A kóros hypophysis-működés: klinikai és kísérletes vizsgálatok

Doktori tézisek

Dr. Dénes Judit

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Góth Miklós MTA doktora, egyetemi tanár
Konzulens: Dr. Korbonits Márta MTA doktora, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Patócs Attila Ph.D., egyetemi docens
Dr. Bodor Miklós Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Gerő László MTA doktora, egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Sallai Ágnes Ph.D., főorvos
Dr. Speer Gábor Ph.D., főorvos

Budapest
2015

1. Bevezetés

A hypophysis daganatok az adenohypophysis sejtjeiből kiinduló gyakori intracranialis tumorok. Előfordulási gyakoriságuk 16,7% (egy autopsziás vizsgálat 14,4%-os, míg egy radiológiai felmérés 22,5%-os átlagos előfordulási gyakoriságot talált a vizsgált populációban). Bár e tumorok általában jóindulatúak, a hormon túlprodukció és a daganat térfoglalása miatt a mortalitás növekedésével járnak.

A genetikai és epigenetikai változások, hormonstimuláció, növekedési faktorok és környezeti tényezők mellett a megváltozott mikroRNS (miRNS) expressziónak is szerepet tulajdonítanak a hypophysis adenomák patogenezisében. A miRNS-ek 19-25 bázispár hosszúságú nem kódoló RNS-ek, amelyek a cél-gének poszt-transzkripciós expresszióját szabályozzák.

A miRNS-ek számos alapvető biológiai funkció szabályozásában vesznek részt (mint például sejtproliferáció, apoptózis, sejtadhézió és metabolizmus), a tumorgenezis aktivátoraként –

onkomiR - vagy gátlójaként – tumor szuppresszor miRNS-ek.

A hypophysis adenoma miRNS mintázata alapján következtetni lehet a daganat altípusára, méretére, agresszivitására, terápiás válaszkészségére. Ezen kívül bizonyos miRNS-eknek szerepük van a hypophysis adenomák kialakulásáért felelős gének szabályozásában is.

A phaeochromocytomák és paragangliomák a mellékvesevelő, szimpatikus illetve paraszimpatikus idegrendszer kromaffin termelő sejtjeiből kiinduló daganatok. Bár mind a hypophysis adenomák mint a phaeochromocytomák/paragangliomák (phaeo/PGL) prevalenciája alacsony, előfordulhat együttes kialakulásuk egy beteg esetében vagy családon belül.

2. Célkitűzés

A vizsgálatok célja a hypophysis adenomák kialakulásának hátterében álló genetikai tényezők megismerése.

Vizsgálat I: Azoknál a betegeknél, akiknél aryl hydrocarbon receptor-interacting protein *(AIP)*-mutáció

van jelen, vagy az AIP fehérje szintje alacsony, a szomatotropinomák nagyobbak, invazívak és kevésbé reagálnak szomatosztatin- (SS-) analóg terápiára. Mindezek alapján feltételezhető, hogy az alacsony AIP-szint összefüggésben áll a szomatotropinomák viselkedésével. Célunk az AIP fehérje miRNSek által történt szabályozásának vizsgálata volt sporadikus szomatotropinomák esetében.

Vizsgálat II: A hypophysis adenomák és phaeo/PGL együttes előfordulása nagyon ritka, és nem jellemző egyik klasszikus endokrin neoplasia szindrómára sem. Vizsgálatunkban a phaeo/PGL kialakulásában szerepet játszó génmutációk hypophysis adenomák kialakulásában játszott kóroki szerepét tanulmányoztuk.

3. Módszerek

3.1. Betegek

Vizsgálat I: Harmincnégy szomatotrop adenomát vizsgáltunk. Kizárási kritérium volt a SS-analóggal történt preoperatív kezelés, pozitív családi anamnézis vagy öröklődő hypophysis adenoma gyanú. Öt normális hypophysis szolgált kontrollként.

Vizsgálat II: Harminckilenc beteg klinikai adatait, genomiális DNS-ét és elérhető tumormintáit gyűjtöttük össze, akik phaeo/PGL-ben vagy hypophysis adenomában szenvedtek (sporadikus n=19, vagy családi formában n=20). Huszonhárom FIPA beteg szerepelt kontrollként.

3.2. Genetikai vizsgálatok

Vizsgálat I: az *AIP* kódoló szekvenciájának, konzervált splice helyeinek és a promoter régió 1200 bázispárnyi területének szekvenálása történt szomatotropinomákban. Az AIP mRNS, a kiválasztott miRNS-ek, valamint az endogén AIP mRNS expresszióját (miR-34a felül-és alulexpresszálását követően) valós idejű qPCR technikával mértük szomatotropinomákban, normális hypophysisben vagy HEK293 és GH3 sejtvonalakban.

Vizsgálat II: az *AIP*, multiplex endokrin neoplasia 1-es típus gén (*MEN1),* ciklin-dependens kináz inhibitor 1B gén [*CDKN1B,* kódoló szakasz és speciális nyitott olvasási keret (upstream open reading frame)] vizsgálata történt Sanger szekvenálással és a hosszabb

génszakaszokat érintő deléciót kimutató eljárással [multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA)]. A phaeo/PGL kialakulásában szerepet játszó gének (MYC-asszociált faktor X (*MAX*), ’rearranged during transfection’ tirozin kináz receptor gén (*RET*), szukcinát dehidrogenáz A alegység (*SDHA*), szukcinát dehidrogenáz komplex assembly faktor 2 (*SDHAF2*), szukcinát dehidrogenáz B alegység (*SDHB*), szukcinát dehidrogenáz C alegység (*SDHC*), szukcinát dehidrogenáz D alegység (*SDHD*), transzmembrán protein 127 (*TMEM 127*) és von Hippel–Lindau gén (*VHL*) vizsgálata történt Sanger szekvenálással, újgenerációs szekvenálással és MLPA technikával. Ezen kívül a betegek egy részében szűrtük a fumarát hidratáz (*FH*) gén mutációját. Az elérhető tumormintákon vizsgáltuk a heterozigócia elvesztését a hypophysis adenomában az *SDHB* lókuszon és a phaeochromocytomában a *MEN1* lókuszon.

3.3. Immunhisztokémia

Vizsgálat I: A citoplazmatikus AIP festődés szemikvantitatív meghatározása céljából a mintákat osztályoztuk a mintázat [diffúz (2 pont) vagy elszórt (1 pont)] és az intenzitás [erős (3 pont), közepes (2 pont) és gyenge (1 pont)] szempontjából. A két pontérték összeszorzásával kaptuk meg a végső értéket; alacsony (0, 1 vagy 2 pont) vagy magas (3, 4 vagy 6 pont) AIP expressziót.

Vizsgálat II: GHRH és MEN1 festést végeztünk phaeochromocytoma mintákon, valamint SDHA és SDHB festést hypophysis adneomákon. Bizonyos hypophysis tumorminták anti-mitokondriális és anti-endoplazmatikus retikulum lektin 1 (ERLEC1) festését is elvégeztük.

3.4. Target predikció

Az AIP mRNS-miRNS interakció vizsgálatához a miRNAmap predikciós programban leírt algoritmusokat használtuk. Az mRNS-miRNS kölcsönhatást 3 kritérium alapján értékeltük: (i) a célgén-szakaszt legalább 2 predikciós program jelzi, (ii) a célgén több célgén-szakaszt tartalmaz a miRNS számára és (iii) a célgén-

szakaszok az RNS bizonyos algoritmusok által meghatározott megfelelő szakaszain helyezkednek el. Azokat a miRNS-eket vizsgáltunk tovább qPCR technikával, amelyek mindhárom kritériumnak megfeleltek, vagy legalább 2 kritériumnak megfeleltek és a Pearson korrelációs együtthatójuk minimum -0,30 volt. Ezen kívül az eredmények kiegészítése és a humán, valamint patkány *AIP* gén pontos miRNS kötőhelyeinek maghatározása céljából a következő predikciós programokat használtuk: TargetScan verzió 6.2, MicroCosm, FindTar verzió 3, miRanda and PicTar.

3.5. Sejttenyészet

Vizsgálatainkhoz a patkány GH-és prolaktin termelő hypophysis adenoma sejtvonalat (GH3), a humán embrionális vesesejtvonalat (HEK293) és a humán pancreas adenocarcinoma sejtvonalat (BXPC3) használtuk. A pGL3-*AIP*-3'-UTR vektor segítségével azt vizsgáltuk, hogy a miRNSek hatása a luciferáz aktivitásra (Dual-Luciferáz Assay) az előre jelzett kötőhelyekhez történő kapcsolódásnak tudható-e be a vad típust (WT) illetve mutáns (QuikChangeXL-site-

directed mutagenesis kit használatával) *AIP*-3'-UTR fragmentumot tartalmazó vektorok esetében. A sejtproliferációs kapacitás mérésére sejt életképesség, kolónia formáló és 'sebgyógyuló' (wound-healing) assay-ket alkalmaztunk.

3.6. Statisztikai módszerek

Az eredmények értékeléséhez SPSS for Windows 16.0 verzióját (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) illetve StatsDirect software-t (Addison-Wesley-Longman, Cambridge, UK) használtunk. Az értékelésnél $P < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

4. Eredmények

4.1. Vizsgálat I

4.1.1. AIP fehérje- és mRNS szintjének korrelációja

Az összes tumorminta expresszált AIP fehérjét, 13 esetben (42%) találtunk alacsony AIP fehérje szintet (1-2 pont). Az AIP fehérje szintjétől (magas vagy alacsony) függetlenül nem találtunk különbséget az AIP mRNS szintjében. Mindezek alapján feltételeztük, hogy az

alacsony AIP fehérje szint oka a miRNS-ek által kifejtett poszt-transzkripciós szabályozás lehet.

4.1.2. miRNS-ek expresszió szintje

In silico előrejelzés alapján 11 miRNS-t választottunk ki további valós idejű qPCR vizsgálat céljából: let-7a, let-7b, miR-202, miR-22, miR-34a, miR-34c, miR-449b, miR-510, miR-612, miR-639 és miR-671. Két miRNS esetében mértünk magasabb szintet azokban a tumorokban, ahol alacsony volt az AIP fehérje szintje: miR-22 és miR-34a.

4.1.3. Az AIP expresszió, miR-22-és miR-34a-szint és a tumor invazivitása, valamint szomatosztatin-analógra adott válaszkészsége közötti összefüggés

A 13 alacsony AIP fehérje szintű szomatotropinoma közül 11 volt invazív (85%), míg a 18 magas AIP fehérje szintű adenoma közül csupán 6 (33%) (P=0.006). Az invazív és nem-invazív szomatotropinomák esetében a miR-34a szintjében nem volt szignifikáns eltérés. Huszonhat beteg kapott a műtét után hosszúhatású szomatosztatin-analóg készítményt (OCT-LAR). Tíz

beteg (38%) esetében tekintettük az acromegaliát kontrolláltnak OCT-LAR kezelés mellett. A kilenc beteg közül, akiknek a szomatotropinomája alacsony mértékben expresszálta az AIP fehérjét, összesen egy betegnél (11%) értünk el gyógyszeres kezeléssel megfelelő eredményt, míg 17 olyan beteg közül, akiknek GH-termelő hypophysis adneomájában magas volt az AIP-szint, 9 betegnek (53%) volt hatékony az OCT-LAR terápia (P=0.045). Az OCT-LAR adásával kontrollált esetekben alacsonyabb volt a miR-34a szintje, mint azokban az esetekben, amelyeknél az OCT-LAR mellett az acromegalia nem volt megfelelően kontrollált.

4.1.4. miR-34a hatása az AIP expresszió szabályozására *in vitro*

A humán *AIP*-3'UTR szakaszon három előre jelzett kötőhely van a miR-34a számára, míg a miR-22 számára csupán egy; a humán *AIP* stop kodonjától 42-47 bázispár távolságra. A miR-34a, miR-22 és *AIP* közötti *in silico* előre jelzett interakció vizsgálatához egy pGL3 vektort alkalmaztunk, amely a humán vad típusú *AIP*-3'UTR részt tartalmazta a Firefly

luciferáz kódoló szekvenciája mögött. A GH3 sejtek transzfekciója pre-miR-34a-val és a WT-*AIP*-3'UTR-t tartalmazó vektorral a luciferáz aktivitás 31±4%-os csökkenéséhez vezetett a kontrollhoz képest (P<0.0001). A pre-miR-22 transzfekciója nem eredményezte a luciferáz aktivitás csökkenését.

4.1.5. Az előre jelzett miR-34a kötőhelyek igazolása

Annak vizsgálatára, hogy az előre jelzett kötőhelyek közül melyik felelős a miR-34a hatásáért, a kötőhelyeket mutáció segítségével módosítottuk; MUT_A az A kötőhely mutáns változata (c.*6-30), MUT_B a B kötőhelyé és MUT_C a C kötőhelyé. MUT_A esetében a miR-34a nem tudta kifejteni gátló hatását a luciferáz aktivitásra, míg MUT_B és MUT_C esetében nem volt ilyen hatás.

4.1.6. Az endogén AIP expresszió miR-34a általi szabályozása *in vitro*

A miR-34a és *AIP* interakciójának további vizsgálatára HEK293 és GH3 sejtekben mértük az endogén AIP fehérje és mRNS szintjét miR-34a felül-és

alulexpresszálását követően. Míg a transzfekciót követően 48 órával az AIP fehérje szintjében szignifikáns csökkenés volt észlelhető, (HEK293 n=7, 17±3%, *P*=0.001, GH3 n=4, 25±1%, *P*=0.0005), ezzel szemben az mRNS szintjében nem volt szignifikáns változás.

4.1.7. A miR-34a hatása a sejtproliferációra és kolónia formációra

A miR-34a felülexpresszálásának hatását vizsgáltuk a sejtproliferációra és kolónia formációra BXPC3 és GH3 sejteken. A sejttenyészetben 24 és 48 óra elteltével az élő sejtek számában szignifikáns emelkedést észleltünk, (13±3% *P*=0.007, 9±5% *P*=0.02) míg a 'wound-healing assay' és kolónia formáló assay esetében az eltérés nem volt szignifikáns.

4.2. Vizsgálat II

4.2.1. Genetikai szűrés

Tizenkilenc hypophysis adenoma és phaeo/PGL betegnél az *SDHA, SDHB, SDHC, SDHD, SDHAF2, VHL* és *MEN1* génekben találtunk csírasejtes mutációt, míg húsz beteg esetében nem találtunk

mutációt. A betegek közül senkinek nem volt *AIP* vagy *CDKN1B* mutációja. Tizenegy családnál (16 beteg) azonosítottunk csírasejtes *SDHX* variánst. Hét családnál találtunk patogén *SDHX* mutációt, és 4 családnál pedig eddig ismeretlen jelentőségű variánst észleltünk. A hypophysis tumorszövetben a normális allél elvesztését találtuk a vérmintából kivont DNS-el összehasonlítva. Két betegnél találtunk csírasejtes *MEN1* mutációt és phaeochromocytomát, míg a többi génben nem igazoltunk mutációt. Mindkét phaeochromocytoma esetében igazoltuk a heterozigócia elvesztését a *MEN1* lókuszon.

4.2.2. Szövettani jellemzők

Az *SDHX* mutációval járó hypophysis adenomákra citoplazmatikus vakuolák voltak jellemzőek. A PAS/DPAS festés nem utalt glikogén akkumulációra. Mivel az *SDHX* mutációnak hatása van a mitokondrium funkciójára, immunhisztokémiai vizsgálat történt a mitokondrium membránját célzó anti-113-1 antitesttel. A vakuolákat nem határolta ez a fehérje, ami alapján feltételezhető, hogy a

vakuolizáció nem a mitokondriumok kitágulásának következménye. Az endoplazmatikus retikulumot célzó ERLEC1 antitesttel történő vizsgálat alapján a vakuoláknak nincs közük az endoplazmatikus retikulumhoz sem. A vakuolák további vizsgálatához elektronmikroszkópot használtunk. A paraffinba ágyazott szövetminták vizsgálati lehetősége ezzel a technikával korlátozott volt. A citoplazmában nagy, üres vakuolák helyezkedtek el, amelyek nem kapcsolódtak a mitokondriumhoz és nem határolta őket membrán. A *MEN1* mutációt hordozó betegek phaeochromocytoma mintájának menin festése vagy a festődés hiányát vagy csökkent voltát jelezte.

5. Következtetés

5.1. Vizsgálat I

Humán sporadikus szomatotropinomákban az alacsony AIP fehérje szintje összefüggésben áll a magas miR-34a szinttel, és a miR-34a alulszabályozza az AIP fehérje szintjét *in vitro* vizsgálatokban. Ezen kívül a magas miR-34a szint (akárcsak a korábbiakban igazolt alacsony AIP fehérje szint)

együtt jár a szomatosztatin-analógokra adott válaszkészség csökkenésével. A miR-34a AIP fehérje szintjére gyakorolt gátló hatása az AIP mRNS szint befolyásolása nélkül jön létre. Eredményeink alapján a miR-34a alulszabályozza az AIP fehérje szintjét, míg a miR-22-nek nincs ilyen hatása. A miR-34a hatását valószínűleg az *AIP*-3'UTR c.*6-30 kötőhelyén fejti ki. A miR-34a felülexpresszálása gátolja az AIP fehérje expresszióját GH3 és HEK293 sejteken *in vitro*, ami az élő sejtek számának emelkedésével jár együtt.

Összefoglalva igazoltuk, hogy azokban a sporadikus szomatotropinomákban, ahol AIP mutáció nincs jelen, de az AIP fehérje szintje alacsony, a miR-34a felülexpresszált, és ez negatív összefüggésben áll a szomatosztatin-analóg terápia hatékonyságával. Funkcionális vizsgálatok igazolták, hogy a miR-34a alulszabályozza az AIP expresszióját, ami alapján feltételezhető, hogy szerepe van a sporadikus GH-termelő hypophysis adenomák patogenezisében.

5.2. Vizsgálat II

A hypophysis adenomák és phaeo/PGL együttes előfordulása nagyon ritka, és nem jellemző egyik klasszikus endokrin neoplasia szindrómára sem. A hypophysis adenomát illetve phaeo/PGL-t okozó gének szűrésével 11/27 családban találtunk csírasejtes mutációt. *SDHX* mutáció esetén előfordulhat hypophysis adenoma, és kialakulásuk feltehetően összefüggésben áll az *SDHX* mutációval. Eredményeink alapján a *MEN1* mutáció összefüggésben állhat a phaeochromocytoma kialakulásával. Ezen kívül előfordulhat releasing hormont (GHRH/CRH) termelő phaeochromocytoma, amely a hypophysis sejtek hyperplasiáját okozza. Ezek tehát nem valódi hypophysis adenomák, így differenciáldiagnosztikai problémát okozhatnak. A vizsgált betegek felében nem találtunk mutációt, amelynek hátterében lehet egyéb génmutációk jelenléte, vagy a hypophysis adenoma és phaeo/PGL együttes előfordulásának véletlen egybeesése. *SDHX* eltérés esetén jellegzetes szövettani kép – citoplazmatikus vakuolák jelenléte - jellemző a hypophysis adenomákra. A vakuolák

eredete eddig tisztázatlan. A szukcinát dehidrogenáz vagy VHL inaktivációja a hypoxia által indukált faktor (HIF) jelátviteli útvonal aktiválódásához, ez által pseudohypoxiához vezet. Egy *SDHD* mutációt hordozó beteg hypophysis adenomájában emelkedett HIF-1α volt észlelhető. Egyelőre nem ismert, hogy az *SDH*-mutációval összefüggő tumorokban a vakuolizáció a pseudohypoxia következménye-e, de *VHL*-mutációval járó hypophysis adenoma esetében nem észleltük ezt a jelenséget. A mitokondrium vagy az endoplazmatikus retikulum membránját célzó immunfestés alapján a vauolák nem ezekhez a sejtorganellumokhoz tartoznak.

Összefoglalva a phaeo/PGL-t okozó génmutációk ritkán szerepet játszhatnak a hypophysis adenoma kialakulásában, míg a hypophysis daganatokat okozó génmutációknak (*MEN1*) szerepük lehet a phaeo/PGL kialakulásának patomechanizmusában. Eredményeink alapján megfontolandó azoknak a betegeknek és családoknak genetikai szűrővizsgálata, akiknél hypophysis adenoma és phaeo/PGL együttesen fordul elő.

6. Saját publikációk jegyzéke

Disszertációhoz kapcsolódó közlemények

1. Dénes J, Korbonits M, Hubina E, Kovács GL, Kovács L, Görömbey Z, Czirják S, Góth M. (2011) Familiáris izolált hypophysisadenoma. Orv Hetil, 152: 722-730.

2. Boguszewski CL, Fighera TM, Bornschein A, Marques FM, **Dénes J**, Rattenbery E, Maher ER, Stals K, Ellard S, Korbonits M. (2012) Genetic studies in a coexistence of acromegaly, pheochromocytoma, gastrointestinal stromal tumor (GIST) and thyroid follicular adenoma. Arq Bras Endocrinol Metabol, 56: 507-512. IF: 0.682

3. Rattenberry E, Vialard L, Yeung A, Bair H, McKay K, Jafri M, Canham N, Cole TR, **Denes J**, Hodgson SV, Irving R, Izatt L, Korbonits M,Kumar AV, Lalloo F, Morrison PJ, Woodward ER, Macdonald F, Wallis Y, Maher ER. (2013) A comprehensive next generation sequencing based genetic testing strategy to improve diagnosis of

inherited pheochromocytoma and paraganglioma. J Clin Endocrinol Metab, 98: E1248-56. IF: 6.310

4. **Dénes J**, Kasuki L, Trivellin G, Colli LM, Takiya CM, Stiles CE, Barry S, De Castro M, Gadelha M, Korbonits M. (2015) Regulation of aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) protein expression by miR-34a in sporadic somatotropinomas. PlosOne, 10: e0117107. IF: 3.534

5. **Dénes J**, Swords F, Rattenberry E, Stals K, Owens M, Cranston T, Xekouki P, Moran L, Kumar A, Wassif C, Fersht N, Baldeweg SE, Morris D, Lightman S, Agha A, Rees A, Grieve J, Powell M, Luiz Boguszewski C, Dutta P, Thakker RV, Srirangalingam U, Thompson CJ, Druce M, Higham C, Davis J, Eeles R, Stevenson M, O'Sullivan B, Taniere P, Skordilis K, Gabrovska P, Barlier A, Webb SM, Aulinas A, Drake WM, Bevan JS, Preda C, Dalantaeva N, Ribeiro-Oliveira A Jr, Tena Garcia I, Yordanova G, Iotova V, Evanson J, Grossman AB, Trouillas J, Ellard S, Stratakis CA, Maher ER, Roncaroli F, Korbonits M. (2015) Heterogeneous genetic background of the association of

pheochromocytoma/paraganglioma and pituitary adenoma - results from a large patient cohort. J Clin Endocrinol Metab, 100: E531-541. IF: 6.310

Egyéb publikációk

1. Dénes J, Korbonits M, Hubina E, Góth M. (2010) Az acromegalia kezelése. Orv Hetil, 151: 1384-1393.

2. Dénes J, Hubina E, Góth M. (2011) Felnőttkori növekedésihormon-pótló kezelés jelentősége a háziorvosi gyakorlatban. Háziorvos Továbbképző Szemle, 16: 389.

3. Kovács GL, **Dénes J**, Hubina E, Kovács L, Czirják S, Góth M. (2011) Konszenzus a kritériumok változásáról az acromegalia gyógyulásának megítélésében – nemzetközi ajánlás, 2010. Orv Hetil, 152: 703-708.

4. Hubina E, Tóth Á, Kovács GL, **Dénes J**, Kovács L, Góth M. (2011) Növekedésihormonreceptor-antagonista alkalmazásának lehetőségei acromegaliában. Orv Hetil, 152: 709-714.

5. Kovács GL, Szabolcs I, Görömbey Z, Kovács L, Hubina E, **Dénes J**, Kósa R, Góth M. (2011) A

Borrelia burgdorferi és a Riedel thyreoiditis lehetséges kapcsolata. Esetismertetés és irodalmi áttekintés. Magy Belorv Arch, 64: 300-306.

6. Dinesen PT, Dal J, Gabrovska P, Gaustadnes M, Gravholt CH, Stals K, **Denes J**, Asa SL, Korbonits M, Jørgensen OL. (2015) An unusual case of an adrenocorticotropin-secreting macroadenoma with a germline variant in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene. Endocrinol Diabetes Metab Case Rep, 2015: 140105.