is támogatnak [306, 307]. Más daganattípusokhoz hasonlóan a 14q32 miRNS-ek is jelentős szerepet játszanak az endokrin mirigyek tumorigenezisében [30]. A különböző endokrin tumortípusokban ez a miRNS klaszter tükrözi a miRNS-ek általános szöveti specificitását az expressziós mintázat, a tumorsuppresszor vagy onkogén funkció tekintetében, és jelentős hatással van a prognózisra is. Tekintettel a 14q32 miRNS-ek stabil expressziójára egészséges egyéneknél a vérkeringésben, ennek a miRNS-klaszternek a további vizsgálata lehetőséget nyújthat arra, hogy diagnosztikai vagy prognosztikai biomarkerként használják őket endokrin daganatokban [127].

V.4. miRNS-ek potenciális alkalmazása folyadékbiopsziából, mint diagnosztikus biomarkerek

Világossejtes veserákkal rendelkező betegek vizeletmintáinak vizsgálatával meghatároztuk a jellegzetes miRNS-mintázatokat, amely nemcsak az egészséges személyektől való elkülönítést teszi lehetővé (miR-126-3p-miR-449a kombináció), de a nagy, valamint a kis daganatok (≤ 4 cm) kimutatására és elkülönítésére (miR-17-5p-miR-25-3p, miR-21-5p) is alkalmas. Jelenleg a legtöbb ilyen kis daganatot véletlenszerűen diagnosztizálják a más célból végzett képalkotó vizsgálatok során. Az ilyen méretű daganatok esetében szóba jöhet az aktív megfigyelés, mivel a nagyobb daganatok nagyobb eséllyel malignusak. Emellett az általunk azonosított specifikus miRNS kombinációkkal (miR-17-5p-miR-25-3p, miR-21-5p) meg lehetett különböztetni a jó- és a rosszindulatú kis méretű daganatokat is, amely bár további validálásra vár, nagyban segíthetné korai intervenciót a rosszindulatú daganatok esetében [34]. Ezek a miRNS-ek tehát, az extracelluláris folyadékokban való nagyfokú stabilitásuk miatt nem invazív, diagnosztikus biomarkerekként szolgálhatnak ebben a betegségben. A vizeletben azonosított miRNS-ek összefüggését a daganat jelenlétével pre- és posztoperatív vizeletminták, valamint a daganatsejtek exoszómális miRNS szekréciójával is bizonyítottuk. Az irodalomban elsőként mutattuk meg, hogy a miRNS-ek közvetíthetik a sejt-sejt kommunikációt a veserákban.

Szintén először elemeztük a keringő miRNS-ek expressziós szintjét és isomiR profilját a különböző PitNET daganatos betegektől származó pre- és posztoperatív mintákban, és mai napig közlésünk a legkomprehenzívabb tanulmány a nem-funkcionáló, NF-PitNET daganatokra nézve. Kimutattuk a betegek plazmájában keringő miRNS-ek általános alacsony szintjét az egészséges egyénekhez képest. Az PitNET specifikus szöveti miRNS-ek rendkívül alacsony expressziós szintje megkérdőjelezi megbízható kimutathatóságukat a keringésben. Elsőként analizáltuk az isomiR-ek jelenlétét PitNET daganatos betegekben mely nagyfokú specifitást mutatott a daganattípusoktól függően [121]. Vizsgálatunkban a betegek pre- és posztoperatív mintáinak összehasonlításával a miR-143-3p-t a betegek nyomon követésére alkalmas potenciális biomarkerként azonosítottuk, kizárólag FSH/LH+ PitNET betegek esetében a sebészeti beavatkozás után. Alkalmazhatóságára nézve analizáltuk a betegek számos klinikai, patológiai és laboratóriumi paramétereit, amelyekből a miR-143-3p független maradt és kizárható volt a műtéttel kapcsolatos általános hatások (érzéstelenítés, fájdalomcsillapítás stb.) befolyása is. Kimutattuk, hogy a miR-143-3p nem exoszómális, inkább fehérjéhez kötött módon van jelen a keringésben, mely hatással van a féléletidejére. Természetesen további vizsgálatok, nagyobb kohorszon lennének szükségesek a további validációhoz a klinikai bevezetés előtt [37].

A szérumban keringő miRNS-ek diagnosztikai alkalmazhatóságát kipróbáltuk kombinációban a klasszikus laboratóriumi tumormarkerrel, a chromogranin A-val (CgA) is hasnyálmirigy neuroendokrin tumoros (pNET) betegek mintáin, melyet kontrollként egészséges személyek PPI kezelt vagy kezelés nélküli és PPGL betegek szérum mintáival hasonlítottunk össze. A CgA mind PPI szedés hatására, mind PPGL betegeknél emelkedett lehet, melyek zavaró tényezőként hatnak a CgA tumormarkerként való megbízhatóságára nézve. Különös kihívást jelentenek a funkcionálisan inaktív, hormont nem termelő daganatok is, melyek esetében a CgA diagnosztikai ereje csekély. Ilyenkor a diagnózis általában késhet

a specifikus keringő biomarkerek hiánya miatt, a megkésett diagnózis pedig befolyásolja a prognózist és a túlélést [108]. Ebben nyújthatnak segítséget a miRNS-ek mint keringő biomarkerek. Munkánkban először vizsgáltuk a keringő miRNS-ek diagnosztikai pontosságát a CgA-val összefüggésben pNET betegeknél. A miRNS-profil segítségével képesek voltunk megkülönböztetni a daganatos (pNET/PPGL) mintákat az egészséges kontrolloktól, valamint a keringő miRNS szintek globális downregulációját figyeltük meg az egészségesekhez képest. A CgA-hoz hasonlóan a miRNS-mintázat önmagában nem volt alkalmazható a PPGL/pNET biomarkereként PPI-kezelés esetén. 3-5 miRNS-ből álló kombináció a CgA-val együtt azonban még a legnagyobb kihívást jelentő csoportban (alacsony CgA-szinttel rendelkező vagy PPI-kezelésben részesülő pNET-betegek) is ígéretes diagnosztikai eszközt jelentett [120].

V.5. A DNS metiláció-demetiláció ciklus eltéréseinek összefüggése hipofízis neuroendokrin tumorsejtek biológiai viselkedésével

A DNS citozin intermediereinek elkülönítéséhez speciális módszerek alkalmazására van szükség. Vizsgálatunk idején korábbi közlemények mind biszulfít konverzió alapú módszereket használtak, melyek nem voltak képesek a teljes genom ilyen jellegű lefedésére még az ún. array-k alkalmazásával sem, amelyek a gyártó által meghatározott próbakészlettel dolgoznak, míg az NGS alapú technikák nehézsége az adatok elemzése során ütközik ki (a szekvencia összerakásának bonyolultsága a négy helyett három bázisból álló DNS miatt, amikor a nem metilált citozinok timinekké alakulnak át a biszulfít-kezelés után). A munkacsoportunkkal kollaborációban kifejlesztett HPLC-MS/MS módszer képes pontosan kvantifikálni az 5-metilcitozin (5mC) és az 5-hidroximetilcitozin (5hmC) citozin intermedierek globális mennyiségét. PitNET daganatok metilációs profiljáról történtek korábban közlések az előbb leírt módszerek alkalmazásával, ám a globális metilációs státusz vagy a demetiláció folyamatáról nem voltak ismereteink, így PitNET szöveteket felhasználva vizsgálataink során ezeket elemeztük.

PitNET daganatokban a demetiláció folyamata (amelyet a megnövekedett 5hmC/5mC arány jelez) negatívan korrelált a proliferációs rátával, és az 5hmC, valamint az 5hmC/mC arány magasabb volt a kevésbé differenciált sejtekben [124]. Az epigenom megváltoztatása PitNET daganatokban decitabinnal csökkent metilációhoz és megnövekedett 5hmC mennyiséghez (és 5hmC/5mC arányhoz) vezetett, ami a sejtek életképességének és proliferációjának csökkenésével járt együtt. Ezek háttérében azonosítottuk a metiláció-demetiláció folyamatát szabályozó *TET1-3* enzimek és kofaktoruk (*UHRF2*) expressziós eltéréseit.

Adataink első alkalommal utaltak arra, hogy az 5hmC és az 5hmC/5mC arány a PitNET viselkedésének potenciális biomarkere lehet, amely jelzi a differenciálódást és a proliferatív állapotot, valamint potenciálisan szolgálhat a decitabin hatásának nyomon követésére szolgáló biomarkerként. Eredményeink felvetették a decitabin, mint epigenetikai módosító alkalmazását terápiarezisztens PitNET daganatokban.

Egy másik epigenetikai módosító, az aszpirin hatását is elemeztük PitNET daganatokban. Az aszpirin daganatellenes hatását többek között a PitNET sejtekre epigenomikus és genomikus szinten

fejtette ki globális demetilációt eredményezve. Ennek transzkripció kimenetelében a legfontosabb szerepet a p53 és az E2f1 transzkripció faktorok befolyásolása játszotta. A demetiláció-*Pttg1* szabályozó hálózatot elsőként írtuk le [123], mint tumorelles mechanizmust, amelyben az aszpirin a *Pttg1*-t, a PitNET daganatok fő onkogénjét, három mechanizmus: globális demetiláció, promoter szupresszió és p53 stabilizáció által is gátolta. A *Survivin*, a PitNET daganatokban fokozottan expresszáldó onkogén gátlását az aszpirin az E2f1 transzkripció faktor aktivitásának csökkentésével fejtette ki. Humán daganatszöveteken a *Survivin* fokozottan expresszáldott, amely magas expresszió így előre jelezheti a daganatok aszpirinre való fogékonyságát, mint potenciális prediktív marker. A *Survivint*, egyes vizsgálatokban pedig a PitNET daganatok invazív tulajdonságával is összefüggésbe hozták. Végeredményben az aszpirin kezelés csökkentette több PitNET sejtvonal életképességét és proliferációját. A sejtciklusra gyakorolt hatása részben a *Survivin* downregulációján, részben a Ciklin A és CDK2 *Survivin*-független gátlásán, valamint a szabályozott transzkripció faktorok megváltozott aktivitásán alapult [117]. Az 5hmC, amely korrelált a Ki-67-tel és a PitNET differenciáltsági állapotával és így a daganatok agresszivitásának markere lehet, szintén jelezte az aszpirin tumorelles hatását. Humán PitNET daganatok transzkriptom változásai és az aszpirin által szabályozott transzkripció profil közötti nagy átfedés (>20%) alátámaszthatja az aszpirin potenciális jótékony hatására a PitNET betegekben. Vizsgálataink alapján tehát az epigenetikai módosító hatással rendelkező decitabin, aszpirin, vagy *Survivin* inhibitor alkalmazása, mint potenciális terápiás opció merülhet fel az agresszív, terápiarezisztens PitNET daganatok esetében.

VI. Következtetések

A daganatok genetikai és epigenetikai eltérések következtében alakulnak ki, melyek befolyásolják a betegség progresszióját. Az epigenetikai szabályozás részeként a miRNS-ek és a dinamikus DNS metiláció szabályozás fontos szerepet tölt be, és számos jelátviteli útvonal megváltozott működését eredményezi. Ezért a DNS szintű vizsgálatok mellett, az mRNS-, miRNS- és fehérje szintű eltérések is fontos funkcionális információkat rejtenek magukban, melyek összességében határozzák meg a daganatok genetikai és epigenetikai tájképét. Ezért vizsgálatainkban többszintű genomikai adatok összeillesztését végeztük el komplex bioinformatikai analízissel, eredményeinket pedig több független humán minta kohorszon és kísérletes módszerekkel is validáltuk. Ezekkel a módszerekkel jobb rálátást kaphatunk a daganatok kialakulására, progressziójára, valamint gyógyszerrezisztencia molekuláris hátterére.

Ezt a megközelítést alkalmazva azonosítottunk számos miRNS-t és azok célmolekuláit, melyek a daganatsejtek migrációját, a sejtciklust, mitokondriális funkciót, a TGF β útvonalat, az epiteliális-mezenchimális tranzíciót (EMT), az AHR és Wnt jelátvitelt szabályozzák. Emellett diagnosztikus és prognosztikai jelentőséggel bírnak humán daganat mintákon vizsgálva.

Vizelet, plazma és szérum minták elemzésével igazoltuk, hogy a miRNS-ek alkalmazhatóak folyadékbiopsziás biomarkerként klinikai mintákon: diagnosztikus, valamint betegkövetéshez alkalmazható miRNS-eket és miRNS kombinációs markereket azonosítottunk. Emellett igazoltuk, hogy a daganatsejtek miRNS tartalmú exoszómákat szekretálnak, melyeken keresztül környezetükben található sejtekkel kommunikálnak.

Az epigenetikai eltéréseket célzó gyógyszerek ígéretes terápiák, mivel ellentétben a DNS szintű változásokkal (DNS mutációkkal), az „epimutációk” könnyen változnak és epigenetikai terápiával visszaállíthatók normális állapotukba, ezzel a daganatkialakulás vagy progresszió folyamata potenciálisan visszafordítható. Az epigenetikai hatású aszpirin hatásmechanizmusát vizsgálva kimutattuk a demetiláció összefüggését a p53 és E2f1 transzkripciós faktorok által közvetített jelátvitellel, valamint a *PTTG1* működésével, melyek meghatározzák a daganatellenes hatást hipofízis neuroendokrin tumorsejtekre nézve. Amellett, hogy az 5hmC-t, mint potenciális markert azonosítottuk a hipofízis neuroendokrin daganatok proliferatív és differenciációs állapotára nézve, a decitabin és az aszpirin daganatellenes hatásának nyomon követésére is alkalmas biomarker, amely potenciális segítség lehet a nem-funkcionális, agresszív, terápiarezisztens hipofízis daganatok kezelésében.

Az epigenetikai eltérések tehát jelentős hatással bírnak a jelátviteli útvonalak működésére, ezáltal a daganatok patogenezisére és progressziójára, valamint a gyógyszerrezisztenciára. Mindemellett lehetséges diagnosztikus, prognosztikus markerként alkalmazhatóak mind szövetből, mind folyadékbiopsziás mintákból mérve és lehetséges terápiás célpontként is tekinthetünk rájuk.

VII. Eredeti megfigyelések, új megállapítások

miRNS-ek általi szabályozó mechanizmusok feltárása különböző daganatokban:

- Az általunk alkalmazott többszintű (DNS, mRNS-, miRNS- és fehérje), integratív bioinformatikai folyamat alkalmas volt új patomechanizmusok, valamint diagnosztikus és prognosztikus markerek azonosításához.
- Azonosítottuk a legfontosabb szereppel bíró tumorszuppresszor miRNS-eket világossejtes veserák patogenezisében, melyek közül a három központi funkciót ellátó miRNS (miR-124-3p, miR-200c-3p és miR-30a-5p) a tumor sejtek migrációját, s ezáltal a daganat progressziót szabályozza.
- Elsőként mutattunk rá az *AHR* tumorigenezisben betöltött szerepére világossejtes veserákban, melynek fokozott kifejeződése, legalább részben, a csökkent expressziójú miR-124-3p-nek köszönhető.
- Az *AHR* diagnosztikai és prognosztikai jelentőségét is bizonyítottuk több kohorszban.
- A miR-124-3p célmolekuláiként azonosítottuk a *CAV1* és *FLOT1* géneket, melyekről bizonyítottuk, hogy szerepük van a tumorsejtek migrációjában és inváziójában. Mind a miR-124-3p-t, mind a *CAV1*-t és *FLOT1*-t prognosztikai markerként is azonosítottuk világossejtes veserákban,
- Világossejtes veserák és hepatocelluláris karcinóma esetében elsőként írtuk le az erek koopcíóját (érbefogást), mint rezisztenciamechanizmust az angiogenezis gátló szunitinib és szorafenib rezisztencia kialakulásának hátterében. Igazoltuk a daganatsejtek jellegzetes fenotípus váltását, mint adaptív mechanizmust, melyben a sejtmigráció központi szerepet tölt be.
- Világossejtes veserákban a szunitinib rezisztencia kialakulásában rámutattunk az *MDGA1* és *FRAS1* gének működésének miRNS-ek általi szabályozásának jelentőségére.
- Hipofízis neuroendokrin tumorokban igazoltuk a sejtciklus G2/M átmenetet szabályozó molekulák (*CDK1* és a *CDC25A*) és azok miRNS-ek általi szabályozásának szerepét a nem-funkcionáló daganatok patogenezisében.
- A hipofízis hátsó lebenyéből kiinduló onkocitómák esetében elsőként közöltük e ritka tumorokra jellemző globálisan csökkent miRNS expressziót és megváltozott miRNS expressziós mintázatot, mely részben a Drosha enzim csökkent mennyiségének volt köszönhető. Bizonyítottuk a miR-127-3p és miR-744-5p tumorszuppresszor funkcióját e daganattípus kialakulásában. Kimutattuk a mitokondriális Aconitáz 2-t (*ACO2*) célzó miR-744-5p szerepét az onkocitómák citrát-ciklus szabályozásában.
- Szintetizáltuk a 14q32 lókuszon kódolt miRNS klaszter expressziós mintázatát különböző endokrin daganatokban, mely a szövetspecifikus funkciót tölt be a daganatok progressziójában.
- Mellékvesekéreg daganatokban és a legkülönbözőbb glükokortikoid célszövetekben kimutattuk a glükokortikoidok hatására megváltozott Wnt jelátvitel működését, melyet – legalább részben – miRNS-ek közvetítenek.

henriettbutz_199_24

miRNS-ek, mint potenciális extracelluláris biomarkerek vizsgálata:

- Igazoltuk, hogy a miRNS-ek alkalmazhatóak folyadékbiopsziás biomarkerként klinikai mintákon.
- Világossejtes veserákban vizeletből olyan exoszómális miRNS kombinációkat határoztunk meg, melyek szignifikánsan elkülönítik a daganatos mintákat az egészséges vizelettől és a jóindulatú vesedaganatokkal rendelkezők mintáitól.
- Igazoltuk, hogy a daganatsejtek miRNS tartalmú exoszómákat szekretálnak, melyeken keresztül környezetükben található sejtekkel kommunikálnak.
- Hipofízis neuroendokrin daganatok esetében először elemeztük a plazma miRNS-ek expressziós szintjét és isomiR profilját a különböző típusú daganattal rendelkező betegektől származó pre- és posztoperatív mintákban. A miR-143-3p-t a betegek nyomonkövetésére alkalmas potenciális biomarkerként azonosítottuk gonadotróp eredetű nem-funkcionáló hipofízis neuroendokrin tumorokban.
- Elsőként vizsgáltuk a keringő miRNS-ek diagnosztikai jelentőségét a kromogranin A-val (CgA) összefüggésben hasnyálmirigy neuroendokrin tumorral rendelkező betegeknél. Kimutattuk, hogy a miRNS-ek képesek emelni a CgA diagnosztikai pontosságát, és 3-5 miRNS-ből és a CgA-ból álló kombináció még az alacsony CgA-szinttel rendelkező vagy protonpumpa gátló kezelésben részesülő pNET-betegeket is képes volt nagy erővel elkülöníteni.

A metiláció-demetiláció, mint epigenetikai módosító mechanizmus vizsgálata daganatok viselkedésében:

- Elsőként vizsgáltuk a globális demetilációt hipofízis neuroendokrin tumorokban, és igazoltuk, hogy a demetiláció folyamata (emelkedett 5hmC/5mC arány) negatívan korrelál a proliferációs rátával és a differenciáltsági állapottal. Ennek hátterében azonosítottuk a metiláció-demetiláció folyamatát szabályozó *TET1-3* enzimek és kofaktoruk (*UHRF2*) expressziós eltéréseit.
- Kimutattuk, hogy az aszpirin daganatellenes hatását hipofízis neuroendokrin daganatokra többek között epigenomikus és genomikus szinten fejti ki, melyben a demetiláció, a p53 és E2f1 transzkripció faktorok, valamint a Survivin központi szerepet töltenek be.
- Elsőként írtuk le az demetiláció-Pttg1-p53 szabályozó kör működését.
- Az 5hmC-t potenciális markerként azonosítottuk a hipofízis neuroendokrin tumorok proliferatív és differenciációs állapotára nézve, valamint a decitabin és az aszpirin daganatellenes hatásának nyomon követésére.

VIII. Irodalomjegyzék

1. Kontomanolis EN, Koutras A, Syllaios A, et al (2020) Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Res* 40:6009–6015. <https://doi.org/10.21873/anticancer.14622>
2. Baylin SB, Jones PA (2016) Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8:a019505. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a019505>
3. Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144:646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
4. Hanahan D (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12:31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
5. Cheng Y, He C, Wang M, et al (2019) Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials. *Signal Transduct Target Ther* 4:62. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0095-0>
6. Lu Y, Chan Y-T, Tan H-Y, et al (2020) Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Mol Cancer* 19:79. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01197-3>
7. Yoo CB, Jones PA (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 5:37–50. <https://doi.org/10.1038/nrd1930>
8. Butz H, Racz K, Patocs A (2012) Epigenetic and Posttranscriptional Alterations of Tumor Suppressor Genes in Sporadic Pituitary Adenomas. In: Cheng Y (ed) *Tumor Suppressor Genes*. InTech
9. Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31:27–36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>
10. Rinn JL, Chang HY (2012) Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 81:145–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051410-092902>
11. ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, et al (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 447:799–816. <https://doi.org/10.1038/nature05874>
12. Adelman K, Egan E (2017) More uses for genomic junk. *Nature* 543:183–185. <https://doi.org/10.1038/543183a>
13. Anfossi S, Babayan A, Pantel K, Calin GA (2018) Clinical utility of circulating non-coding RNAs - an update. *Nat Rev Clin Oncol* 15:541–563. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0035-x>
14. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C (2018) Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol* 9:
15. Stavast C, Erkeland S (2019) The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells* 8:1465. <https://doi.org/10.3390/cells8111465>
16. Westholm JO, Lai EC (2011) Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 93:1897–1904. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.06.017>
17. Valinezhad Orang A, Safaralizadeh R, Kazemzadeh-Bavili M (2014) Mechanisms of miRNA-Mediated Gene Regulation from Common Downregulation to mRNA-Specific Upregulation. *Int J Genomics* 2014:970607. <https://doi.org/10.1155/2014/970607>

18. Butz H (2022) Circulating Noncoding RNAs in Pituitary Neuroendocrine Tumors—Two Sides of the Same Coin. *Int J Mol Sci* 23:5122. <https://doi.org/10.3390/ijms23095122>
19. Mattick JS, Makunin IV (2005) Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet* 14 Spec No 1:R121-132. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi101>
20. 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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
21. Szabo PM, Butz H, Igaz P, et al (2013) Minireview: miRomics in endocrinology: a novel approach for modeling endocrine diseases. *Mol Endocrinol* 27:573–85. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1220>
22. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 99:15524–15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
23. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, et al (2020) miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells* 9:276. <https://doi.org/10.3390/cells9020276>
24. Pichler M, Calin GA (2015) MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients. *Br J Cancer* 113:569–573. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.253>
25. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, et al (2009) Diagnostic Assay Based on hsa-miR-205 Expression Distinguishes Squamous From Nonsquamous Non–Small-Cell Lung Carcinoma. *J Clin Oncol* 27:2030–2037. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.4134>
26. Gilad S, Lithwick-Yanai G, Barshack I, et al (2012) Classification of the Four Main Types of Lung Cancer Using a MicroRNA-Based Diagnostic Assay. *J Mol Diagn* 14:510–517. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.03.004>
27. Benjamin H, Lebanony D, Rosenwald S, et al (2010) A Diagnostic Assay Based on MicroRNA Expression Accurately Identifies Malignant Pleural Mesothelioma. *J Mol Diagn* 12:771–779. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090169>
28. Spector Y, Fridman E, Rosenwald S, et al (2013) Development and validation of a microRNA-based diagnostic assay for classification of renal cell carcinomas. *Mol Oncol* 7:732–738. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.03.002>
29. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, et al (2010) The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56:1733–1741. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405>
30. Butz H, Patócs A (2019) MicroRNAs in endocrine tumors. *EJIFCC* 30:146–164
31. Tsui NBY, Ng EKO, Lo YMD (2002) Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma. *Clin Chem* 48:1647–1653
32. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 39:7223–7233. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr254>
33. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, et al (2011) MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 8:467–477. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2011.76>

34. Butz H, Nofech-Mozes R, Ding Q, et al (2016) Exosomal MicroRNAs Are Diagnostic Biomarkers and Can Mediate Cell–Cell Communication in Renal Cell Carcinoma. *Eur Urol Focus* 2:210–218. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2015.11.006>
35. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, et al (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13:423–433. <https://doi.org/10.1038/ncb2210>
36. Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B (2012) Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci* 37:460–465. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.08.003>
37. Butz H, Kinga N, Racz K, Patocs A (2016) Circulating miRNAs as biomarkers for endocrine disorders. *J Endocrinol Invest* 39:1–10. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0316-5>
38. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10513–10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
39. Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16:6–21. <https://doi.org/10.1101/gad.947102>
40. Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:3740–3745. <https://doi.org/10.1073/pnas.052410099>
41. Wang Y, Leung FCC (2004) An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinforma Oxf Engl* 20:1170–1177. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth059>
42. Esteller M, Herman JG (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196:1–7. <https://doi.org/10.1002/path.1024>
43. Neri F, Incarnato D, Oliviero S (2015) DNA methylation and demethylation dynamics. *Oncotarget* 6:34049–34050
44. UNOKI M, SASAKI H (2022) The UHRF protein family in epigenetics, development, and carcinogenesis. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 98:401–415. <https://doi.org/10.2183/pjab.98.021>
45. Lyko F (2018) The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nat Rev Genet* 19:81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
46. Ito S, Shen L, Dai Q, et al (2011) Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333:1300–1303. <https://doi.org/10.1126/science.1210597>
47. Bachman M, Uribe-Lewis S, Yang X, et al (2014) 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification. *Nat Chem* 6:1049–1055. <https://doi.org/10.1038/nchem.2064>
48. Li W, Liu M (2011) Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. *J Nucleic Acids* 2011:870726. <https://doi.org/10.4061/2011/870726>
49. Rose NR, McDonough MA, King ONF, et al (2011) Inhibition of 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Chem Soc Rev* 40:4364–4397. <https://doi.org/10.1039/c0cs00203h>
50. Pfeifer GP, Xiong W, Hahn MA, Jin S-G (2014) The role of 5-hydroxymethylcytosine in human cancer. *Cell Tissue Res* 356:631–641. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1896-7>

51. Vasanthakumar A, Godley LA (2015) 5-hydroxymethylcytosine in cancer: significance in diagnosis and therapy. *Cancer Genet* 208:167–177. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2015.02.009>
52. Biswas S, Rao CM (2018) Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *Eur J Pharmacol* 837:8–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.021>
53. Kurdyukov S, Bullock M (2016) DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology* 5:. <https://doi.org/10.3390/biology5010003>
54. Olkhov-Mitsel E, Bapat B (2012) Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers. *Cancer Med* 1:237–260. <https://doi.org/10.1002/cam4.22>
55. Wang T, Loo CE, Kohli RM (2022) Enzymatic approaches for profiling cytosine methylation and hydroxymethylation. *Mol Metab* 57:101314. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101314>
56. Yip HYK, Papa A (2021) Signaling Pathways in Cancer: Therapeutic Targets, Combinatorial Treatments, and New Developments. *Cells* 10:659. <https://doi.org/10.3390/cells10030659>
57. Liu J, Peng Y, Wei W (2022) Cell cycle on the crossroad of tumorigenesis and cancer therapy. *Trends Cell Biol* 32:30–44. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.001>
58. Matthews HK, Bertoli C, De Bruin RAM (2022) Cell cycle control in cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23:74–88. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
59. Murray IA, Patterson AD, Perdew GH (2014) Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer* 14:801–814. <https://doi.org/10.1038/nrc3846>
60. Paris A, Tardif N, Galibert M-D, Corre S (2021) AhR and Cancer: From Gene Profiling to Targeted Therapy. *Int J Mol Sci* 22:752. <https://doi.org/10.3390/ijms22020752>
61. Sharma A, Mir R, Galande S (2021) Epigenetic Regulation of the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Cancer. *Front Genet* 12:681053. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.681053>
62. Wang W, Ma L, Zhao Y, et al (2023) Research progress on the role of the Wnt signaling pathway in pituitary adenoma. *Front Endocrinol* 14:1216817. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1216817>
63. Sedgwick A, D’Souza-Schorey C (2016) Wnt Signaling in Cell Motility and Invasion: Drawing Parallels between Development and Cancer. *Cancers* 8:80. <https://doi.org/10.3390/cancers8090080>
64. Zhan T, Rindtorff N, Boutros M (2017) Wnt signaling in cancer. *Oncogene* 36:1461–1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
65. Xu Q, Krause M, Samoylenko A, Vainio S (2016) Wnt Signaling in Renal Cell Carcinoma. *Cancers* 8:57. <https://doi.org/10.3390/cancers8060057>
66. Little DW, Dumontet T, LaPensee CR, Hammer GD (2021) β -catenin in adrenal zonation and disease. *Mol Cell Endocrinol* 522:111120. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111120>
67. Butz H, Rácz K, Hunyady L, Patócs A (2012) Crosstalk between TGF- β signaling and the microRNA machinery. *Trends Pharmacol Sci* 33:382–393. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.04.003>

68. Baba AB, Rah B, Bhat GhR, et al (2022) Transforming Growth Factor-Beta (TGF- β) Signaling in Cancer-A Betrayal Within. *Front Pharmacol* 13:791272. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.791272>
69. Syed V (2016) TGF- β Signaling in Cancer. *J Cell Biochem* 117:1279–1287. <https://doi.org/10.1002/jcb.25496>
70. Cairns P (2010) Renal cell carcinoma. *Cancer Biomark Sect Dis Markers* 9:461–473. <https://doi.org/10.3233/CBM-2011-0176>
71. Srigley JR, Delahunt B, Eble JN, et al (2013) The International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver Classification of Renal Neoplasia. *Am J Surg Pathol* 37:1469–1489. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318299f2d1>
72. Vera-Badillo FE, Templeton AJ, Duran I, et al (2015) Systemic therapy for non-clear cell renal cell carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur Urol* 67:740–749. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.05.010>
73. Petejova N, Martinek A (2016) Renal cell carcinoma: Review of etiology, pathophysiology and risk factors. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov* 160:183–194. <https://doi.org/10.5507/bp.2015.050>
74. Jung M, Mollenkopf H-J, Grimm C, et al (2009) MicroRNA profiling of clear cell renal cell cancer identifies a robust signature to define renal malignancy. *J Cell Mol Med* 13:3918–3928. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00705.x>
75. White NMA, Bao TT, Grigull J, et al (2011) miRNA profiling for clear cell renal cell carcinoma: biomarker discovery and identification of potential controls and consequences of miRNA dysregulation. *J Urol* 186:1077–1083. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2011.04.110>
76. Goodman VL, Rock EP, Dagher R, et al (2007) Approval Summary: Sunitinib for the Treatment of Imatinib Refractory or Intolerant Gastrointestinal Stromal Tumors and Advanced Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:1367–1373. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2328>
77. Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, et al (2006) Activity of SU11248, a Multitargeted Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor and Platelet-Derived Growth Factor Receptor, in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 24:16–24. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.02.2574>
78. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al (2007) Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 356:115–124. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065044>
79. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, et al (2009) Overall Survival and Updated Results for Sunitinib Compared With Interferon Alfa in Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* 27:3584–3590. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.1293>
80. Heng DY, Mackenzie MJ, Vaishampayan UN, et al (2012) Primary anti-vascular endothelial growth factor (VEGF)-refractory metastatic renal cell carcinoma: clinical characteristics, risk factors, and subsequent therapy. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 23:1549–1555. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr533>
81. Rini BI, Flaherty K (2008) Clinical effect and future considerations for molecularly-targeted therapy in renal cell carcinoma. *Urol Oncol* 26:543–549. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2008.03.012>

82. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, et al (2008) Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 7:3129–3140. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0013>
83. He Y, Luo Y, Huang L, et al (2021) New frontiers against sorafenib resistance in renal cell carcinoma: From molecular mechanisms to predictive biomarkers. *Pharmacol Res* 170:105732. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105732>
84. Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al (2008) Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359:378–390. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0708857>
85. Kuczyński EA, Yin M, Bar-Zion A, et al (2016) Co-option of Liver Vessels and Not Sprouting Angiogenesis Drives Acquired Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 108:djw030. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw030>
86. Kuczyński EA, Sargent DJ, Grothey A, Kerbel RS (2013) Drug rechallenge and treatment beyond progression--implications for drug resistance. *Nat Rev Clin Oncol* 10:571–587. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2013.158>
87. Nozawa M, Yamamoto Y, Minami T, et al (2012) Sorafenib rechallenge in patients with metastatic renal cell carcinoma. *BJU Int* 110:E228-234. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10905.x>
88. Hockley SL, Mathijs K, Staal YCM, et al (2009) Interlaboratory and Interplatform Comparison of Microarray Gene Expression Analysis of HepG2 Cells Exposed to Benzo(a)pyrene. *OMICS J Integr Biol* 13:115–125. <https://doi.org/10.1089/omi.2008.0060>
89. Severgnini M, Bicciato S, Mangano E, et al (2006) Strategies for comparing gene expression profiles from different microarray platforms: Application to a case–control experiment. *Anal Biochem* 353:43–56. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.023>
90. Pasic MD, Samaan S, Yousef GM (2013) Genomic medicine: new frontiers and new challenges. *Clin Chem* 59:158–167. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.184622>
91. Arsanious A, Bjarnason GA, Yousef GM (2009) From bench to bedside: current and future applications of molecular profiling in renal cell carcinoma. *Mol Cancer* 8:20. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-20>
92. Daly AF, Burlacu MC, Livadariu E, Beckers A (2007) The epidemiology and management of pituitary incidentalomas. *Horm Res* 68 Suppl 5:195–198. <https://doi.org/10.1159/000110624>
93. Daly AF, Rixhon M, Adam C, et al (2006) High prevalence of pituitary adenomas: a cross-sectional study in the province of Liege, Belgium. *J Clin Endocrinol Metab* 91:4769–4775. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-1668>
94. Ezzat S, Asa SL, Couldwell WT, et al (2004) The prevalence of pituitary adenomas: a systematic review. *Cancer* 101:613–619. <https://doi.org/10.1002/cncr.20412>
95. Caimari F, Korbonits M (2016) Novel Genetic Causes of Pituitary Adenomas. *Clin Cancer Res* 22:5030–5042. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0452>
96. Németh K, Darvasi O, Szűcs N, et al (2018) [The role of miRNAs in the pathogenesis of pituitary adenomas]. *Orv Hetil* 159:252–259. <https://doi.org/10.1556/650.2018.30922>
97. Mete O, Lopes MB (2017) Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol* 28:228–243. <https://doi.org/10.1007/s12022-017-9498-z>

98. Tritos NA, Miller KK (2023) Diagnosis and Management of Pituitary Adenomas: A Review. *JAMA* 329:1386–1398. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.5444>
99. Andela CD, Lobatto DJ, Pereira AM, et al (2018) How non-functioning pituitary adenomas can affect health-related quality of life: a conceptual model and literature review. *Pituitary* 21:208–216. <https://doi.org/10.1007/s11102-017-0860-4>
100. Johnson MD, Woodburn CJ, Vance ML (2003) Quality of life in patients with a pituitary adenoma. *Pituitary* 6:81–87. <https://doi.org/10.1023/b:pitu.00000004798.27230.ed>
101. Jonsson B, Nilsson B (2000) The impact of pituitary adenoma on morbidity. Increased sick leave and disability retirement in a cross-sectional analysis of Swedish national data. *Pharmacoeconomics* 18:73–81. <https://doi.org/10.2165/00019053-200018010-00008>
102. Iglesias P, Magallón R, Mitjavila M, et al (2020) Multimodal therapy in aggressive pituitary tumors. *Endocrinol Diabetes Nutr* 67:469–485. <https://doi.org/10.1016/j.endinu.2019.08.004>
103. Butz H, Likó I, Czirják S, et al (2010) Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 95:E181–191. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0581>
104. Di Ieva A, Butz H, Niamah M, et al (2014) MicroRNAs as biomarkers in pituitary tumors. *Neurosurgery* 75:181–189; discussion 188–189. <https://doi.org/10.1227/NEU.0000000000000369>
105. Dasari A, Shen C, Halperin D, et al (2017) Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol* 3:1335–1342. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0589>
106. Li D, Rock A, Kessler J, et al (2020) Understanding the Management and Treatment of Well-Differentiated Pancreatic Neuroendocrine Tumors: A Clinician’s Guide to a Complex Illness. *JCO Oncol Pract* 16:720–728. <https://doi.org/10.1200/JCOOP.20.00010>
107. Modlin IM, Gustafsson BI, Moss SF, et al (2010) Chromogranin A--biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease. *Ann Surg Oncol* 17:2427–2443. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1006-3>
108. Yao JC, Hassan M, Phan A, et al (2008) One hundred years after “carcinoid”: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 26:3063–3072. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.4377>
109. Ro C, Chai W, Yu VE, Yu R (2013) Pancreatic neuroendocrine tumors: biology, diagnosis, and treatment. *Chin J Cancer* 32:312–324. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10295>
110. Gkolfinopoulos S, Tsapakidis K, Papadimitriou K, et al (2017) Chromogranin A as a valid marker in oncology: Clinical application or false hopes? *World J Methodol* 7:9–15. <https://doi.org/10.5662/wjm.v7.i1.9>
111. Özaslan E, Karacan H, Şimşek Y, Bayram F (2014) An Overview of Neuroendocrine Tumour Markers. *Turk J Endocrinol Metab* 18:132–136. <https://doi.org/10.4274/tjem.2422>
112. Di Giacinto P, Rota F, Rizza L, et al (2018) Chromogranin A: From Laboratory to Clinical Aspects of Patients with Neuroendocrine Tumors. *Int J Endocrinol* 2018:8126087. <https://doi.org/10.1155/2018/8126087>

113. Malczewska A, Kidd M, Matar S, et al (2018) A Comprehensive Assessment of the Role of miRNAs as Biomarkers in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology* 107:73–90. <https://doi.org/10.1159/000487326>
114. Zatelli MC, Grossrubatscher EM, Guadagno E, et al (2017) Circulating tumor cells and miRNAs as prognostic markers in neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer* 24:R223–R237. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0091>
115. Butz H, Szabó PM, Nofech-Mozes R, et al (2014) Integrative Bioinformatics Analysis Reveals New Prognostic Biomarkers of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Chem* 60:1314–1326. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.225854>
116. Butz H, Szabó PM, Khella HWZ, et al (2015) miRNA-target network reveals miR-124as a key miRNA contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behaviour by targeting CAV1 and FLOT1. *Oncotarget* 6:12543–12557. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3815>
117. Németh K, Szücs N, Czirják S, et al (2018) Survivin as a potential therapeutic target of acetylsalicylic acid in pituitary adenomas. *Oncotarget* 9:29180–29192. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25650>
118. Butz H, Németh K, Czenke D, et al (2017) Systematic Investigation of Expression of G2/M Transition Genes Reveals CDC25 Alteration in Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *Pathol Oncol Res* 23:633–641. <https://doi.org/10.1007/s12253-016-0163-5>
119. Darvasi O, Szabo PM, Nemeth K, et al (2019) Limitations of high throughput methods for miRNA expression profiles in non-functioning pituitary adenomas. *Pathol Oncol Res* 25:169–182. <https://doi.org/10.1007/s12253-017-0330-3>
120. Kövesdi A, Kurucz PA, Nyíró G, et al (2020) Circulating miRNA Increases the Diagnostic Accuracy of Chromogranin A in Metastatic Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Cancers* 12:2488. <https://doi.org/10.3390/cancers12092488>
121. Németh K, Darvasi O, Likó I, et al (2019) Comprehensive Analysis of Circulating miRNAs in the Plasma of Patients With Pituitary Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 104:4151–4168. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-02479>
122. Rajaraman V, Schulder M (1999) Postoperative MRI appearance after transsphenoidal pituitary tumor resection. *Surg Neurol* 52:592–599. [https://doi.org/10.1016/S0090-3019\(99\)00157-3](https://doi.org/10.1016/S0090-3019(99)00157-3)
123. Szabó B, Németh K, Mészáros K, et al (2022) Aspirin Mediates Its Antitumoral Effect Through Inhibiting PTTG1 in Pituitary Adenoma. *J Clin Endocrinol Metab* 107:3066–3079. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgac496>
124. Szabó B, Németh K, Mészáros K, et al (2020) Demethylation Status of Somatic DNA Extracted From Pituitary Neuroendocrine Tumors Indicates Proliferative Behavior. *J Clin Endocrinol Metab* 105:2015–2026. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa156>
125. Krokker L, Nyíró G, Reiniger L, et al (2019) Differentially Expressed miRNAs Influence Metabolic Processes in Pituitary Oncocytoma. *Neurochem Res* 44:2360–2371. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02789-2>
126. Murani E, Trakooljul N, Hadlich F, et al (2022) Brain Transcriptome Responses to Dexamethasone Depending on Dose and Sex Reveal Factors Contributing to Sex-Specific Vulnerability to Stress-Induced Disorders. *Neuroendocrinology* 112:235–251. <https://doi.org/10.1159/000516500>

127. Krokker L, Patócs A, Butz H (2021) Essential Role of the 14q32 Encoded miRNAs in Endocrine Tumors. *Genes* 12:698. <https://doi.org/10.3390/genes12050698>
128. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, et al (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles* 7:1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
129. Maas SLN, De Vrij J, Broekman MLD (2014) Quantification and Size-profiling of Extracellular Vesicles Using Tunable Resistive Pulse Sensing. *J Vis Exp* 51623. <https://doi.org/10.3791/51623>
130. Ramos A, Santos C, Barbena E, et al (2011) Validated primer set that prevents nuclear DNA sequences of mitochondrial origin co-amplification: A revision based on the New Human Genome Reference Sequence (GRCh37). *ELECTROPHORESIS* 32:782–783. <https://doi.org/10.1002/elps.201000583>
131. Kloss-Brandstätter A, Weissensteiner H, Erhart G, et al (2015) Validation of Next-Generation Sequencing of Entire Mitochondrial Genomes and the Diversity of Mitochondrial DNA Mutations in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE* 10:e0135643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135643>
132. Butz H, Ding Q, Nofech-Mozes R, et al (2018) Elucidating mechanisms of sunitinib resistance in renal cancer: an integrated pathological-molecular analysis. *Oncotarget* 9:4661–4674. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23163>
133. Urgese G, Paciello G, Acquaviva A, Ficarra E (2016) isomiR-SEA: an RNA-Seq analysis tool for miRNAs/isomiRs expression level profiling and miRNA-mRNA interaction sites evaluation. *BMC Bioinformatics* 17:148. <https://doi.org/10.1186/s12859-016-0958-0>
134. Khella HWZ, Butz H, Ding Q, et al (2015) miR-221/222 Are Involved in Response to Sunitinib Treatment in Metastatic Renal Cell Carcinoma. *Mol Ther* 23:1748–1758. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.129>
135. Krokker L, Szabó B, Németh K, et al (2021) Three Dimensional Cell Culturing for Modeling Adrenal and Pituitary Tumors. *Pathol Oncol Res* 27:640676. <https://doi.org/10.3389/pore.2021.640676>
136. Pan Z, Grizzle W, Hameed O (2013) Significant Variation of Immunohistochemical Marker Expression in Paired Primary and Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *Am J Clin Pathol* 140:410–418. <https://doi.org/10.1309/AJCP8DMPEIMVH6YP>
137. Tang TC, Man S, Lee CR, et al (2010) Impact of Metronomic UFT/Cyclophosphamide Chemotherapy and Antiangiogenic Drug Assessed in a New Preclinical Model of Locally Advanced Orthotopic Hepatocellular Carcinoma. *Neoplasia* 12:264–274. <https://doi.org/10.1593/neo.91872>
138. Németh K, Mészáros K, Szabó B, et al (2021) A relative quantitation method for measuring DNA methylation and hydroxymethylation using guanine as an internal standard. *Anal Methods* 13:4614–4622. <https://doi.org/10.1039/D1AY00897H>
139. Mészáros K, Karvaly G, Márta Z, et al (2018) Diagnostic performance of a newly developed salivary cortisol and cortisone measurement using an LC–MS/MS method with simple and rapid sample preparation. *J Endocrinol Invest* 41:315–323. <https://doi.org/10.1007/s40618-017-0743-6>
140. Butz H, Mészáros K, Likó I, Patocs A (2021) Wnt-Signaling Regulated by Glucocorticoid-Induced miRNAs. *Int J Mol Sci* 22:11778. <https://doi.org/10.3390/ijms222111778>

141. Vidal M, Cusick ME, Barabási A-L (2011) Interactome Networks and Human Disease. *Cell* 144:986–998. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.016>
142. Jothi R, Balaji S, Wuster A, et al (2009) Genomic analysis reveals a tight link between transcription factor dynamics and regulatory network architecture. *Mol Syst Biol* 5:294. <https://doi.org/10.1038/msb.2009.52>
143. Liu Y-Y, Slotine J-J, Barabási A-L (2012) Control Centrality and Hierarchical Structure in Complex Networks. *PLoS ONE* 7:e44459. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044459>
144. Budczies J, Klauschen F, Sinn BV, et al (2012) Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. *PLoS ONE* 7:e51862. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051862>
145. Yang OCY, Maxwell PH, Pollard PJ (2013) Renal cell carcinoma: translational aspects of metabolism and therapeutic consequences. *Kidney Int* 84:667–681. <https://doi.org/10.1038/ki.2013.245>
146. Wang Z, Snyder M, Kenison JE, et al (2020) How the AHR Became Important in Cancer: The Role of Chronically Active AHR in Cancer Aggression. *Int J Mol Sci* 22:387. <https://doi.org/10.3390/ijms22010387>
147. Huang T-C, Chang H-Y, Chen C-Y, et al (2011) Silencing of miR-124 induces neuroblastoma SK-N-SH cell differentiation, cell cycle arrest and apoptosis through promoting AHR. *FEBS Lett* 585:3582–3586. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.10.025>
148. Schlezinger JJ, Liu D, Farago M, et al (2006) A role for the aryl hydrocarbon receptor in mammary gland tumorigenesis. *Biol Chem* 387:. <https://doi.org/10.1515/BC.2006.145>
149. Ishida M, Mikami S, Kikuchi E, et al (2010) Activation of the aryl hydrocarbon receptor pathway enhances cancer cell invasion by upregulating the MMP expression and is associated with poor prognosis in upper urinary tract urothelial cancer. *Carcinogenesis* 31:287–295. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp222>
150. Mikami S, Oya M, Mizuno R, et al (2006) Expression of Ets-1 in human clear cell renal cell carcinomas: Implications for angiogenesis. *Cancer Sci* 97:875–882. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00268.x>
151. Xu X, Li S, Lin Y, et al (2013) MicroRNA-124-3p inhibits cell migration and invasion in bladder cancer cells by targeting ROCK1. *J Transl Med* 11:276. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-11-276>
152. Li W, Zang W, Liu P, et al (2014) MicroRNA-124 inhibits cellular proliferation and invasion by targeting Ets-1 in breast cancer. *Tumor Biol* 35:10897–10904. <https://doi.org/10.1007/s13277-014-2402-2>
153. Park S-Y, Kim H, Yoon S, et al (2014) KITENIN-targeting MicroRNA-124 Suppresses Colorectal Cancer Cell Motility and Tumorigenesis. *Mol Ther* 22:1653–1664. <https://doi.org/10.1038/mt.2014.105>
154. Peng XH, Huang HR, Lu J, et al (2014) MiR-124 suppresses tumor growth and metastasis by targeting Foxq1 in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer* 13:186. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-186>
155. Xie L, Zhang Z, Tan Z, et al (2014) microRNA-124 inhibits proliferation and induces apoptosis by directly repressing EZH2 in gastric cancer. *Mol Cell Biochem* 392:153–159. <https://doi.org/10.1007/s11010-014-2028-0>

156. Wang P, Chen L, Zhang J, et al (2014) Methylation-mediated silencing of the miR-124 genes facilitates pancreatic cancer progression and metastasis by targeting Rac1. *Oncogene* 33:514–524. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.598>
157. Lu Y, Yue X, Cui Y, et al (2013) MicroRNA-124 suppresses growth of human hepatocellular carcinoma by targeting STAT3. *Biochem Biophys Res Commun* 441:873–879. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.157>
158. Chen T, Wang X, Li C, Xu S (2015) Downregulation of microRNA-124 predicts poor prognosis in glioma patients. *Neurol Sci* 36:131–135. <https://doi.org/10.1007/s10072-014-1895-1>
159. Le PU, Guay G, Altschuler Y, Nabi IR (2002) Caveolin-1 Is a Negative Regulator of Caveolae-mediated Endocytosis to the Endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 277:3371–3379. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111240200>
160. Chanvorachote P, Chunhacha P, Pongrakhananon V (2014) Caveolin-1 induces lamellipodia formation via an Akt-dependent pathway. *Cancer Cell Int* 14:52. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-52>
161. Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG (1998) A Requirement for Caveolin-1 and Associated Kinase Fyn in Integrin Signaling and Anchorage-Dependent Cell Growth. *Cell* 94:625–634. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81604-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81604-9)
162. Fiucci G, Ravid D, Reich R, Liscovitch M (2002) Caveolin-1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 21:2365–2375. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205300>
163. Steffens S, Schrader AJ, Blasig H, et al (2011) Caveolin 1 protein expression in renal cell carcinoma predicts survival. *BMC Urol* 11:25. <https://doi.org/10.1186/1471-2490-11-25>
164. Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8:46–54. <https://doi.org/10.1038/ncb1342>
165. Amaddii M, Meister M, Banning A, et al (2012) Flotillin-1/Reggie-2 Protein Plays Dual Role in Activation of Receptor-tyrosine Kinase/Mitogen-activated Protein Kinase Signaling. *J Biol Chem* 287:7265–7278. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.287599>
166. Zhang Y, Li J, Song Y, et al (2014) Flotillin-1 expression in human clear-cell renal cell carcinoma is associated with cancer progression and poor patient survival. *Mol Med Rep* 10:860–866. <https://doi.org/10.3892/mmr.2014.2310>
167. Wang X, Zhang L, O'Neill A, et al (2013) Cox-2 inhibition enhances the activity of sunitinib in human renal cell carcinoma xenografts. *Br J Cancer* 108:319–326. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.591>
168. Ozcan A, Shen SS, Hamilton C, et al (2011) PAX 8 expression in non-neoplastic tissues, primary tumors, and metastatic tumors: a comprehensive immunohistochemical study. *Mod Pathol* 24:751–764. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.3>
169. Jin J, Xie Y, Zhang J-S, et al (2023) Sunitinib resistance in renal cell carcinoma: From molecular mechanisms to predictive biomarkers. *Drug Resist Updat* 67:100929. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.100929>
170. Doberstein K, Wieland A, Lee SBB, et al (2011) L1-CAM expression in ccRCC correlates with shorter patients survival times and confers chemoresistance in renal cell carcinoma cells. *Carcinogenesis* 32:262–270. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq249>

171. Chang A, Brimo F, Montgomery EA, Epstein JI (2013) Use of PAX8 and GATA3 in diagnosing sarcomatoid renal cell carcinoma and sarcomatoid urothelial carcinoma. *Hum Pathol* 44:1563–1568. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.12.012>
172. Hammers HJ, Verheul HM, Salumbides B, et al (2010) Reversible Epithelial to Mesenchymal Transition and Acquired Resistance to Sunitinib in Patients with Renal Cell Carcinoma: Evidence from a Xenograft Study. *Mol Cancer Ther* 9:1525–1535. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-09-1106>
173. Zhan Q, Huang R-F, Liang X-H, et al (2014) FRAS1 knockdown reduces A549 cells migration and invasion through downregulation of FAK signaling. *Int J Clin Exp Med* 7:1692–1697
174. Díaz-López A, Iniesta P, Morán A, et al (2011) Expression of Human MDGA1 Increases Cell Motility and Cell-Cell Adhesion and Reduces Adhesion to Extracellular Matrix Proteins in MDCK Cells. *Cancer Microenviron* 4:23–32. <https://doi.org/10.1007/s12307-010-0055-2>
175. Han C, Yu Z, Duan Z, Kan Q (2014) Role of MicroRNA-1 in Human Cancer and Its Therapeutic Potentials. *BioMed Res Int* 2014:1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/428371>
176. Wang Z, Zhang H, Zhang P, et al (2016) MicroRNA-663 suppresses cell invasion and migration by targeting transforming growth factor beta 1 in papillary thyroid carcinoma. *Tumor Biol* 37:7633–7644. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4653-y>
177. Li P, Zhu N, Yi B, et al (2013) MicroRNA-663 Regulates Human Vascular Smooth Muscle Cell Phenotypic Switch and Vascular Neointimal Formation. *Circ Res* 113:1117–1127. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301306>
178. Yan-Fang T, Jian N, Jun L, et al (2013) The promoter of miR-663 is hypermethylated in Chinese pediatric acute myeloid leukemia (AML). *BMC Med Genet* 14:74. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-14-74>
179. Yanokura M, Banno K, Adachi M, et al (2017) Genome-wide DNA methylation sequencing reveals miR-663a is a novel epimutation candidate in CIMP-high endometrial cancer. *Int J Oncol* 50:1934–1946. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3966>
180. Butz H, Likó I, Czirják S, et al (2011) MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFβ pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 14:112–124. <https://doi.org/10.1007/s11102-010-0268-x>
181. Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, et al (2007) A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer* 14:887–900. <https://doi.org/10.1677/ERC-07-0062>
182. Raverot G, Wierinckx A, Dantony E, et al (2010) Prognostic Factors in Prolactin Pituitary Tumors: Clinical, Histological, and Molecular Data from a Series of 94 Patients with a Long Postoperative Follow-Up. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1708–1716. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1191>
183. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B (2007) CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? *Nat Rev Cancer* 7:495–507. <https://doi.org/10.1038/nrc2169>
184. Mraz M, Dolezalova D, Plevova K, et al (2012) MicroRNA-650 expression is influenced by immunoglobulin gene rearrangement and affects the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 119:2110–2113. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-394874>

185. Chien WW, Domenech C, Catallo R, et al (2011) Cyclin-dependent kinase 1 expression is inhibited by p16INK4a at the post-transcriptional level through the microRNA pathway. *Oncogene* 30:1880–1891. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.570>
186. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, et al (2010) Systemic Delivery of Synthetic MicroRNA-16 Inhibits the Growth of Metastatic Prostate Tumors via Downregulation of Multiple Cell-cycle Genes. *Mol Ther* 18:181–187. <https://doi.org/10.1038/mt.2009.207>
187. Németh K, Darvasi O, Likó I, et al (2019) Next-generation sequencing identifies novel mitochondrial variants in pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest* 42:931–940. <https://doi.org/10.1007/s40618-019-1005-6>
188. Rouault TA, Tong WH (2008) Iron–sulfur cluster biogenesis and human disease. *Trends Genet* 24:398–407. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2008.05.008>
189. Konieczna A, Szczepańska A, Sawiuk K, et al (2015) Effects of partial silencing of genes coding for enzymes involved in glycolysis and tricarboxylic acid cycle on the entrance of human fibroblasts to the S phase. *BMC Cell Biol* 16:16. <https://doi.org/10.1186/s12860-015-0062-8>
190. Jiang H, Hua D, Zhang J, et al (2014) MicroRNA-127-3p promotes glioblastoma cell migration and invasion by targeting the tumor-suppressor gene SEPT7. *Oncol Rep* 31:2261–2269. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3055>
191. Müssnich P, Raverot G, Jaffrain-Rea M-L, et al (2015) Downregulation of miR-410 targeting the cyclin B1 gene plays a role in pituitary gonadotroph tumors. *Cell Cycle* 14:2590–2597. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1064207>
192. Kleemann M, Schneider H, Unger K, et al (2018) MiR-744-5p inducing cell death by directly targeting HNRNPC and NFIX in ovarian cancer cells. *Sci Rep* 8:9020. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27438-6>
193. Zhou X, Ye F, Yin C, et al (2015) The Interaction Between MiR-141 and lncRNA-H19 in Regulating Cell Proliferation and Migration in Gastric Cancer. *Cell Physiol Biochem* 36:1440–1452. <https://doi.org/10.1159/000430309>
194. Wang P, Mai C, Wei Y, et al (2013) Decreased expression of the mitochondrial metabolic enzyme aconitase (ACO2) is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Med Oncol* 30:552. <https://doi.org/10.1007/s12032-013-0552-5>
195. Yuan X, Berg N, Lee JW, et al (2018) MicroRNA miR-223 as regulator of innate immunity. *J Leukoc Biol* 104:515–524. <https://doi.org/10.1002/JLB.3MR0218-079R>
196. Chen Y, Zubovic L, Yang F, et al (2016) Rbfox proteins regulate microRNA biogenesis by sequence-specific binding to their precursors and target downstream Dicer. *Nucleic Acids Res* 44:4381–4395. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw177>
197. Cheng Y, Zhu Y, Xu J, et al (2018) PKN2 in colon cancer cells inhibits M2 phenotype polarization of tumor-associated macrophages via regulating DUSP6-Erk1/2 pathway. *Mol Cancer* 17:13. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0747-z>
198. Li K, Fang Y, Liao J, et al (2017) Upregulation of miR-598 promotes cell proliferation and cell cycle progression in human colorectal carcinoma by suppressing INPP5E expression. *Mol Med Rep*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8207>
199. Chang M, Lin H, Fu H, et al (2017) MicroRNA-195-5p Regulates Osteogenic Differentiation of Periodontal Ligament Cells Under Mechanical Loading. *J Cell Physiol* 232:3762–3774. <https://doi.org/10.1002/jcp.25856>

200. Zhu N, Huang K, Liu Y, et al (2018) miR-195-5p Regulates Hair Follicle Inductivity of Dermal Papilla Cells by Suppressing Wnt/ β -Catenin Activation. *BioMed Res Int* 2018:1–13. <https://doi.org/10.1155/2018/4924356>
201. Zhao M-C, Zhang M-M, Li T, et al (2020) MiR-566 protects the malignant progression of breast cancer by negatively regulating WNT6. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 24:6185–6194. https://doi.org/10.26355/eurev_202006_21514
202. Xi M, Cheng L, Hua W, et al (2019) MicroRNA-95-3p promoted the development of prostatic cancer via regulating DKK3 and activating Wnt/ β -catenin pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 23:1002–1011. https://doi.org/10.26355/eurev_201902_16987
203. Wang G, Zhou J, Lu F, et al (2019) Downregulation of microRNA-183-5p inhibits the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by inactivating the reticulocalbin-2/Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Mol Med Rep*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10059>
204. Falzone L, Scola L, Zanghi A, et al (2018) Integrated analysis of colorectal cancer microRNA datasets: identification of microRNAs associated with tumor development. *Aging* 10:1000–1014. <https://doi.org/10.18632/aging.101444>
205. von Brandenstein M, Pandarakalam JJ, Kroon L, et al (2012) MicroRNA 15a, Inversely Correlated to PKC α , Is a Potential Marker to Differentiate between Benign and Malignant Renal Tumors in Biopsy and Urine Samples. *Am J Pathol* 180:1787–1797. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.01.014>
206. Raimondo F, Morosi L, Corbetta S, et al (2013) Differential protein profiling of renal cell carcinoma urinary exosomes. *Mol Biosyst* 9:1220–1233. <https://doi.org/10.1039/c3mb25582d>
207. Juan D, Alexe G, Antes T, et al (2010) Identification of a microRNA panel for clear-cell kidney cancer. *Urology* 75:835–841. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.10.033>
208. Vogt M, Munding J, Grüner M, et al (2011) Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Arch Int J Pathol* 458:313–322. <https://doi.org/10.1007/s00428-010-1030-5>
209. Chen H, Lin Y, Mao Y, et al (2012) MicroRNA-449a acts as a tumor suppressor in human bladder cancer through the regulation of pocket proteins. *Cancer Lett* 320:40–47. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.01.027>
210. Tahiri A, Leivonen S-K, Lüders T, et al (2014) Deregulation of cancer-related miRNAs is a common event in both benign and malignant human breast tumors. *Carcinogenesis* 35:76–85. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt333>
211. Slaby O, Redova M, Poprach A, et al (2012) Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients. *Genes Chromosomes Cancer* 51:707–716. <https://doi.org/10.1002/gcc.21957>
212. Verghe D, Kneitz S, Rosenwald A, et al (2014) Combination of expression levels of miR-21 and miR-126 is associated with cancer-specific survival in clear-cell renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 14:25. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-25>
213. Khella HWZ, White NMA, Faragalla H, et al (2012) Exploring the role of miRNAs in renal cell carcinoma progression and metastasis through bioinformatic and experimental analyses. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 33:131–140. <https://doi.org/10.1007/s13277-011-0255-5>

214. Yang C, Robbins PD (2011) The roles of tumor-derived exosomes in cancer pathogenesis. *Clin Dev Immunol* 2011:842849. <https://doi.org/10.1155/2011/842849>
215. Liu Y, Zhao L, Li D, et al (2013) Microvesicle-delivery miR-150 promotes tumorigenesis by up-regulating VEGF, and the neutralization of miR-150 attenuate tumor development. *Protein Cell* 4:932–941. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-3092-z>
216. Li J, Zhang Y, Liu Y, et al (2013) Microvesicle-mediated transfer of microRNA-150 from monocytes to endothelial cells promotes angiogenesis. *J Biol Chem* 288:23586–23596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.489302>
217. Yang L, Wu X, Wang D, et al (2013) Renal carcinoma cell-derived exosomes induce human immortalized line of Jurkat T lymphocyte apoptosis in vitro. *Urol Int* 91:363–369. <https://doi.org/10.1159/000348747>
218. Jiang XL, Zhang Y, Tan B, et al (2014) Renal tumor-derived exosomes inhibit hepaCAM expression of renal carcinoma cells in a p-AKT-dependent manner. *Neoplasma* 61:416–423. https://doi.org/10.4149/neo_2014_051
219. Tonge DP, Gant TW (2016) What is normal? Next generation sequencing-driven analysis of the human circulating miRNAome. *BMC Mol Biol* 17:4. <https://doi.org/10.1186/s12867-016-0057-9>
220. Burgos KL, Javaherian A, Bompreszi R, et al (2013) Identification of extracellular miRNA in human cerebrospinal fluid by next-generation sequencing. *RNA N Y N* 19:712–722. <https://doi.org/10.1261/rna.036863.112>
221. Bottoni A, Zatelli MC, Ferracin M, et al (2007) Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: A possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J Cell Physiol* 210:370–377. <https://doi.org/10.1002/jcp.20832>
222. Butz H, Likó I, Czirják S, et al (2011) MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFβ pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 14:112–124. <https://doi.org/10.1007/s11102-010-0268-x>
223. Cheunsuchon P, Zhou Y, Zhang X, et al (2011) Silencing of the imprinted DLK1-MEG3 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Am J Pathol* 179:2120–2130. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.07.002>
224. Liang S, Chen L, Huang H, Zhi D (2013) The experimental study of miRNA in pituitary adenomas. *Turk Neurosurg* 23:721–727. <https://doi.org/10.5137/1019-5149.JTN.7425-12.1>
225. D'Angelo D, Palmieri D, Mussnich P, et al (2012) Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1. *J Clin Endocrinol Metab* 97:E1128-1138. <https://doi.org/10.1210/jc.2011-3482>
226. Mao Z-G, He D-S, Zhou J, et al (2010) Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol* 5:79. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-5-79>
227. Perge P, Decmann Á, Pezzani R, et al (2018) Analysis of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in cortisol-producing adrenocortical tumors. *Endocrine* 59:280–287. <https://doi.org/10.1007/s12020-017-1506-z>
228. Perge P, Butz H, Pezzani R, et al (2017) Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci Rep* 7:5474. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05777-0>

229. Salem O, Erdem N, Jung J, et al (2016) The highly expressed 5' isomiR of hsa-miR-140-3p contributes to the tumor-suppressive effects of miR-140 by reducing breast cancer proliferation and migration. *BMC Genomics* 17:566. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2869-x>
230. Tan GC, Dibb N (2015) IsomiRs have functional importance. *Malays J Pathol* 37:73–81
231. Haseeb A, Makki MS, Khan NM, et al (2017) Deep sequencing and analyses of miRNAs, isomiRs and miRNA induced silencing complex (miRISC)-associated miRNome in primary human chondrocytes. *Sci Rep* 7:15178. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15388-4>
232. Krawczynski K, Bauersachs S, Reliszko ZP, et al (2015) Expression of microRNAs and isomiRs in the porcine endometrium: implications for gene regulation at the maternal-conceptus interface. *BMC Genomics* 16:906. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2172-2>
233. Heneghan HM, Miller N, Kerin MJ (2010) Circulating miRNA signatures: promising prognostic tools for cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 28:e573-574; author reply e575-576. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.29.8901>
234. Bala S, Csak T, Momen-Heravi F, et al (2015) Biodistribution and function of extracellular miRNA-155 in mice. *Sci Rep* 5:10721. <https://doi.org/10.1038/srep10721>
235. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T (2006) MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep* 16:845–850
236. Das AV, Pillai RM (2015) Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis. *Cancer Cell Int* 15:92. <https://doi.org/10.1186/s12935-015-0247-4>
237. Sun X, Dai G, Yu L, et al (2018) miR-143-3p inhibits the proliferation, migration and invasion in osteosarcoma by targeting FOSL2. *Sci Rep* 8:606. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18739-3>
238. Amaral FC, Torres N, Saggioro F, et al (2009) MicroRNAs differentially expressed in ACTH-secreting pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 94:320–323. <https://doi.org/10.1210/jc.2008-1451>
239. Butz H, Likó I, Czirják S, et al (2011) MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFβ pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary* 14:112–124. <https://doi.org/10.1007/s11102-010-0268-x>
240. Zhang J, Ma D, Liu H, et al (2017) MicroRNA-143 shows tumor suppressive effects through inhibition of oncogenic K-Ras in pituitary tumor. *Int J Clin Exp Pathol* 10:10969–10978
241. Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, et al (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res MCR* 1:882–891
242. Shah JS, Soon PS, Marsh DJ (2016) Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PloS One* 11:e0153200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153200>
243. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M (2012) MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet* 13:358–369. <https://doi.org/10.1038/nrg3198>
244. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, et al (2012) Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res Phila Pa* 5:492–497. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370>

245. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, et al (2013) Plasma Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. *PLOS ONE* 8:e64795.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064795>
246. Németh K, Darvasi O, Likó I, et al (2019) Comprehensive analysis of circulating microRNAs in plasma of patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*.
<https://doi.org/10.1210/jc.2018-02479>
247. Jiang X, Shan A, Su Y, et al (2015) miR-144/451 Promote Cell Proliferation via Targeting PTEN/AKT Pathway in Insulinomas. *Endocrinology* 156:2429–2439.
<https://doi.org/10.1210/en.2014-1966>
248. Thorns C, Schurmann C, Gebauer N, et al (2014) Global microRNA profiling of pancreatic neuroendocrine neoplasias. *Anticancer Res* 34:2249–2254
249. Zhou H-Q, Chen Q-C, Qiu Z-T, et al (2016) Integrative microRNA-mRNA and protein-protein interaction analysis in pancreatic neuroendocrine tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 20:2842–2852
250. Lee YS, Kim H, Kim HW, et al (2015) High Expression of MicroRNA-196a Indicates Poor Prognosis in Resected Pancreatic Neuroendocrine Tumor. *Medicine (Baltimore)* 94:e2224.
<https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002224>
251. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, et al (2006) MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 24:4677–4684.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.5194>
252. Grolmusz VK, Kövesdi A, Borks K, et al (2018) Prognostic relevance of proliferation-related miRNAs in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Eur J Endocrinol* 179:219–228.
<https://doi.org/10.1530/EJE-18-0305>
253. Zimmermann N, Knief J, Kacprowski T, et al (2018) MicroRNA analysis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and metastases. *Oncotarget* 9:28379–28390.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.25357>
254. De Cubas AA, Leandro-García LJ, Schiavi F, et al (2013) Integrative analysis of miRNA and mRNA expression profiles in pheochromocytoma and paraganglioma identifies genotype-specific markers and potentially regulated pathways. *Endocr Relat Cancer* 20:477–493.
<https://doi.org/10.1530/ERC-12-0183>
255. Zong L, Meng L, Shi R (2015) Role of miR-101 in pheochromocytoma patients with SDHD mutation. *Int J Clin Exp Pathol* 8:1545–1554
256. Meyer-Rochow GY, Jackson NE, Conaglen JV, et al (2010) MicroRNA profiling of benign and malignant pheochromocytomas identifies novel diagnostic and therapeutic targets. *Endocr Relat Cancer* 17:835–846. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0142>
257. Tömböl Z, Eder K, Kovács A, et al (2010) MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 23:1583–1595. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.164>
258. Patterson E, Webb R, Weisbrod A, et al (2012) The microRNA expression changes associated with malignancy and SDHB mutation in pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer* 19:157–166.
<https://doi.org/10.1530/ERC-11-0308>

259. Lu J, Getz G, Miska EA, et al (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834–838. <https://doi.org/10.1038/nature03702>
260. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:10513–10518. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105>
261. Ma R, Jiang T, Kang X (2012) Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res CR* 31:38. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-38>
262. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, et al (2012) Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res Phila Pa* 5:492–497. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-11-0370>
263. Aakko S, Straume AH, Birkeland EE, et al (2019) MYC-Induced miR-203b-3p and miR-203a-3p Control Bcl-xL Expression and Paclitaxel Sensitivity in Tumor Cells. *Transl Oncol* 12:170–179. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2018.10.001>
264. Shen M, Dong C, Ruan X, et al (2019) Chemotherapy-Induced Extracellular Vesicle miRNAs Promote Breast Cancer Stemness by Targeting ONECUT2. *Cancer Res* 79:3608–3621. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-4055>
265. An N, Zheng B (2020) MiR-203a-3p Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation, EMT, and Apoptosis by Regulating SLUG. *Technol Cancer Res Treat* 19:1533033819898729. <https://doi.org/10.1177/1533033819898729>
266. Chen L, Gao H, Liang J, et al (2018) miR-203a-3p promotes colorectal cancer proliferation and migration by targeting PDE4D. *Am J Cancer Res* 8:2387–2401
267. Di C, Jiang Y, Li M, et al (2018) Circulating Exosomal microRNA Signature As a Noninvasive Biomarker for Diagnosis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood* 132:5406. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-115940>
268. Huang Z, Chen W, Du Y, et al (2019) Serum miR-16 as a potential biomarker for human cancer diagnosis: results from a large-scale population. *J Cancer Res Clin Oncol* 145:787–796. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02849-8>
269. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR (2004) Neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer* 11:1–18. <https://doi.org/10.1677/erc.0.0110001>
270. Li A, Yu J, Kim H, et al (2013) MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 19:3600–3610. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-3092>
271. Vicentini C, Calore F, Nigita G, et al (2020) Exosomal miRNA signatures of pancreatic lesions. *BMC Gastroenterol* 20:137. <https://doi.org/10.1186/s12876-020-01287-y>
272. Michaelis KA, Knox AJ, Xu M, et al (2011) Identification of Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible Gene β (GADD45 β) as a Novel Tumor Suppressor in Pituitary Gonadotrope Tumors. *Endocrinology* 152:3603–3613. <https://doi.org/10.1210/en.2011-0109>
273. Feng J, Hong L, Wu Y, et al (2014) Identification of a subtype-specific ENC1 gene related to invasiveness in human pituitary null cell adenoma and oncocytomas. *J Neurooncol* 119:307–315. <https://doi.org/10.1007/s11060-014-1479-1>

274. Herman JG, Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349:2042–2054. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>
275. An J, Rao A, Ko M (2017) TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers. *Exp Mol Med* 49:e323. <https://doi.org/10.1038/emm.2017.5>
276. Haffner MC, Chaux A, Meeker AK, et al (2011) Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers. *Oncotarget* 2:627–637. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.316>
277. Ruzov A, Tsenkina Y, Serio A, et al (2011) Lineage-specific distribution of high levels of genomic 5-hydroxymethylcytosine in mammalian development. *Cell Res* 21:1332–1342. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.113>
278. Ma H-S, Wang EL, Xu W-F, et al (2018) Overexpression of DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 1 (DNMT1) And DNA (Cytosine-5)-Methyltransferase 3A (DNMT3A) Is Associated with Aggressive Behavior and Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Human Pituitary Adenomas. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 24:4841–4850. <https://doi.org/10.12659/MSM.910608>
279. Chen K, Zhang J, Guo Z, et al (2016) Loss of 5-hydroxymethylcytosine is linked to gene body hypermethylation in kidney cancer. *Cell Res* 26:103–118. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.150>
280. Polepalli S, George SM, Valli Sri Vidya R, et al (2019) Role of UHRF1 in malignancy and its function as a therapeutic target for molecular docking towards the SRA domain. *Int J Biochem Cell Biol* 114:105558. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.06.006>
281. Chu J, Loughlin EA, Gaur NA, et al (2012) UHRF1 phosphorylation by cyclin A2/cyclin-dependent kinase 2 is required for zebrafish embryogenesis. *Mol Biol Cell* 23:59–70. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-06-0487>
282. Lu H, Hallstrom TC (2013) The nuclear protein UHRF2 is a direct target of the transcription factor E2F1 in the induction of apoptosis. *J Biol Chem* 288:23833–23843. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.447276>
283. Lu H, Bhoopatiraju S, Wang H, et al (2016) Loss of UHRF2 expression is associated with human neoplasia, promoter hypermethylation, decreased 5-hydroxymethylcytosine, and high proliferative activity. *Oncotarget* 7:76047–76061. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12583>
284. Sidhu H, Capalash N (2017) UHRF1: The key regulator of epigenetics and molecular target for cancer therapeutics. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 39:1010428317692205. <https://doi.org/10.1177/1010428317692205>
285. Derissen EJB, Beijnen JH, Schellens JHM (2013) Concise drug review: azacitidine and decitabine. *The Oncologist* 18:619–624. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2012-0465>
286. Chowdhury B, McGovern A, Cui Y, et al (2015) The hypomethylating agent Decitabine causes a paradoxical increase in 5-hydroxymethylcytosine in human leukemia cells. *Sci Rep* 5:9281. <https://doi.org/10.1038/srep09281>
287. Ye C, Jiang N, Zheng J, et al (2024) Epigenetic therapy: Research progress of decitabine in the treatment of solid tumors. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer* 1879:189066. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189066>
288. Jones PA, Issa J-PJ, Baylin S (2016) Targeting the cancer epigenome for therapy. *Nat Rev Genet* 17:630–641. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.93>

289. Al-Azzawi H, Yacqub-Usman K, Richardson A, et al (2011) Reversal of endogenous dopamine receptor silencing in pituitary cells augments receptor-mediated apoptosis. *Endocrinology* 152:364–373. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0886>
290. Yacqub-Usman K, Richardson A, Duong CV, et al (2012) The pituitary tumour epigenome: aberrations and prospects for targeted therapy. *Nat Rev Endocrinol* 8:486–494. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.54>
291. Yiannakopoulou E (2014) Targeting epigenetic mechanisms and microRNAs by aspirin and other non steroidal anti-inflammatory agents - implications for cancer treatment and chemoprevention. *Cell Oncol* 37:167–178. <https://doi.org/10.1007/s13402-014-0175-7>
292. Guo H, Liu J, Ben Q, et al (2016) The aspirin-induced long non-coding RNA OLA1P2 blocks phosphorylated STAT3 homodimer formation. *Genome Biol* 17:24. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0892-5>
293. Bertolin G, Tramier M (2020) Insights into the non-mitotic functions of Aurora kinase A: more than just cell division. *Cell Mol Life Sci CMLS* 77:1031–1047. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03310-2>
294. Porcelli L, Guida G, Quatrone AE, et al (2015) Aurora kinase B inhibition reduces the proliferation of metastatic melanoma cells and enhances the response to chemotherapy. *J Transl Med* 13:26. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0385-4>
295. Reed S, Quelle D (2014) p53 Acetylation: Regulation and Consequences. *Cancers* 7:30–69. <https://doi.org/10.3390/cancers7010030>
296. Tfelt-Hansen J, Kanuparthi D, Chattopadhyay N (2006) The Emerging Role of Pituitary Tumor Transforming Gene in Tumorigenesis. *Clin Med Res* 4:130–137
297. Read ML, Modasia B, Fletcher A, et al (2018) PTTG and PBF Functionally Interact with p53 and Predict Overall Survival in Head and Neck Cancer. *Cancer Res* 78:5863–5876. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0855>
298. Sheldon LA (2017) Inhibition of E2F1 activity and cell cycle progression by arsenic via retinoblastoma protein. *Cell Cycle* 16:2058–2072. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1338221>
299. Kong X, Gong S, Su L, et al (2017) Survivin overexpression is potentially associated with pituitary adenoma invasiveness. *Oncotarget* 8:105637–105647. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22354>
300. Giammattei L, Mantovani G, Carrabba G, et al (2016) Pituitary apoplexy: considerations on a single center experience and review of the literature. *J Endocrinol Invest* 39:739–746. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0424-2>
301. Lill CM, Hoch H, Dieste F-J, et al (2009) Bilateral stroke following pituitary apoplexy. *J Clin Neurosci* 16:1670–1673. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2009.03.011>
302. Semple PL, Jane JA, Laws ER (2007) CLINICAL RELEVANCE OF PRECIPITATING FACTORS IN PITUITARY APOPLEXY. *Neurosurgery* 61:956–962. <https://doi.org/10.1227/01.neu.0000303191.57178.2a>
303. Vargas G, Gonzalez B, Guinto G, et al (2014) Pituitary Apoplexy in Nonfunctioning Pituitary Macroadenomas: A Case-Control Study. *Endocr Pract* 20:1274–1280. <https://doi.org/10.4158/EP14120.OR>

henriettbutz_199_24

304. Benetatos L, Voulgaris E, Vartholomatos G (2012) DLK1-MEG3 imprinted domain microRNAs in cancer biology. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 22:1–15.
<https://doi.org/10.1615/critreveukargeneexpr.v22.i1.10>
305. Benetatos L, Vartholomatos G, Hatzimichael E (2011) MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *Int J Cancer* 129:773–779. <https://doi.org/10.1002/ijc.26052>
306. Gardiner E, Beveridge NJ, Wu JQ, et al (2012) Imprinted DLK1-DIO3 region of 14q32 defines a schizophrenia-associated miRNA signature in peripheral blood mononuclear cells. *Mol Psychiatry* 17:827–840. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.78>
307. Liu L, Luo G-Z, Yang W, et al (2010) Activation of the Imprinted Dlk1-Dio3 Region Correlates with Pluripotency Levels of Mouse Stem Cells. *J Biol Chem* 285:19483–19490.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.131995>

IX. Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönettel tartozom néhai Rác Károly professzor úrnak, aki PhD témavezetőm volt, és a PhD munkám után az általa vezetett Molekuláris Medicina Kutatócsoportban helyet adott. Ő volt az, aki meggyőzött, hogy a kutatás érdekében ne adjam fel orvosi hivatásom, amiért azóta is hálával tartozom neki, hiszen a PhD-t követő kétéves kutatómunkámat kivéve, folyamatosan orvosként, rezidensként, szakorvosként dolgozhatom.

Nagy hálával tartozom Patócs Attila professzor úrnak, akivel Amerikából hazatértét követően azóta is együtt dolgozom. Attila Rác tanár úr halálát követően főnököm az általa vezetett Kutatócsoportban, a Labormedicina Intézetben, és magával hívott később az Országos Onkológia Intézetbe is, ami megtiszteltetés számomra. Nemcsak szakmai, hanem baráti támogatását élvezhetem, köszönöm.

A dolgozatomban szereplő eredmények túlnyomó többsége a Semmelweis Egyetem volt II. sz. Belgyógyászati Klinikán, majd a Laboratóriumi Medicina Intézetben helyet kapó, Patócs Attila által vezetett Lendület, majd Örökletes Daganatok Kutatócsoportban végzett kutatási munka eredménye. Ezért köszönettel tartozom a volt II. sz. Belgyógyászati Klinika igazgatóinak (Dr. Rác Károly, Dr. Tóth Miklós és Dr. Igaz Péter professzoroknak), hogy támogatták intézetükben folytatott kutatómunkám. Külön köszönet illeti Dr. Szücs Nikolett docens asszonyt a vérminták gyűjtésében nyújtott segítségéért és a barátságáért. Köszönöm Vásárhelyi Barna professzor úrnak, hogy befogadott intézetébe, és a napi rutin munka mellett a mai napig támogató környezetet teremtet a kutatási projektek megvalósításához.

Külön köszönettel tartozom Czirják Sándor idegsebész professzor úrnak, akinek segítségével nem valósulhatott volna meg a hipofízis neuroendokrin tumorszöveteken végzett kutatásaim.

Hálás vagyok Korbonits Márta akadémikus asszonynak a példamutatásáért és szakmai, baráti támogatásáért, mely folyamatosan inspirál a hipofízis tumorok vizsgálatában.

Szeretném köszönetem kifejezni Karlinger Kinga tanárnőnek és Martos János főorvos úrnak, akik elindítottak a tudományos pályán. Köszönöm Gláz Edit professzorasszony és Oláh Edit akadémikus asszony folyamatos szeretetét és támogatását, életútjuk példa számomra.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársainak (Kovalszky Ilonának, Baghy Kornéliának, Reiniger Lillának, Rajnai Hajnalkának, Karászi Katalinnak, Barna Gábornak, Paku Sándornak) a hipofízis neuroendokrin tumorok vizsgálataiban nyújtott együttműködésükért. Köszönöm Dr. Buzás Edit professzor asszonynak és Dr. Pállinger Éva docens asszonynak az extracelluláris vezikulák karakterizálásában nyújtott segítséget.

Köszönöm Patócs Attila által vezetett kutatócsoport tagjainak és a Genetikai és Endokrinológiai Laboratórium minden munkatársának a közös munkát. Külön köszönettel tartozom Nyíró Gábornak, Mészáros Katalinnak, Benkő Mariannak, Kocsis Evelinnek, Kovács Annának és Kovács Ágnesnek a sok-sok segítségért a mindennapokban.

henriettbutz_199_24

Köszönöm, hogy együtt dolgozhattam Darvasi Ottó, Likó István és Szabó Péter bioinformatikusokkal, akiktől rengeteget tanulhattam.

Köszönettel tartozom George Yousef professzornak, aki külföldön töltött kutatási évek alatt folyamatosan támogatott, ösztönzött, hálás vagyok mindazért, amit a nála töltött idő alatt az általa vezetett laborban és a munkatársaitól tanulhattam.

Rendkívül hálás vagyok a korábbi és jelenlegi TDK- és PhD-hallgatóimnak, kiemelten Fülöpné Németh Kinga, Ág-Szabó Borbála, Krokker Lilla és Saskői Évi posztdoktor munkájáért, akik a dolgozatomban szereplő eredmények jó részében oroszlanrészt vállaltak.

A dolgozatban bemutatott kutató munka utolsó eredményeit, valamint az örökletes daganatszindrómával rendelkező betegek genetikai vizsgálatait és az ehhez kapcsolódó kutatásokat az Országos Onkológiai Intézet Molekuláris Genetika Osztályán végeztem és most is végzem, amiért szeretném kifejezni köszönetemet Polgár Csaba főigazgató főorvos úrnak, hogy mindezt támogatja. Szintén köszönöm a Molekuláris Genetika Osztály munkatársai számára, hogy 2019 január 1. óta együtt dolgozhatunk és kutathatunk. Szintén köszönöm Nagy Péter professzor úrnak a tudományos munkában nyújtott támogatását.

A kutatásaimhoz felhasznált anyagi támogatásért köszönettel tartozom a Magyar Tudományos Akadémiának, az Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak, az Innovációs és Technológiai Minisztériumnak és a Semmelweis Egyetemnek az általuk nyújtott pályázati forrásokért.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, hogy a munka és kutatás folyamán a mai napig kitartottak mellettem és szeretnek.

X. Saját közlemények és tudománymetriai adatok

X.1. Az értekezés alapját képező, a PhD fokozat elnyerése után született közlemények

X.1.1. Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

1. **Butz, Henriett.** Circulating Noncoding RNAs in Pituitary Neuroendocrine Tumors-Two Sides of the Same Coin. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 23 : 9 Paper: 5122 , 30 p. (2022) **D1; IF: 5,6**
2. Szabó, Borbála ; Németh, Kinga ; Mészáros, Katalin ; Krokker, Lilla ; Likó, István ; Saskói, Éva ; Németh, Krisztina ; Szabó, Pál Tamás ; Szücs, Nikolette ; Czirják, Sándor, Szalóki, Gábor , Patócs, Attila ; **Butz, Henriett.** Aspirin mediates its antitumoral effect through inhibiting PTTG1 in pituitary adenoma. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 107 : 11 pp. 3066-3079. , 14 p. (2022) **D1; IF: 6,134**
3. **Butz, Henriett** ; Mészáros, Katalin* ; Likó, István ; Patócs, Attila. Wnt-Signaling Regulated by Glucocorticoid-Induced miRNAs. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 22 : 21 Paper: 11778 , 18 p. (2021) **D1; IF: 6,208**
4. Krokker, Lilla ; Patócs, Attila ; **Butz, Henriett.** Essential Role of the 14q32 Encoded miRNAs in Endocrine Tumors. GENES 12 : 5 Paper: 698 , 24 p. (2021) **Q2, IF: 4,141**
5. Németh, Krisztina ; Mészáros, Katalin ; Szabó, Borbála ; **Butz, Henriett** ; Arányi, Tamás ; Szabó, Pál T. A relative quantitation method for measuring DNA methylation and hydroxymethylation using guanine as an internal standard. ANALYTICAL METHODS: ADVANCING METHODS AND APPLICATIONS 13 : 39 pp. 4614-4622. , 9 p. (2021) **Q1, IF: 3,532**
6. Kövesdi, Annamária ; Kurucz, Petra Anna ; Nyíró, Gábor ; Darvasi, Ottó ; Patócs, Attila ; **Butz, Henriett.** Circulating miRNA increases the diagnostic accuracy of chromogranin A in metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. CANCERS 12 : 9 Paper: 2488 , 20 p. (2020) **Q1, IF: 6,639**
7. Szabó, Borbála ; Németh, Kinga* ; Mészáros, Katalin ; Szücs, Nikolette ; Czirják, Sándor ; Reiniger, Lilla ; Rajnai, Hajnalka ; Krencz, Ildikó ; Karászi, Katalin ; Krokker, Lilla ; Patócs, Attila ; **Butz, Henriett.** Demethylation status of somatic DNA extracted from pituitary neuroendocrine tumors indicates proliferative behavior. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 105 : 6 pp. 2015-2026. , 12 p. (2020) **D1, IF: 5,958**
8. **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila. MicroRNAs in endocrine tumors. ELECTRONIC JOURNAL OF THE INTERNATIONAL FEDERATION OF CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 30 : 2 pp. 146-164. , 19 p. (2019)
9. Darvasi, Ottó ; Szabó, Péter ; Németh, Kinga ; Szabó, K ; Spisak, Sándor ; Likó, István ; Czirják, Sándor ; Rácz, Károly ; Igaz, Péter ; Patócs, Attila, **Butz, Henriett.** Limitations of high throughput methods for miRNA expression profiles in non-functioning pituitary adenomas. PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 25 : 1 pp. 169-182. , 14 p. (2019) **Q2, IF: 2,826**
10. Krokker, Lilla ; Nyíró, Gábor ; Reiniger, Lilla ; Darvasi, Ottó ; Szücs, Nikolette ; Czirják, Sándor ; Tóth, Miklós ; Igaz, Péter ; Patócs, Attila ; **Butz, Henriett.** Differentially Expressed miRNAs Influence Metabolic Processes in Pituitary Oncocytoma. NEUROCHEMICAL RESEARCH 44 : 10 pp. 2360-2371. , 12 p. (2019) **Q1, IF: 3,038**
11. Németh, Kinga ; Darvasi, Ottó ; Likó, István ; Szücs, Nikolette ; Czirják, Sándor ; Reiniger, Lilla ; Szabó, Borbála ; Krokker, Lilla ; Pállinger, Éva ; Igaz, Péter ; Patócs, Attila ; **Butz, Henriett.** Comprehensive analysis of circulating miRNAs in the plasma of patients with pituitary adenomas. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 104 : 9 pp. 4151-4168. , 18 p. (2019) **D1, IF: 5,399**
12. Németh, Kinga ; Darvasi, Ottó ; Likó, István ; Szücs, Nikolette ; Czirják, Sándor ; Reiniger, Lilla ; Szabó, Borbála ; Kurucz, Petra A. ; Krokker, Lilla ; Igaz, Péter ; Patócs, Attila ; **Butz, Henriett.** Next-generation sequencing identifies novel mitochondrial variants in pituitary adenomas. JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 42 : 8 pp. 931-940. , 10 p. (2019) **Q2, IF: 3,397**

henriettbutz_199_24

13. **Butz, Henriett** ; Ding, Qiang ; Nofech-Mozes, Roy ; Lichner, Zsuzsanna ; Ni, Heyu ; Yousef, George M. Elucidating mechanisms of sunitinib resistance in renal cancer: an integrated pathological-molecular analysis. *ONCOTARGET* 9 : 4 pp. 4661-4674. , 14 p. (2018).
14. Németh, Kinga ; Szücs, Nikolette ; Czirják, Sándor ; Reiniger, Lilla ; Szabó, Borbála ; Barna, Gábor ; Karászi, Katalin ; Igaz, Péter ; Zivkovic, Vladimir ; Korbonits, Márta ; Patócs, Attila ; **Butz, Henriett**. Survivin as a potential therapeutic target of acetylsalicylic acid in pituitary adenomas. *ONCOTARGET* 9 : 49 pp. 29180-29192. , 13 p. (2018) **Q1**
15. **Butz, Henriett** ; Németh, Kinga ; Czenke, Dóra ; Likó, István ; Czirják, Sándor ; Zivkovic, Vladimir ; Baghy, Kornélia ; Korbonits, Márta ; Kovalszky, Ilona ; Igaz, Péter ; Rácz, Károly ; Patócs, Attila. Systematic Investigation of Expression of G2/M Transition Genes Reveals CDC25 Alteration in Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 23 : 3 pp. 633-641. , 9 p. (2017) **Q2, IF: 1,935**
16. **Butz, Henriett** ; Németh, Kinga ; Rácz, Károly ; Patócs, Attila. Circulating miRNAs as biomarkers for endocrine disorders. *JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION* 39 : 1 pp. 1-10. , 10 p. (2016) **Q2, IF: 2,633**
17. **Butz, Henriett** ; Nofech-Mozes, Roy ; Ding, Qiang ; Khella, Heba WZ ; Szabó, Peter M ; Jewett, Michael ; Finelli, Antonio ; Lee, Jason ; Ordon, Michael ; Stewart, Robert et al. Exosomal MicroRNAs Are Diagnostic Biomarkers and Can Mediate Cell-Cell Communication in Renal Cell Carcinoma. *EUROPEAN UROLOGY FOCUS* 2 : 2 pp. 210-218. , 9 p. (2016) **Q3, IF: 0,42**
18. Kuczynski, Elizabeth A ; Yin, Melissa ; Bar-Zion, Avinoam ; Lee, Christina R ; **Butz, Henriett** ; Man, Shan ; Daley, Frances ; Vermeulen, Peter B ; Yousef, George M ; Foster, Stuart et al. Co-option of Liver Vessels and Not Sprouting Angiogenesis Drives Acquired Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *JNCI- JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE* 108 : 8 Paper: djw030 , 13 p. (2016) **D1, IF: 12,589**
19. **Butz, Henriett** ; Szabó, Péter M ; Khella, Heba W ; Nofech-Mozes, Roy ; Patócs, Attila ; Yousef, George M. miRNA-target network reveals miR-124as a key miRNA contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behaviour by targeting CAV1 and FLOT1. *ONCOTARGET* 6 : 14 pp. 12543-12557. , 15 p. (2015) **Q1, IF: 5,008**
20. **Butz, Henriett** ; Szabo, Péter M ; Nofech-Mozes, Roy ; Rotondo, Fabio ; Kovacs, Kálmán ; Mirham, Lorna ; Girgis, Hala ; Boles, Dina ; Patócs, Attila ; Yousef, George M. Integrative Bioinformatics Analysis Reveals New Prognostic Biomarkers of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *CLINICAL CHEMISTRY* 60 : 10 pp. 1314-1326. , 13 p. (2014). **D1, IF: 7,911**
21. **Butz, Henriett** ; Di Ieva, Antonio ; Niamah, Marzia ; Rotondo, Fabio ; De Rosa, Salvatore ; Sav, Aydin ; Yousef, George ; Kovacs, Kalman ; Cusimano, Michael D. MicroRNAs as biomarkers in pituitary tumors. *NEUROSURGERY* 75 : 2 pp. 181-189. , 9 p. (2014) **D1, IF: 3,62**
22. **Butz, Henriett*** ; Szabó, Péter M* ; Igaz, Péter ; Rácz, Károly ; Hunyady, László ; Patócs, Attila. Minireview: MIRomics in Endocrinology: A Novel Approach for Modeling Endocrine Diseases.: miRomics in endocrinology: a novel approach for modeling endocrine diseases. *MOLECULAR ENDOCRINOLOGY* 27 : 4 pp. 573-585. , 13 p. (2013) **D1, IF: 4,201**
23. **Butz, Henriett** ; Rácz, Károly ; Hunyady, László ; Patócs, Attila. Crosstalk between TGF- β signaling and the microRNA machinery. *TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES* 33 : 7 pp. 382-393. , 12 p. (2012) **D1, IF: 9,25**
- X.1.2. Lektorált magyar nyelvű közlemények*
24. Németh, Kinga ; Darvasi, Ottó ; Szücs, Nikolette ; Czirják, Sándor ; **Butz, Henriett**. A mikro-RNS-ek szerepe az agyalapimirigy-daganatok tumorbiológiájában. *ORVOSI HETILAP* 159 : 7 pp. 252-259. , 8 p. (2018) **Q3, IF: 0,53**
25. Patócs, Attila ; Vásárhelyi, Barna ; **Butz, Henriett**. MikroRNS-ek a laboratóriumi diagnosztikában. *ORVOSTOVÁBBKÉPZŐ SZEMLE* 19 : 9 pp. 17-24. , 8 p. (2012)
- X.1.3. Könyvfejezetek*

26. **Butz, Henriett** ; Patocs, Attila. Technical Aspects Related to the Analysis of Circulating microRNAs. In: Igaz, Péter (szerk.) Circulating microRNAs in Disease Diagnostics and their Potential Biological Relevance. Basel, Svájc : Springer-Verlag (2015) 288 p. pp. 55-71. , 17 p.
27. **Butz, Henriett** ; Patocs, Attila. Pituitary Tumorigenesis: Role of Regulation of Wee1 Kinase by microRNAs. In: Hayat, MA (szerk.) Tumors of the Central Nervous System, Volume 10: Pineal, Pituitary, and Spinal Tumors. Dordrecht, Hollandia : Springer-Verlag (2013) pp. 141-150. , 10 p.
28. **Henriett, Butz** ; Károly, Rác ; Attila, Patócs. Epigenetic and Posttranscriptional Alterations of Tumor Suppressor Genes in Sporadic Pituitary Adenomas. In: Yue, Cheng (szerk.) TUMOR SUPPRESSOR GENES. Rijeka, Horvátország : InTech Open Access Publisher (2012) 331 p. pp. 221-246. , 26 p.

X.2 Egyéb, a PhD fokozat elnyerése után született közlemények

X.2.1. Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

1. Bozsik, Anikó ; **Butz, Henriett** ; Grolmusz, Vince Kornél ; Polgár, Csaba ; Patócs, Attila ; Papp, János. Genome sequencing-based discovery of a novel deep intronic APC pathogenic variant causing exonization. EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS 31 : 7 pp. 841-845. , 5 p. (2023) **Q1, IF: 5,2**^{*2022}
2. **Butz, Henriett** ; Bozsik, Anikó* ; Grolmusz, Vince ; Szócs, Erika ; Papp, János ; Patócs, Attila. Challenging interpretation of germline TP53 variants based on the experience of a national comprehensive cancer centre. SCIENTIFIC REPORTS 13 : 1 Paper: 14259 , 11 p. (2023) **D1, IF: 4,6**^{*2022}
3. **Butz, Henriett** ; Nagy, Petra ; Papp, János ; Bozsik, Anikó ; Grolmusz, Vince Kornél ; Pócza, Tímea ; Oláh, Edit ; Patócs, Attila. PALB2 Variants Extend the Mutational Profile of Hungarian Patients with Breast and Ovarian Cancer. CANCERS 15 : 17 Paper: 4350 , 15 p. (2023) **Q1, Q2, IF: 5,2**^{*2022}
4. **Butz, Henriett** ; Saskői, Éva ; Krokker, Lilla ; Viktória, Vereczki ; Alpár, Alán ; Likó, István ; Tóth, Erika ; Szócs, Erika ; Cserepes, Mihály ; Nagy, Katalin et al. Context-Dependent Role of Glucocorticoid Receptor Alpha and Beta in Breast Cancer Cell Behaviour. CELLS 12 : 5 Paper: 784 , 25 p. (2023) **Q1, IF: 6**^{*2022}
5. Grolmusz, Vince Kornél ; Nagy, Petra ; Likó, István ; **Butz, Henriett** ; Pócza, Tímea ; Bozsik, Anikó ; Papp, János ; Oláh, Edit ; Patócs, Attila. A common genetic variation in GZMB may associate with cancer risk in patients with Lynch syndrome. FRONTIERS IN ONCOLOGY 13 Paper: 1005066 , 9 p. (2023) **Q2, IF: 4,7**^{*2022}
6. Madar, László ; Majoros, Viktória ; Szűcs, Zsuzsanna ; Nagy, Orsolya ; Babicz, Tamás ; **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila ; Balogh, István ; Koczok, Katalin. Double Heterozygosity for Rare Deleterious Variants in the BRCA1 and BRCA2 Genes in a Hungarian Patient with Breast Cancer. INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES 24 : 20 Paper: 15334 , 7 p. (2023) **D1, Q1 IF: 5,6**^{*2022}
7. Pála, Sára ; Tőke, Judit* ; Bozsik, Anikó* ; **Butz, Henriett** ; Papp, János ; Likó, István ; Kuroli, Enikő ; Bánvölgyi, András ; Hamar, Mátyás ; Bertherat, Jerome et al. Whole genome sequencing resolves 10 years diagnostic odyssey in familial myxoma. SCIENTIFIC REPORTS 13 : 1 Paper: 14658 , 10 p. (2023) **D1, IF: 4,6**^{*2022}
8. Bozsik, Anikó ; Papp, János ; Grolmusz, Vince Kornél ; Patócs, Attila ; Oláh, Edit ; **Butz, Henriett**. Reclassification of Five BRCA1/2 Variants with Unknown Significance Using Complex Functional Study. CANCER RESEARCH AND TREATMENT 54 : 4 pp. 970-984. , 15 p. (2022) **Q1, IF: 4,6**
9. **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila. Mechanisms behind context-dependent role of glucocorticoids in breast cancer progression. CANCER AND METASTASIS REVIEWS 41 : 4 pp. 803-832. , 30 p. (2022) **Q1, IF: 9,2**
10. **Butz, Henriett** ; Lövey, József* ; Szentkereszty, Márton ; Bozsik, Anikó ; Tóth, Erika ; Patócs, Attila. Case Report: A Novel Pathomechanism in PEComa by the Loss of Heterozygosity of TP53. FRONTIERS IN ONCOLOGY 12 Paper: 849004 , 9 p. (2022) **Q2, IF: 4,7**
11. Igaz, Peter ; Toth, Geza ; Nagy, Peter ; Dezső, Katalin ; Turai, Peter Istvan ; Medvecz, Marta ; Wikonkal, Norbert ; Huszty, Gergely ; Piros, László ; Toth, Erika ; Bozsik, Aniko ; István, Likó ; Patócs, Attila ; **Butz, Henriett**. Surprising genetic and pathological findings in a patient with giant bilateral periaxonal tumours: PEComas and mutations of PTCH1 in Gorlin-Goltz syndrome. JOURNAL OF MEDICAL GENETICS 59 pp. 916-919. , 4 p. (2022) **Q1, IF: 4**

12. Mátyási, Barbara ; Petővári, Gábor ; Dankó, Titanilla ; **Butz, Henriett** ; Likó, István ; Löw, Péter ; Petit, Isabelle ; Bittar, Randa ; Bonnefont-Rousselot, Dominique ; Farkas, Zsolt et al. Extracellular Vesicle-Mediated Metastasis Suppressors NME1 and NME2 Modify Lipid Metabolism in Fibroblasts. *CANCERS* 14 : 16 Paper: 3913 , 19 p. (2022) **Q1, IF: 5,2**
13. Sarkadi, Balázs. ; Saskői, Éva ; **Butz, Henriett** ; Patocs, Attila. Genetics of Pheochromocytomas and Paragangliomas Determine the Therapeutical Approach. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 23 : 3 Paper: 1450 , 17 p. (2022) **D1, Q1, IF: 5,6**
14. **Butz, Henriett** ; Papp, János* ; Bozsik, Anikó ; Krokker, Lilla ; Pócza, Tímea ; Oláh, Edit. ; Patócs, Attila. Application of multilayer evidence for annotation of c-terminal BRCA2 variants. *CANCERS* 13 : 4 Paper: 881 , 21 p. (2021) **Q1, IF: 6,575**
15. **Butz, Henriett** ; Blair, Jo ; Patócs, Attila. Molecular genetic testing strategies used in diagnostic flow for hereditary endocrine tumour syndromes. *ENDOCRINE* 71 pp. 641-652. , 12 p. (2021) **Q2, IF: 3,925**
16. **Butz, Henriett** ; Nyíró, Gábor ; Kurucz, Petra Anna ; Likó, István ; Patócs, Attila. Molecular genetic diagnostics of hypogonadotropic hypogonadism: from panel design towards result interpretation in clinical practice. *HUMAN GENETICS* 140 : 1 pp. 113-134. , 22 p. (2021) **Q1, IF: 5,881**
17. Krokker, Lilla ; Szabó, Borbála* ; Németh, Kinga ; Tóháti, Rebeka ; Sarkadi, Balázs ; Mészáros, Katalin ; Patócs, Attila ; **Butz, Henriett**. Three Dimensional Cell Culturing for Modeling Adrenal and Pituitary Tumors. *PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH* 27 Paper: 640676 , 10 p. (2021) **Q2, IF: 2,874**
18. Pócza, Tímea ; Grolmusz, Vince Kornél ; Papp, János ; **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila ; Bozsik, Anikó. Germline Structural Variations in Cancer Predisposition Genes. *FRONTIERS IN GENETICS* 12 Paper: 634217 , 14 p. (2021) **Q2, IF: 4,772**
19. Sarkadi, Balázs ; Likó, István. ; Nyíró, Gábor ; Igaz, Péter ; **Butz, Henriett** ; Patocs, Attila. Analytical performance of ngs-based molecular genetic tests used in the diagnostic workflow of pheochromocytoma/paraganglioma. *CANCERS* 13 : 16 Paper: 4219 , 22 p. (2021) **Q1, IF: 6,575**
20. Turai, Péter István ; Nyíró, Gábor ; **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila ; Igaz, Peter. MicroRNAs, Long Non-Coding RNAs, and Circular RNAs: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Pheochromocytoma/Paraganglioma. *CANCERS* 13 : 7 Paper: 1522 , 16 p. (2021) **Q1, IF: 6,575**
21. Bozsik, Anikó ; Pócza, Tímea* ; Papp, János ; Vaszkó, Tibor ; **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila ; Oláh, Edit. Complex Characterization of Germline Large Genomic Rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 Genes in High-Risk Breast Cancer Patients—Novel Variants from a Large National Center. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES* 21 : 13 Paper: 4650 , 17 p. (2020) **D1, Q1, IF: 5,924**
22. Sarkadi, Balázs ; Mészáros, Katalin ; Krencz, Ildikó ; Canu, Letizia ; Krokker, Lilla ; Zakariás, Sára ; Barna, Gábor ; Sebestyén, Anna ; Pápay, Judit ; Hujber, Zoltán ; **Butz, Henriett** ; Darvasi, Ottó ; Igaz, Péter ; Doczi Judit ; Luconi, Michaela ; Chinopoulos, Chrostos ; Patócs, Attila. Glutaminases as a Novel Target for SDHB-Associated Pheochromocytomas/Paragangliomas. *CANCERS* 12 : 3 Paper: 599 , 25 p. (2020) **Q1, IF: 6,639**
23. Bertalan, Rita ; Bencsik, Zsuzsa ; Mezei, Piroksa ; Vajda, Zsolt ; **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila. Novel frameshift mutation of the NR0B1(DAX1) in two tall adult brothers. *MOLECULAR BIOLOGY REPORTS* 46 : 4 pp. 4599-4604. , 6 p. (2019) **Q2, IF: 1,402**
24. Kövesdi, Annamária ; Tóth, Miklós ; **Butz, Henriett** ; Szűcs, Nikolette ; Sárman, Beatrix ; Pusztai, Péter ; Tőke, Judit ; Reismann, Péter ; Fáklya, Mónika ; Tóth, Géza et al. True MEN1 or phenocopy? Evidence for geno-phenotypic correlations in MEN1 syndrome. *ENDOCRINE* 65 : 2 pp. 451-459. , 9 p. (2019) **Q2, IF: 3,235**
25. Lichner, Zsuzsanna ; Saleeb, Rola ; **Butz, Henriett** ; Ding, Qiang ; Nofech-Mozes, Roy ; Riad, Sara ; Farag, Mina ; Varkouhi, Amir K. ; dos Santos, Claudia C. ; Kapus, András et al. Sunitinib induces early histomolecular changes in a subset of renal cancer cells that contribute to resistance. *FASEB JOURNAL* 33 : 1 pp. 1347-1359. , 13 p. (2019) **D1, Q1 IF: 4,966**
26. Rzepiel, Andrea ; Kutszegi, Nóra ; Gézsi, András ; Sági, Judit C ; Egyed, Bálint ; Péter, György ; **Butz, Henriett** ; Nyíró, Gábor ; Müller, Judit ; Kovács, Gábor T et al. Circulating microRNAs as minimal residual disease biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JOURNAL OF TRANSLATIONAL MEDICINE* 17 : 1 Paper: 372 , 16 p. (2019) **D1, Q1, IF: 4,124**

27. **Henriett, Butz** ; Attila, Patócs. The role of next generation sequencing in current laboratory diagnostics. CANADIAN JOURNAL OF PATHOLOGY 10 : 2 pp. 9-14. , 6 p. (2018) -
28. Kutszegi, Nóra ; Rzepiel, Andrea ; Gézsi, András ; Papp, Mónika ; Egyed, Bálint ; **Butz, Henriett** ; C. Csányi, Judit ; F. Semsei, Ágnes ; T. Kovács, Gábor ; Péter, György et al. Monitoring the potential role of circulating miR-181b-5p in minimal residual disease in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. JOURNAL OF EXTRACELLULAR VESICLES 7 : sup1 pp. 241-241. Paper: PS08.10 , 1 p. (2018) -
29. Solarski, Michael ; Rotondo, Fabio ; Foulkes, William ; Priest, John ; Syro, Luis V ; **Butz, Henriett** ; Cusimano, Michael ; Kovács, Kálmán. DICER1 gene mutations in endocrine tumors. ENDOCRINE-RELATED CANCER 25 : 3 pp. R197-R208. , 12 p. (2018) **Q1, D1 IF: 4,774**
30. Perge, Pál ; **Butz, Henriett** ; Pezzani, Raffaele ; Bancos, Irina ; Nagy, Zoltán ; Pálóczi, Krisztina ; Nyirő, Gábor ; Decmann, Ábel ; Pap, Erna ; Luconi, Michaela et al. Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. SCIENTIFIC REPORTS 7 : 1 Paper: 5474 , 10 p. (2017). **D1, IF: 4,122**
31. Fabio, Rotondo ; **Henriett, Butz** ; Luis, V Syro ; George, M Yousef ; Antonio, Di Ieva ; Lina, M Restrepo ; Andres, Quintanar-Stephano ; Istvan, Berczi ; Kalman, Kovacs. Arginine vasopressin (AVP): a review of its historical perspectives, current research and multifunctional role in the hypothalamo-hypophyseal system: a review of its historical perspectives, current research and multifunctional role in the hypothalamo-hypophyseal system. PITUITARY 19 : 4 pp. 345-355. , 11 p. (2016) **Q2, IF: 2,481**
32. Lichner, Zsuzsanna ; **Butz, Henriett** ; Nofech-Mozes, Roy ; Riad, Sara ; Kapus, Andras ; Yousef, George M. Sunitinib Treatment Induces the Formation of Stem Cell-Like Cancer Cells in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. MODERN PATHOLOGY 29 pp. 246A-246A. , 1 p. (2016) -
33. Nagy, Zsolt ; Marta, Alexa ; Butz, Henriett ; Likó, István ; Rácz, Károly ; Patócs, Attila. Modulation of the circadian clock by glucocorticoid receptor isoforms in the H295R cell line. STEROIDS 116 pp. 20-27. , 8 p. (2016) **Q1, IF: 2,282**
34. Nagy, Zsolt ; Ács, Bence ; **Butz, Henriett** ; Feldman, Karolina ; Márta, Alexa ; Szabó, Péter M ; Baghy, Kornália ; Pázmány, Tamás ; Rácz, Károly ; Likó, I et al. Overexpression of GRs in colonic mucosal cell line partly reflects altered gene expression in colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. JOURNAL OF STEROID BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 155 : Pt A pp. 76-84. , 9 p. (2016) **D1, IF: 4,561**
35. Patócs, Attila ; Lendvai, Nikolett ; **Butz, Henriett** ; Likó, István ; Sági, Zoltán ; Szűcs, Nikolette ; Tóth, Géza ; Grolmusz, Vince ; Igaz, Péter ; Tóth, Miklós et al. Novel SDHB and TMEM127 Mutations in Patients with Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndrome. PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 22 : 4 pp. 673-679. , 7 p. (2016) **Q2, IF: 1,736**
36. Igaz, Iván ; Nyirő, Gábor ; Nagy, Zoltán ; **Butz, Henriett** ; Nagy, Zsolt ; Perge, Pál ; Sahin, Péter ; Tóth, Miklós ; Rácz, Károly ; Igaz, Péter et al. Analysis of Circulating MicroRNAs In Vivo following Administration of Dexamethasone and Adrenocorticotropin. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 2015 Paper: 589230 , 6 p. (2015) **Q2, IF: 2,376**
37. Khella, Heba W ; **Butz, Henriett** ; Ding, Qiang ; Rotondo, Fabio ; Evans, Kenneth R ; Kupchak, Peter ; Dharsee, Moyez ; Latif, Ashraf ; Pasic, Maria D ; Lianidou, Evi et al. miR-221/222 Are Involved in Response to Sunitinib Treatment in Metastatic Renal Cell Carcinoma. MOLECULAR THERAPY 23 : 11 pp. 1748-1758. , 11 p. (2015) **D1, IF: 6,938**
38. Nagy, Zoltán ; Baghy, Kornália ; Hunyadi-Gulyás, Éva ; Micsik, Tamás ; Nyirő, Gábor ; Rácz, Gergely ; **Butz, Henriett** ; Perge, Pál ; Kovalszky, Ilona ; Medzihradsky, Katalin F et al. Evaluation of 9-cis retinoic acid and mitotane as antitumoral agents in an adrenocortical xenograft model. AMERICAN JOURNAL OF CANCER RESEARCH 5 : 12 pp. 3645-3658. , 14 p. (2015) **Q3, IF: 3,425**
39. Weckman, Andrea ; Rotondo, Fabio ; Di Ieva, Antonio ; Syro, Luis V ; **Butz, Henriett** ; Cusimano, MD ; Kovacs, Kálmán. Autophagy in endocrine tumors. ENDOCRINE-RELATED CANCER 22 : 4 pp. R205-R218. , 14 p. (2015) **D1, Q1 IF: 4,472**

40. Bekő, Gabriella ; Butz, Henriett ; Berta, Klára ; Tislér, András ; Olajos, Ferenc ; Vászárhelyi, Barna ; Patócs, Attila. Switching between parathormone (PTH) assays: the impact on the diagnosis of renal osteodystrophy: the impact on the diagnosis of renal osteodystrophy. CLINICAL CHEMISTRY AND LABORATORY MEDICINE 51 : 6 pp. 1251-1256. , 6 p. (2013) **Q1, IF: 2,955**

41. Feldman, Karolina ; Szappanos, Ágnes ; **Butz, Henriett** ; Grolmusz, Vince ; Majnik, Judit ; Likó, István ; Kriszt, B ; Lakatos, Péter ; Tóth, Miklós ; Rácz, Károly et al. The rs4844880 polymorphism in the promoter region of the HSD11B1 gene associates with bone mineral density in healthy and postmenopausal osteoporotic women. STEROIDS 77 : 13 pp. 1345-1351. , 7 p. (2012) **Q2, IF: 2,803**

42. Halászlaki, Csaba ; Takács, István ; **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila ; Lakatos, Péter. Novel genetic mutation in the background of Carney complex. PATHOLOGY AND ONCOLOGY RESEARCH 18 : 2 pp. 149-152. , 4 p. (2012) **Q2, IF: 1,555**

43. Trivellin, Giampaolo ; **Butz, Henriett** ; Delhove, Juliette ; Igreja, Susana ; Chahal, Harvinder S ; Zivkovic, Vladimir ; McKay, Tristan ; Patócs, Attila ; Grossman, Ashely B ; Korbonits, Márta. MicroRNA miR-107 is overexpressed in pituitary adenomas and in vitro inhibits the expression of aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (AIP). AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY: ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 303 : 6 pp. E708-E719. (2012) **D1, Q1, IF: 4,514**

X.2.2. Lektorált magyar nyelvű közlemények

44. Lakatos, Kinga ; Kiss, Anna ; Varga, Zsuzsanna ; **Butz, Henriett**. A malignus betegségekhez társuló tromboembóliás szövődmények. MAGYAR ONKOLÓGIA 67 : 2 pp. 139-145. , 7 p. (2023) **Q4**

45. Sarkadi, Balázs ; Grolmusz, Vince Kornél ; **Butz, Henriett** ; Kövesdi, Annamária ; Likó, István ; Nyirő, Gábor ; Igaz, Péter ; Patócs, Attila. Molekuláris genetikai vizsgálatok az örökletes endokrinológiai tumor szindrómák klinikai diagnosztikájában. ORVOSI HETILAP 159 : 7 pp. 285-292. , 8 p. (2018) **Q3, IF: 0,564**

46. Dávid, Anna ; **Butz, Henriett** ; Halász, Zita ; Török, Dóra ; Nyirő, Gábor ; Muzsnai, Ágota ; Csákváry, Violetta ; Luczay, Andrea ; Sallai, Ágnes ; Hosszú, Éva et al. A SHOX géndeletio előfordulása idiopathiás alacsonynövésben: Multicentrikus tanulmány. ORVOSI HETILAP 158 : 34 pp. 1351-1356. , 6 p. (2017) **Q3, IF: 0,322**

47. Decmann, Ábel ; Perge, Pál ; Nagy, Zoltán ; **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila ; Igaz, Péter. Keringő mikroRNS-ek az endokrin daganatok diagnosztikájában [Circulating microRNAs in the diagnostics of endocrine neoplasms]. ORVOSI HETILAP 158 : 13 pp. 483-490. , 8 p. (2017) **Q3, IF: 0,322**

48. Patócs, Attila ; Igaz, Péter ; Tőke, Judit ; Lendvai, Nikolett ; Sarkadi, Balázs ; Grolmusz, Vince ; **Butz, Henriett** ; Tóth, Géza ; Németh, Kinga ; Gláz, Edit et al. Örökletes phaeochromocytomák és paragangliomák molekuláris genetikai vizsgálatával szerzett hazai tapasztalatok. MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 69 : 2-3 pp. 83-92. , 10 p. (2016)

49. Patócs, Attila ; Likó, István ; **Butz, Henriett** ; Baghy, Kornélia ; Rácz, Károly. Új módszertani lehetőségek és ezek alkalmazása a hormonális rendszer daganatainak genetikai kivizsgálásában. ORVOSI HETILAP 156 : 51 pp. 2063-2069. , 7 p. (2015). **Q3, IF: 0,291**

X.2.3. Könyvfejezetek

50. **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila. Genetika és az emésztőrendszer. In: Tulassay, Zsolt (szerk.) Gasztroenterológia. Budapest, Magyarország : Medicina Könyvkiadó (2023) 1,180 p. pp. 79-93. , 15 p.

51. Beke, Artúr ; **Butz, Henriett**. Nőgyógyászati daganatok onkogenetikai háttere. In: Beke, Artúr Nőgyógyászati kórképek genetikai háttere: Genetikai eredetű ritka nőgyógyászati betegségek. Budapest, Magyarország : Akadémiai Kiadó (2022) pp. 151-159. , 9 p.

52. **Butz, Henriett** ; Patócs, Attila. Brief Summary of the Most Important Molecular Genetic Methods (PCR, qPCR, Microarray, Next-Generation Sequencing, etc.). In: Igaz, Peter; Patócs, Attila (szerk.) Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes. Cham, Svájc : Springer-Verlag (2019) 473 p. pp. 33-52. , 20 p.

X.3. A PhD fokozat elnyerése előtt született közlemények

henriettbutz_199_24

X.3.1. Lektorált nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

1. **Butz, Henriett** ; Liko, István ; Czirjak, Sándor ; Igaz, Péter ; Korbonits, Márta ; Racz, Károly ; Patocs, Attila. MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFbeta pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. PITUITARY 14 : 2 pp. 112-124. , 13 p. (2011) **Q2, IF: 1,83**

2. **Butz, Henriett** ; Likó, István ; Czirják, Sándor ; Igaz, Péter ; Khan, Mohammed Munayem ; Zivkovic, Vladimir ; Bálint, Katalin ; Korbonits, Márta ; Rácz, Károly ; Patócs, Attila. Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM 95 : 10 pp. E181-E191. (2010) **D1, IF: 6,495**

3. Boyle, Belema ; **Butz, Henriett** ; Likó, István ; Zalatnai, Attila ; Tóth, Miklós ; Feldman, Karolina ; Horányi, János ; Igaz, Péter ; Rácz, Károly ; Patócs, Attila. Expression of glucocorticoid receptor isoforms in human adrenocortical adenomas. STEROIDS 75 : 10 pp. 695-700. , 6 p. (2010) **Q2, IF: 3,106**

X.3.2. Lektorált magyar nyelvű közlemények

4. **Butz, Henriett** ; Likó, István ; Boyle, Belema ; Lendvai, Nikolett ; Igaz, Péter ; Czirjak, Sándor ; Korbonits, Márta ; Rácz, Károly ; Patócs, Attila. A mikroRNS-kutatás módszerei és alkalmazásuk hypophysisdaganatokban MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 62 : 5 pp. 355-362. , 8 p. (2009)

5. Lendvai, Nikolett ; Szabó, Ildikó ; **Butz, Henriett** ; Bekő, Gabriella ; Horányi, János ; Tarjányi, Mária ; Alföldi, Sándor ; Szabó, István ; Rácz, Károly ; Patócs, Attila. SDHD génmutációhoz társult extraadrenális pheochromocytoma = Extraadrenal pheochromocytoma associated to SDHD gene mutation. ORVOSI HETILAP 150 : 14 pp. 645-649. , 5 p. (2009) **Q3, -**

6. Boyle, Belema ; Patócs, Attila ; Likó, István ; Bertalan, Rita ; Lendvai, Nikolett ; Szappanos, Ágnes ; **Butz, Henriett** ; Rácz, Károly ; Balázs, Csaba. A glukokortikoid-receptor gén polimorfizmusok szerepe autoimmun betegségekben. MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 61 : 3 pp. 171-175. , 5 p. (2008)

X.4. Tudományos adatok (MTMT2, 2024.05.19)

Butz Henriett tudományos és oktatási munkásságának összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztálya (2024.05.08)

Tudományos közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Tudományos folyóiratcikk ²	77			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		44	938	1130
szakcikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk magyar nyelvű		3	6	8
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként ³		0	0	0
összefoglaló közlemény		24	535	573
rövid közlemény		6	12	18
II. Könyvek	0			
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
III. Könyvrészlet	7			
idegen nyelvű		5	25	31
magyar nyelvű		2	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		0	0	0
IV. Konferenciaközlemény ⁴	1		0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)		0	0	0
Tudományos közlemények összesen (I.-IV)		85	1516	1760
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	85		1516	1760
V. További tudományos művek	50			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikkeket és a nem ismert lektoráltságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikkeket is		49	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		1	0	0
Olthalmak (szabadalmak)		0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok ⁵	2		0	3
Összes hivatkozás ¹			1516	1763
Hirsch index ⁶	21			
g index ⁶	41			

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	23	876
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	15	118
A tudományos fokozat (PhD 2011) elnyerése utáni teljes tudományos folyóiratcikkek száma	71	1507
Az utolsó 10 év (2014-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	64	1183
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	197	11,17%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		342
Jelentés, guideline	1	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	0	0

Megjegyzések:

1 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

2 lektorált, tudományos folyóiratban

3 a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

4 konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

5 nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

6 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója

7 közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

henriettbutz_199_24