

# **Sejtciklusfüggő gén- és mikroRNS expresszió vizsgálata és gyakorlati jelentősége mellékvesekéreg-karcinómában**

Ph.D. doktori tézisek

**dr. Grolmusz Vince Kornél**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos  
Dr. Sóti Csaba, Ph.D., D.Sc., egyetemi docens

Szigorlati bizottság

elnök: Dr. Schaff Zsuzsa, Ph.D., D.Sc., a MTA rendes tagja

tagok: Dr. Hubina Erika, Ph.D., főorvos

Dr. Orbán Tamás, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest  
2016



## I. Bevezetés

Az eukarióta sejtek ismétlődő növekedési és osztódási folyamatát, amely során örökítőanyaguk megkettőződését követően – optimális esetben – két leánysejtre osztódnak, sejtciklusnak nevezzük. A sejtciklus folyamatainak pontos, összehangolt működése szigorú szabályozás következménye, amelyben mind transzkripció, transláció (sejtciklusfüggő expressziót mutató fehérjék) és poszt-transzlációs (aktiváló és deaktiváló foszforilációs és defoszforilációs folyamatok), valamint lebomlási folyamatok is közreműködnek. Az érzékenyen szabályozott sejtciklus számos regulátora mutat aberráns expressziót a daganatképződés során. Általánosságban elmondható, hogy a sejtciklust hajtó ciklinek és ciklinfüggő kinázok fokozott, míg a ciklinfüggő kináz inhibitorok és egyéb tumor szuppresszor gének csökkent kifejeződése figyelhető meg a daganatokban az ép szövetekhez képest.

A sejtciklusfüggő folyamatok vizsgálata során a leggyakrabban alkalmazott módszer a szinkronizálás. Ennek során – szérum megvonással vagy sejtciklus gátlószerek alkalmazásával – a sejtenyészetek sejtciklusát egy bizonyos ponton felfüggesztik. A gátlás megszüntetése után a sejtenyészethez tartozó sejtek szinkronizáltan folytatják sejtciklusukat, amelyből egységnyi időközönként mintát véve vizsgálhatóak a sejtciklusfüggő folyamatok. A szinkronizálás és a nagy áteresztőképességű génexpressziós vizsgálatok ötvözésével sikeresen detektálták a sejtciklusfüggő változásokat mutató transzkriptumokat (sejtciklusfüggő transzkripció program) sarjadzó élesztőgombákban és humán sejtekben is, ugyanakkor a szinkronizálás módszerét számos kritika is érte. A normális, diploid emlőssejtek korán elvesztik szinkronizáltságukat és csupán egy részük (50-70%) köteleződik el a további sejtosztódások irányába. Továbbá, a sejtciklus gátlószerekkel (pl. timidin) történő kezelés a ciklinek időelőtti expresszióját okozva növekedési egyensúly eltolódást (growth imbalance) okoz és a DNS szintézisének gátlásával különböző jelátviteli útvonalakat aktivál, megzavarva a sejtciklus optimális működését.

A mikroRNS-ek (miRNS-ek) rövid, ~ 21-26 nukleotid hosszú egyszálú RNS molekulák, amelyek az RNS interferencia jelensége révén csendesítik a bázis komplementaritás alapján célzott mRNS-ek translációját. A miRNS-mediálta csendesítés a humán genom több mint felének kifejeződését befolyásolja, és kiemelkedő jelentőséggel bír a daganatképződés során is.

A mellékvesekéreg-karcinóma (ACC – adrenocortical cancer) a mellékvese kéregállományából kiinduló ritka, kiemelten rosszindulatú, rossz prognózisú daganat. Incidenciája 0,7-2,0/millió fő/év. Prognózisa rossz, az ötéves túlélés csupán 22-37%-os. Az ACC hisztopatológiai diagnózisa nehéz feladat. A dignitás meghatározásában a 9 különböző patomorfológiai tényezőből összetevődő Weiss score meghatározása mellett a proliferáció immunhisztokémiai markereinek (elsősorban Ki67 index) vizsgálata kiemelt jelentőségű.

## II. Célkitűzés

1. Célom volt kidolgozni és alkalmazni egy olyan, a sejtek DNS tartalmának meghatározásán alapuló áramlási citometriás sejtválogatással szeparáló módszert, amelynek segítségével a szinkronizáció korlátai nélkül tudom nagy áteresztőképességű metodikákkal vizsgálni humán sejtek sejtciklusfüggő génexpresszióját. A különböző sejtciklus fázisok teljes génexpressziós profiljának mérésével vizsgálni kívántam a sejtciklusfüggő génexpressziót, és ezt össze kívántam hasonlítani a korábbi, szinkronizációval nyert eredményekkel. Munkám során választ kerestem arra, hogy a sejtciklusfüggő génexpresszió dinamikája eltér-e a tumoros (adrenokortikális és méhnyakrák eredetű) és nem-transzformált (primer fibroblaszt) sejtekben.
2. Vizsgálni kívántam, hogy igazolhatóak-e integratív teljes miRNS expressziós vizsgálatokkal (microarray, TLDA, kis RNS szekvenálás) sejtciklusfüggő miRNS expressziós változások.
3. A mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonal sejtciklusfüggő transzkripciós programjának és az ACC-re jellemző malignitás mintázatnak összehasonlításával új, potenciálisan proliferációs markerként hasznosítható faktort kerestem. További célom volt az így azonosított ribonukleotid reduktáz M2 alegysége (RRM2) kifejeződésének vizsgálata különböző proliferációs aktivitású ACC szöveteken.
4. Vizsgálni kívántam, hogy a különböző antineoplasztikus kezelések hatással vannak-e az RRM2 proliferációs marker kifejeződésére mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonalon.

### **III. Módszerek**

#### **III.1. Sejtenyészeteken végzett kísérletek**

Kísérleteimet humán primer sejtenyészetben (bőrfibroblaszt – human dermal fibroblast from adult – HDFa) és sejtvonalakon (hormontermelő mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonal – NCI-H295R és méhnyakrák sejtvonal – HeLa) végeztem a forgalmazó protokolljainak megfelelően.

##### **III.1.1. Áramlási citometriás módszerek**

A szuszpendált sejteket viábilis DNS festékekkel jelöltem (Vybrant DyeCycle Orange, Molecular Probes, Life Technologies), majd a sejtek DNS tartalma alapján szegregáltam a G1, S és G2 fázisba tartozó sejteket (sejtciklus szerinti sejtválogatás) fluoreszcencia aktivált sejtválogatással (FACS) FACSAria III sejtválogató készüléken (Becton-Dickinson). A szétválogatott sejtpopulációk tisztaságát ismételt áramlási citometriás analízissel validáltam. Az adatokat BD FACSDiva v6.1.3 szoftverrel értékeltem ki

A daganatellenes szerek hormontermelő NCI-H295R sejtek apoptózisára és sejtciklus fázisainak disztribúciójára gyakorolt hatását is áramlási citometriával vizsgáltam. A kezelések után a sejteket propidium-jodiddal jelöltem és FACSCalibur áramlási citométer (BD Biosciences) segítségével analizáltam. Az eredményeket Cell Quest Pro és Winlist szoftverek segítségével értékeltem ki.

##### **III.1.2. Kezelések daganatellenes szerekkel**

Az NCI-H295R hormontermelő mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonalon a gemcitabin (G6423, Sigma-Aldrich Chemical Co., végkoncentráció:  $5 \times 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>), a mitotán (N12706, Sigma-Aldrich Chemical Co., végkoncentráció:  $5 \times 10^{-6}$  mol/dm<sup>3</sup>) és a 9-

cisz-retinsav (sc-205589A, Santa Cruz Biotechnology, végkoncentráció:  $5 \times 10^{-5}$  mol/dm<sup>3</sup>) önálló és kombinált adásának hatásait vizsgáltam. Nyolc kezelési protokollt (kontroll, gemcitabin, mitotán, 9-cisz-retinsav, gemcitabin+mitotán, gemcitabin+9-cisz-retinsav, mitotán+9-cisz-retinsav, gemcitabin+mitotán+9-cisz-retinsav) alkalmaztam 24, 48, ill. 72 óra hosszan, időpontonként és kezelésként 3 biológiai párhuzamossal. Vizsgáltam a kezelések hatását a sejtek proliferációjára, apoptózisára, sejtciklus-fázisainak eloszlására nézve, emellett gén- és fehérjeexpressziós méréseket is végeztem.

### **III.1.3. Proliferációs assay**

Az egyes antineoplasztikus szerek proliferációra gyakorolt hatását alamarBlue sejtproliferációs reagenssel (DAL1025, Thermo Fischer Scientific), 96-lyukú tenyésztőedényben vizsgáltam.

### **III.1.4. Kortizol meghatározás az NCI-H295R sejtek tápfolyadékából**

A kezeléseket követően a gemcitabin és a mitotán daganatellenes szerek kortizol termelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk folyadékkromatográfiát követő tömegspektrometriai módszerrel (LC-MS). Az LC-MS mérést Perkin-Elmer Flexar FX10 UHPLC-hez kapcsolt Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométeren végeztük.

## **III.2. RNS izolálás, gén- és miRNS expressziós vizsgálatok**

A teljes RNS izolálása miRNeasy Mini Kittel (Qiagen), a gyártó protokolljainak megfelelően történt.

### **III.2.1. Nagy áteresztőképességű gén- és miRNS expressziós mérések**

A G1, S és G2 fázisú HDFa, NCI-H295R és HeLa sejtekből izolált teljes RNS-ből génexpressziós microarray vizsgálatot végeztünk Agilent whole human genome 4x44K microarray lemezeken (Agilent Technologies) a gyártó protokolljainak megfelelően. Az adatok kiértékelése és statisztikai elemzése GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies) szoftverrel, az érintett biológiai útvonalak analízise Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems) programcsomaggal történt.

Három nagy áteresztőképességű metodikával (microarray, kvantitatív, valós idejű PCR - qRT-PCR - alapú TaqMan alacsony denzitású array: TLDA és kis RNS szekvenálás) vizsgáltuk a sejtciklusfüggő miRNS-expressziós változásokat G1, S és G2 fázisú HDFa, NCI-H295R és HeLa sejtekből izolált teljes RNS mintákon. A microarray vizsgálatokat Agilent 8×15K Human miRNA Microarray Release 12.0. lemezeken (Agilent Technologies) HDFa és NCI-H295R sejtekből nyert mintákon, a TLDA vizsgálatokat TaqMan Human MicroRNA Array A és B kártyákon (Applied Biosystems, Life Technologies) NCI-H295R sejtekből nyert mintákon végeztük, a kis RNS szekvenálás Illumina HiSeq2000 platformon történt NCI-H295R és HeLa sejtekből nyert mintákon. Az adatok kiértékelése és statisztikai elemzése GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies), Real-Time StatMiner™ (Integromics, Granada, Spanyolország) és edgeR (3.8.6 verzió) programcsomagok használatával történtek.

A gén- és mikroRNS expressziós mérések eredményeit egyedi TaqMan próbákkal végzett qRT-PCR mérésekkel is vizsgáltuk.

### **III.2.2. A sejtciklusfüggő transzkripció program dinamikájának összehasonlítása primer, nem-transzformált és tumoros sejttenyészetekben**

Százhuszonnégy, mind a HDFa, mind a HeLa sejtben sejtciklusfüggő expressziójú gén átlagos kifejeződésének fázisonkénti, sejtípusok közötti összehasonlításával azt vizsgáltam, hogy ezen, univerzális sejtciklus-gének kifejeződésében van-e különbség a



tumoros és nem tumoros sejtek között. A fenti 124 gén esetében vizsgáltam azt is, hogy az egyes fázisok között (G1/S, S/G2 és G1/G2) – abszolút értékben – átlagosan hányszoros expresszióváltozások történnek. Mindkét vizsgálatot ezután – ebből a 124 génből – 10 kiválasztott gén esetében qRT-PCR eredmények alapján is elvégeztem.

### **III.3. Fehérje izolálás és Western blot vizsgálatok**

A Western blot lízis pufferben szuszpendált és -80°C-os hőmérsékleten tárolt mintákat jégen felolvasztottam, ultrahanggal szonikáltam, 30 percig inkubáltam, majd centrifugáltam. Az izolált fehérje koncentrációját Bradford módszere szerint határoztam meg. A 10%-os poliakrilamid gélen elektroforézis segítségével szétválasztott fehérje extraktumot polivinildién-fluorid (PVDF) membránra blottoltam. A blokkolást követően a membránokat nyúl anti-foszfo-CDC-2 (Tyr15) antitesttel (Cell Signaling Technology, katalógusszám: 9111, hígítás: 1:500) vagy kecske anti-RRM2 antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-10846, hígítás: 1:200) egy éjszakán keresztül inkubáltam, majd tormaperoxidáz-konjugált másodlagos antitesttel inkubáltam. A vizualizációt SuperSignal West Pico kemilumineszcens szubsztrát (Thermo Scientific) hozzáadását követően Kodak Image Station 4000MM műszeren végeztem. Az egyenlő mennyiségű fehérje betöltését nyúl anti-β-aktin antitesttel (Cell Signaling Technology, katalógusszám: 4967, hígítás: 1:2000) történő inkubálást követő előhívással igazoltam.

### **III.4. Korábbi microarray tanulmányok *in silico* elemzése**

A sejtciklusfüggő transzkripció program sejtciklus szerinti sejtválogatással nyert eredményeit összehasonlítottam két korábbi, a sejtciklusfüggő transzkripció programot szinkronizálás módszerével vizsgáló tanulmány eredményeivel. Emellett – HeLa sejtek esetében – összehasonlítást végeztem a csak szinkronizálás, illetve a csak sejtciklus szerinti sejtválogatással kapott, a sejtciklus fázisai között szignifikáns expresszió-különbségeket mutató, valamint ezek metszetébe tartozó (közös) gének által érintett biológiai folyamatok

tekintetében. Továbbá, összehasonlítottam a mellékvesekéreg-karcinóma génexpressziós malignitás mintázatát (a rosszindulatú karcinómák és a jóindulatú adenómák közötti génexpressziós különbségek összessége) az NCI-H295R sejtvonalon sejtciklusfüggő transzkripciós programjával.

### **III.5. ACC mintákon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok**

A ribonukleotid reduktáz 2-s alegységének (RRM2) a mellékvesekéreg-karcinómák proliferációs aktivitásának függvényében való kifejeződését 12 szövettanilag igazolt humán mellékvesekéreg-karcinóma szövetmintán vizsgáltuk. A daganatos blokkokból 4 µm vastagságú metszeteket vágunk, amelyeket deparaffináltunk és rehidráltunk. Az endogén peroxidáz gátlását követően antigénfeltárást végeztünk, majd blokkoltuk a nemspecifikus kötőhelyeket. A Ki67 (SP6 klón, Thermo Scientific, katalógusszám: RM-9106, hígítás: 1:100) és az RRM2 (Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-10846, hígítás: 1:100) fehérjék jelölését egy éjszakán keresztül végeztük. Az immunreakció vizualizálását DAB Chromogen Kit (Biocare Medical) alkalmazásával végeztük.

Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelését három független elemző végezte. A Ki67 index meghatározásánál legalább 1000 sejt leszámolását követően, a pozitívan festődő sejtek arányát adtam meg. Az RRM2 festődésének jellemzéséhez egy korábban sikeresen alkalmazott score rendszert használtunk.

### **III.6. Statisztikai elemzés**

Az mRNS és miRNS expressziós microarray mérések kiértékelését egyutas ANOVA elemzést követően Tukey-féle Honestly Significant Difference poszt-hoc teszt és Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával végeztem. A TLDA vizsgálatok kiértékelése egyutas ANOVA módszerrel történt. Az újgenerációs szekvenálási

eredmények kiértékelését exact T-tesztet követő Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával végeztük. Az univerzális sejtciklus-gének különböző fázisokban való expressziójának, illetve a fázisok közötti dinamikus expresszió-változásainak összehasonlításához Student-féle T-próbát alkalmaztam. Az egyedi qRT-PCR validációs vizsgálatok eredményeinek kiértékelése során az egyes csoportok közötti összehasonlításra Student-féle T-tesztet alkalmaztam. A korrelációs vizsgálatokra Pearson- és Spearman-féle módszereket használtam. A sejtenyészeteken végzett kezelések hatását a proliferációra, a felülúszó kortizol koncentrációra, az apoptózis arányára, valamint a sejtciklus fázisainak eloszlására vonatkozóan Student-féle T-teszttel vizsgáltam.

Minden összehasonlításban a  $p$ -érték  $< 0,05$  eredményt fogadtam el statisztikailag szignifikánsnak.

## IV. Eredmények

### IV.1. A sejtciklusfüggő génexpresszió vizsgálata

Az optimalizált sejtciklus szerinti sejtválogatás sikeresen és nagy tisztasággal izolálta a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejteket HDFa, NCI-H295R és HeLa sejtek esetében egyaránt. A sejtciklus szerinti sejtválogatást követő FACS analízis és a szétválogatott populációkon végzett, a p-CDC-2 expresszióját kimutató Western blot vizsgálatok validálták a szétválogatás sikerességét.

A génexpressziós microarray vizsgálatok NCI-H295R sejtvonal esetén 55, míg HeLa sejtek esetében 252 szignifikánsan sejtciklusfüggő kifejeződésű transzkriptumot igazoltak. HDFa sejtekben a rigorózus statisztikai elemzés nem eredményezett szignifikánsan eltérő kifejeződést mutató gént, ebben a sejttypusban a különböző fázisok közötti összehasonlítások legalább egyikében legalább kétszeres expresszió-változást mutató (FC2) gének listáját vizsgáltam tovább. A microarray vizsgálatok alapján kiválasztott hat gén sejtciklusfüggő expresszióját sikeresen megerősítettem qRT-PCR vizsgálattal mindhárom vizsgált sejttypusban. A három vizsgált sejttypus sejtciklusfüggő transzkripció programján végzett bioinformatikai útvonal-elemzés mindhárom esetben a sejtciklussal szorosan összefüggő biológiai útvonalakat verifikált.

A korábbi, szinkronizálással nyert és a sejtciklus szerinti sejtválogatás módszerével kapott eredmények összehasonlítása során jelentős átfedést találtam a génlisták között, valamint – mind primer fibroblaszt, mind HeLa sejtek esetében – szignifikáns korrelációt találtam a két módszer eredményei között.

Emellett, HeLa sejtekben vizsgáltam a sejtciklusfüggő transzkripció program szinkronizálásra, sejtciklus szerinti sejtválogatásra specifikus, valamint a fenti két halmaz

metszetéhez tartozó gének által meghatározott biológiai folyamatokat. Míg a sejtciklus szerinti sejtválogatásra specifikus gének által meghatározott biológiai folyamatok mindegyike megtalálható volt a két halmaz metszete által meghatározott folyamatok között, addig a szinkronizálásra specifikus gének által meghatározott folyamatok többsége (5/8) nem volt megtalálható a közös gének által meghatározott funkciók között.

Megállapítottam, hogy primer fibroblaszt sejtekben a sejtciklusfüggő gének átlagos expressziós szintje minden fázisban alacsonyabb volt a transzformált sejtekéhez képest, ugyanakkor ezen gének expressziójának fázisok közötti átlagos változásai lényegesen meghaladták a transzformált sejtekben tapasztalt mértéket.

## **IV.2. A sejtciklusfüggő miRNS expresszió vizsgálata**

Három nagy áteresztőképességű technikát (microarray, qRT-PCR alapú TLDA, kis RNS szekvenálás) alkalmaztam a sejtciklusfüggő miRNS expresszió vizsgálatára. Ezek közül a microarray eredmények mutatták a legkisebb változásokat, amelyek közül egy sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A qRT-PCR alapú TLDA módszerrel 8 miRNS mutatott szignifikáns expressziós eltérést a sejtciklus fázisai között. A kis RNS szekvenálás bizonyult a legszélesebb dinamikus mérési tartománnyal rendelkező módszernek. Ezzel a módszerrel HeLa sejtekben 11 szignifikáns miRNS-expressziós különbséget találtam. A nagy áteresztőképességű technikákkal talált szignifikáns különbségek nem voltak validálhatóak qRT-PCR módszerrel egyik vizsgált sejttypusban sem.

## **IV.3. Új, sejtciklusfüggő expressziót mutató proliferációs marker kimutatása mellékvesekéreg-karcinómában**

Három korábbi microarray tanulmány *in silico* újraelemzésével definiáltam az ACC génexpressziós malignitás mintázatát, melyet összehasonlítottam az NCI-H295R humán ACC sejt vonal sejtciklusfüggő transzkripciós programjával. Megállapítottam, hogy az S vs.

G1 összehasonlításban változó kifejeződésű gének többsége részt vesz a malignitás mintázat kialakításában is. A két halmaz metszetéhez tartozó gének közül az *RRM2* mutatta a legmagasabb génexpressziós különbséget S vs. G1 összehasonlításban, ezért a továbbiakban ezzel a génnel foglalkoztam részletesebben. Az *RRM2* (ribonukleotid reduktáz M2 alegység) a ribonukleotid reduktáz (RR) enzimkomplex alkotója, amely a ribonukleotid-dezoxiribonukleotid átalakulás katalizálásán keresztül a DNS szintézis sebességének egyik meghatározója.

A kiválasztott *RRM2* sejtciklusfüggő expresszióját sejtciklus szerint szétválogatott NCI-H295R mintákon mRNS és fehérje szinten egyaránt megerősítettem. A G1-fázisban alacsony expressziós szint S-fázisban megnő, ahol az *RRM2* a ribonukleotid reduktáz enzimkomplex részeként kulcsfontosságú a ribonukleotid-dezoxiribonukleotid átalakulásban.

Tizenkét, szövettanilag igazolt humán ACC-n végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatokat az *RRM2* és Ki67 fehérjék meghatározása céljából. Eredményeink szignifikáns, szoros pozitív korrelációt mutattak a Ki67 index és az *RRM2* score között.

#### **IV.4. Daganatellenes szerek hatásának vizsgálata humán ACC sejtvonalon**

Az NCI-H295R hormontermelő mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonalon a gemcitabin, a mitotán és a 9-cisz-retinsav önálló és kombinált adásának hatásait vizsgáltam.

A 72 órás kezelés során mindegyik alkalmazott daganatellenes szer csökkentette az NCI-H295R sejtek proliferációját. A gemcitabin rövidebb kezelési időtartam esetén is csökkentette a proliferációt, és a csökkenés mértéke is nagyobb volt, mint a másik két daganatellenes szerrel külön-külön kezelve. A gemcitabin-mediálta proliferáció-csökkenés

háttérben szerepe volt a – a 72 órás kezelés során kifejezetten nagymértékű – apoptózisnak is.

Az elvártaknak megfelelően a mitotán kezelés nagymértékben csökkentette az NCI-H295R sejtek kortizoltermelését, ugyanakkor a gemcitabin alkalmazása nem befolyásolta ezt.

A gemcitabin alkalmazása növelte a G1-fázisú sejtek arányát mindhárom kezelési időtartam esetén. A mitotán és a 9-cisz-retinsav, valamint különösen a kettő kombinált alkalmazása szignifikánsan emelte a G2-fázisú sejtek arányát a 24 órás kezelés során.

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

## V. Következtetések

1. A sejtciklus szerinti sejtválogatás segítségével – a korábbi, szinkronizáláson alapuló módszerekhez képest kevesebb műterméket okozva – optimálisan tudtam vizsgálni a sejtciklus működését. Megfigyeléseim alátámasztották a sejtciklusfüggő transzkripciós program már ismert tagjainak expressziós változásait több sejttypusban is és megerősítettem, hogy a sejtciklusfüggő transzkripciós program génei a daganatok malignitás mintázatában fokozottan fejeződnek ki, amelynek háttérében a sejtciklus fázisaitól függő és fázis-független expresszió-fokozódást is valószínűsítek. Azt is feltételezem, hogy a tumoros sejtekben észlelt, a sejtciklusfüggő transzkripciós programot érintő, a sejtciklus fázisai között észlelt alacsonyabb expressziós különbségek a malignus transzformáció következményei lehetnek.
2. A vizsgált három sejttypus különböző fázisú sejtjein végzett három nagy áteresztőképességű és egyedi miRNS expressziós méréseim eredményei arra utalnak, hogy dinamikus miRNS expressziós változások nem játszanak szerepet a sejtciklus szabályozásában a G1/S és S/G2 átmenetekben.
3. Az ACC malignitás mintázatának és az NCI-H295R humán ACC sejtvonalon sejtciklusfüggő transzkripciós programjának összehasonlításával azonosítottam az RRM2-t mint az ACC új proliferációs markerét. Immunhisztokémiai vizsgálataink megerősítették az RRM2 proliferációs markerként való alkalmazhatóságát ACC-ben.
4. A gemcitabin citotoxikus és a sejtciklusra gyakorolt hatásait sikerült validálnom NCI-H295R sejtvonalon. A gemcitabin egyik molekuláris célpontjaként azonosított RRM2 kifejeződésének a gemcitabin kezelés következtében kialakuló kifejezett emelkedése feltételezhetően egy kialakuló kemorezisztencia jele. Ennek a kemorezisztenciának az áttörése előfeltétele a gemcitabin sikeres alkalmazhatóságának ACC-ben.



## **VI. A disszertáció témájához kötődő saját publikációk jegyzéke**

1. Grolmusz VK, Toth EA, Baghy K, Liko I, Darvasi O, Kovalszky I, Matko J, Racz K, Patocs A. (2016) Fluorescence activated cell sorting followed by small RNA sequencing reveals stable microRNA expression during cell cycle progression. *BMC Genomics*, 17(1): 412.
2. Grolmusz VK, Karászi K, Micsik T, Tóth EA, Mészáros K, Karvaly G, Barna G, Szabó PM, Baghy K, Matkó J, Kovalszky I, Tóth M, Rác K, Igaz P, Patócs A. (2016) Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. *Am J Cancer Res*, 6(9): 2041-2053.

## **VII. A disszertáció témájától független saját publikációk jegyzéke**

1. Takács E, Grolmusz VK, Vértessy BG. (2004) A tradeoff between protein stability and conformational mobility in homotrimeric dUTPases. *FEBS Letters*, 566(1-3): 48-54.
2. Kender Z, Torzsa P, Grolmusz K V, Patócs A, Lichthammer A, Veresné Bálint M, Rác K, Reismann P. (2012) A metilglioxál metabolizmus szerepe 2-es típusú cukorbetegségben és szövődményeiben. *Orvosi Hetilap*, 153(15): 574-85.
3. Feldman K, Szappanos A, Butz H, Grolmusz V, Majnik J, Likó I, Kriszt B, Lakatos P, Tóth M, Rác K, Patócs A. (2012) 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): 1345-51.
4. Feldman K, Likó I, Nagy Z, Szappanos A, Grolmusz VK, Tóth M, Rác K, Patócs A. (2013) A 11- $\beta$ -hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim jelentősége klinikai kórképekben. *Orvosi Hetilap*, 154(8): 283-93.
5. Grolmusz VK, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, Patócs A, Rác K, Reismann P. (2013) Lack of association between C385A functional polymorphism of the fatty acid amide hydrolase gene and polycystic ovary syndrome. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 121(6): 338-42.
6. Kender Z, Fleming T, Kopf S, Torzsa P, Grolmusz V, Herzig S, Schleicher E, Rác K, Reismann P, Nawroth PP. (2014) Effect of metformin on methylglyoxal metabolism in patients with type 2 diabetes. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 122(5): 316-9.

7. Grolmusz VK, Acs OD, Feldman-Kovács K, Szappanos Á, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, Reismann P, Rác K, Patócs A. (2014) Genetic variants of the HSD11B1 gene promoter may be protective against polycystic ovary syndrome. *Molecular Biology Reports*, 41(9): 5961-9.
8. Patócs A, Igaz P, Tőke J, Lendvai N, Sarkadi B, Grolmusz V, Butz H, Tóth G, Németh K, Gláz E, Kiss R, Pusztai P, Sárman B, Reismann P, Szücs N, Tóth M, Rác K. (2016) Örökletes phaeochromocytomák és paragangliomák molekuláris genetikai vizsgálatával szerzett hazai tapasztalatok. *Magyar Belorvosi Archivum*, 69: 83-92.
9. Patócs A, Lendvai NK, Butz H, Liko I, Sapi Z, Szucs N, Toth G, Grolmusz VK, Igaz P, Toth M, Rác K. (2016) Novel SDHB and TMEM127 Mutations in Patients with Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndrome. *Pathology and Oncology Research*, 22(4): 673-9.