

A mitotán génextpressziós hatásainak és a mikroRNS-ek által befolyásolt útvonalak vizsgálata mellékvesekéreg carcinomában

Doktori értekezés

Zsippai Adrienn

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Programvezető: Dr. Rácz Károly egyetemi tanár, MTA doktora

Témavezető: Dr. Igaz Péter egyetemi docens, MTA doktora

Hivatalos bírálók: Dr. Pós Zoltán egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Hubina Erika főorvos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Darvas Katalin egyetemi tanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gundy Sarolta osztályvezető, kandidátus

Dr. Nagy Bálint tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
GYAKRABBAN HASZNÁLT GÉNSZIMBÓLUMOK ÉS FEHÉRJE	
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
I. BEVEZETÉS	9
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
II.1. A mellékvesekéreg carcinoma	11
II.2. A mellékvesekéreg carcinoma molekuláris patogeneze	12
II.2.1. <i>IGF-2</i> gén és a 11p15 kromoszóma régió	13
II.2.2. <i>TP53</i> gén és a 17p13 kromoszóma régió	14
II.2.3. <i>PRKARIA</i> gén és a 17q22-q24 kromoszóma régió	14
II.2.4. <i>Wnt/β-katenin</i> útvonal	14
II.2.5. A mellékvesekéreg daganatok funkcionális genomikai metaanalízise	15
II.2.6. A mikroRNS-ek	15
II. 2.6.1. A mikroRNS-ek nevezéktana	17
II.3. A mellékvesekéreg carcinoma kezelése	17
II.3.1. A mitotán	18
II.3.2. Citotoxikus kezelés	21
II.3.3. Új potenciális lehetőségek a mellékvesekéreg carcinoma kezelésében; a targetált terápia	21
II.3.4. <i>PPARγ</i> receptor	21
III. CÉLKITŰZÉSEK	23
IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	24
IV.1. A mitotán teljes genom génexpressziós hatásainak vizsgálata	24
IV.1.1. Sejttenyésztés és kezelések	24
IV.1.2. Sejt viabilitás vizsgálatok	25
IV.1.2.1. MTT teszt	25
IV.1.2.2. Áramlási citometria vizsgálat	25
IV.1.3. Szteroidhormon szintek meghatározása	26
IV.1.4. RNS izolálás	26
IV.1.5. mRNS expressziós profil meghatározása	27

IV.1.6. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, Géncsoport dúsulás vizsgálat).....	28
IV.1.7. QRT-PCR vizsgálatok	28
IV.1.8. Statisztikai elemzés	29
IV.2. A mikroRNS-ek által befolyásolt patogenetikai útvonalak bioinformatikai elemzése	30
IV.2.1. Adatkészletek.....	30
IV.2.2. Szövetspecifikus miRNS target predikció	32
IV.2.3. Útvonalelemzés	34
V. EREDMÉNYEK	35
V.1. A mitotán teljes genom génexpressziós hatásainak vizsgálata	35
V.1.1. Sejt viabilitás vizsgálatok	35
V.1.2. Szteroidhormon szintek meghatározása	36
V.1.3. Microarray elemzés	37
V.1.4. A kiválasztott gének expressziójának validálása kvantitatív valós idejű PCR módszerrel	41
V.2. A mikroRNS-ek által befolyásolt patogenetikai útvonalak bioinformatikai elemzése	43
V.2.1. Szövetspecifikus target predikció.....	43
V.2.2. Útvonalelemzés.....	43
V.2.2.1. Retinsav jelátviteli útvonalak	43
V.2.2.1.1. <i>PPARα/RXRα és a PPAR jelátviteli útvonalak.....</i>	<i>46</i>
V.2.2.1.2. <i>LPS/IL-1által közvetített RXR funkció gátlása, a PPARα/RXRα és az RAR aktiválási útvonalak.....</i>	<i>47</i>
V.2.2.2. Sejtciklust szabályozó útvonalak	47
V.2.2.2.1. <i>Aril hidrokarbon receptor és GADD45 jelátviteli útvonalak</i>	<i>52</i>
V.2.2.2.2. <i>Integrin jelátviteli útvonal.....</i>	<i>52</i>
V.2.2.2.3. <i>G2/M ellenőrzési pont szabályozása, kromoszóma replikáció szabályozás, ciklin és sejtciklus szabályozás útvonalai</i>	<i>53</i>
VI. MEGBESZÉLÉS.....	54
VI.1. A mitotán genomikus/génexpressziós hatásai.....	54
VI.2. A mikroRNS-ek által befolyásolt útvonalak bioinformatikai elemzése.....	57
VI.2.1. Retinsav jelátviteli útvonalak	57

VI.2.1.1. <i>PPARα/RXRα</i> és a <i>PPAR</i> jelátviteli útvonalak, az <i>LPS/IL-1</i> által közvetített <i>RXR</i> funkció gátlás, a <i>PPARα/RXRα</i> és az <i>RAR</i> aktiválási útvonalak.....	57
VI.2.2. Sejtciklust szabályozó útvonalak	59
VI.2.2.1. Aril hidrokarbon receptor és <i>GADD45</i> jelátviteli útvonalak	59
VI.2.2.2. Integrin jelátviteli útvonal	60
VI.2.2.3. G2/M ellenőrzési pont szabályozása, kromoszóma replikáció szabályozás, ciklin és sejtciklus szabályozás útvonalai.....	60
VII. KÖVETKEZTETÉSEK.....	63
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	65
IX. SUMMARY	66
X. IRODALOMJEGYZÉK	67
XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	83
XI.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke.....	83
XI.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények jegyzéke	84
XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	85
XIII. MELLÉKLETEK	86

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- ACA:** mellékvesekéreg (adrenocorticalis) adenoma
- ACC:** mellékvesekéreg (adrenocorticalis) carcinoma
- ANOVA:** variancia-analízis (Analysis of Variance)
- BWS:** Beckwith-Wiedemann-szindróma
- cDNS:** komplementer dezoxiribonukleinsav
- CGH:** komparatív genom hibridizáció
- CNC:** Carney-komplex
- CSM:** daganat-specifikus mortalitási arány (cancer-specific mortality rates)
- CT:** cycle threshold (ciklusszám küszöb polimeráz láncreakcióban)
- Cy3:** cianin fluoreszcens festék
- dCT, ΔCT:** normalizált cycle threshold
- ddCT, ΔΔCT:** komparatív cycle threshold
- DHEAS:** dehidroepiandroszteron-szulfát
- DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's medium
- DMSO:** dimetilszulfoxid
- DNS:** dezoxiribonukleinsav
- EDP/M:** etopozid, doxorubicin, ciszplatin, mitotán kombinált terápia
- ENS@T:** Európai Mellékvesekéreg Daganat Kutató Társaság
- F-12:** Nutrient Mixture F-12 Ham
- FAP:** familiáris adenomatosus polyposis szindróma
- FDR:** hamis találati arány (False Discovery Rate)
- FIRM-ACT:** első randomizált klinikai vizsgálat (First international randomized trial in locally advanced and metastatic adrenocortical carcinoma treatment)
- FSC:** előre irányuló fényszórás (forward scatter)
- GO:** Gene Ontology
- GSEA:** Gene Set Enrichment Analysis (Géncsoport dúsulás vizsgálat)
- HCC:** hepatocelluláris carcinoma
- Hep89:** humán hepatocelluláris sejtvonal
- HEPES:** 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsav

HepG2: humán hepatocelluláris carcinoma sejtvonal
IC₅₀: 50%-os gátló koncentráció (inhibitory concentration₅₀)
IPA: Ingenuity Pathway Analysis
LEA: Leading Edge-Analysis
LFS: Li-Fraumeni-szindróma
LOH: heterozigócia veszteség (loss of heterozygosity)
LPS: lipopoliszacharid
MEN1: multiplex endokrin neoplasia 1-es típusa
miRNS, miR: mikroRNS
mRNS: hírvivő ribonukleinsav (messenger RNA)
MTT: metil-thiazol-tetrazolium
N: normális, ép mellékvese
NCI-H295R: humán mellékvesekéreg carcinoma sejtvonal
o,p'-DDA: 1-(o-klorofenil)-1-(p-klorofenil) ecetsav
o,p'-DDD: 1,1-dikloro-2-(o-klorofenil)-2-(p-klorofenil) etán
o,p'-DDE: 1-(o-klorofenil)-1-(p-chlorofenil)-2,2-dikloroetén
PBS: Foszfát pufferelt sóoldat
PCR: polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
qRT-PCR: kvantitatív valós idejű (real-time) reverz transzkripció polimeráz láncreakció (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)
RA: retinsav
RIN: RNS integritás szám (RNA Integrity Number)
RNS: ribonukleinsav
RT: reverz transzkripció
SSC: oldalra irányuló fényszórás (side scatter)
Sz/M: sztreptozotocin, mitotán kombinált terápia
TNM: TNM osztályozási rendszer (tumor-lymph nodes-metastasis classification)
TZD: tiazolidindion
UICC: Nemzetközi Rákellenes Unió (International Union Against Cancer)
WHO: Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
vs: versus

GYAKRABBAN HASZNÁLT GÉNSZIMBÓLUMOK ÉS FEHÉRJE RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- AHR:** aril hidrokarbon receptor
- ALDH1L2:** aldehid dehidrogenáz (aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2)
- APC:** adenomatosus polyposis coli
- axin-APC-GSK3:** axin-adenomatosus polyposis coli-glikogén-szintáz kináz 3béta
- CAR:** konstitutív androsztán receptor
- CBG:** kortikoszteroid kötő globulin
- c-MYC:** myelocytomatosis viral oncogene homolog
- CYP11A1:** 11-alfa-hidroxiláz 1-es típusa (11 α -hydroxylase type 1)
- CYP11B1:** 11-béta-hidroxiláz 1-es típusa (11 β -hydroxylase type 1)
- CYP17A1:** 17-alfa-hidroxiláz 1-es típusa (17 α -hydroxylase type 1)
- CYP21A2:** 21-alfa-hidroxiláz 2-es típusa (21 α -hydroxylase type 2)
- DHEA:** dehidroepiandroszteron
- EGFR:** epidermális növekedési faktor receptor
- FDH:** 10-formiltetrahydrofolát dehidrogenáz
- FGFR:** fibroblaszt növekedési faktor receptor
- FXR:** farnezoid X receptor
- GADD45:** növekedés gátlás és DNS károsodás indukálta 45 (growth arrest and DNA-damage inducible 45)
- GADD45 α :** növekedés gátlás és DNS károsodás indukálta 45 alfa
- GADD45 β :** növekedés gátlás és DNS károsodás indukálta 45 béta
- GADD45 γ :** növekedés gátlás és DNS károsodás indukálta 45 gamma
- GDF-15:** növekedési és differenciációs faktor 15 (growth differentiation factor 15)
- HSD3B1:** 3 béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz/delta(5)-delta(4) izomeráz 1-es típusa (3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta(5)-delta(4)isomerase type 1)
- HSD3B2:** 3 béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz/delta(5)-delta(4) izomeráz 2-es típusa (3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta(5)-delta(4)isomerase type 2)
- IGF:** inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor)
- IGF-1:** inzulinszerű növekedési faktor-1 (insulin-like growth factor 1)

IGF-1R: inzulinszerű növekedési faktor 1 receptor (insulin-like growth factor 1 receptor)

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

IGF-2R: inzulinszerű növekedési faktor 2 receptor (insulin-like growth factor 2 receptor)

IGFBP2: inzulinszerű növekedési faktort kötő protein 2 (insulin-like growth factor binding protein 2)

IL-1: interleukin-1

IL-2: interleukin-2

IL-6R: interleukin-6 receptor

ILK: integrin-kötött kináz

ITGA3: integrin alfa 3

Ki-67: Ki-67 fehérje

LXR: máj X receptor (liver X receptor)

Mcl-1: myeloid sejt leukémia szekvencia-1

MRD-1/P: multidrog rezisztencia fehérje 1 (P-glikoprotein)

mTOR: mammalian target of rapamycin

PPAR: peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor

PPAR α : peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor alfa

PPAR β : peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor béta

PPAR γ : peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor gamma

PRKARIA: cAMP-dependens protein-kináz RI α inhibitor alegység, protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)

PXR: pregnán X receptor

RAR: retinsav receptor

RAR α : retinsav receptor alfa

RAR β : retinsav receptor béta

RAR γ : retinsav receptor gamma

RAS: ras onkogén

RXR: retinoid X receptor

RXR α : retinoid X receptor alfa

RXR β : retinoid X receptor béta

RXR γ : retinoid X receptor gamma

SERPINE: szerin peptidáz inhibitor (serpin peptidase inhibitor)

SerpineE1: szerin peptidáz inhibitor 1-es típusa (serpin peptidase inhibitor clade E, member 1)

SerpineE2: szerin peptidáz inhibitor 2-es típusa (serpin peptidase inhibitor clade E, member 2)

SerpineG1: szerin peptidáz inhibitor G1-es típusa

SHBG: szexuálhormont kötő globulin

TFAP2: AP-transzkripció faktor

TP5, (p53): tumor protein p53

TRIB3: tribbles homológ 3 (tribbles homolog 3)

Wnt: wntless-type MMTV integration site family

ZNF625: zinc finger protein 625

I. BEVEZETÉS

A mellékvese sporadikus daganatai gyakoriak, kórbonctani adatok alapján a népesség 7-9 %-ában fordulnak elő [1]. Az életkor előrehaladtával gyakoriságuk növekszik. A sporadikus daganatok többsége a mellékvesekéregből indul ki. E daganatok jelentős része jóindulatú, hormonálisan inaktív adenoma. A hormontermelő mellékvesekéreg daganatok ritkábbak, közülük a legfontosabbak az aldosteron- és kortizoltermelő adenomák. Az aldosterontermelő adenoma hypertóniát, hypokalaemiát, metabolikus alkalózist okoz (Conn-szindróma), míg a kortizoltútermelés a centrális elhízással, jellegzetes fenotípusos eltérésekkel, hypertóniával, csontritkulással, cukorbetegséggel jellemzett Cushing-szindrómához vezet.

A jóindulatú mellékvesekéreg daganatokhoz képest a mellékvesekéreg carcinoma nagyon ritka kórkép. Előrehaladott stádiumokban prognózisa rossz. Intenzív kutatások folynak új, hatékony kezelési módok felderítésére, de eddig jelentős áttörésről nem számoltak be e téren.

A mellékvesekéreg carcinoma patogenezisének, diagnózisának és kezelésének számos kérdése megoldatlan. A patogenezis pontosabb megismerése elősegítheti a daganatok osztályozását, kórisméjét és hatékonyabb kezelését. A nagy áteresztőképességű bioinformatikai vizsgálatok jelentős előrelépésekhez vezettek számos daganat patogenezisének feltérképezésében, így mellékvesekéreg daganatok esetén is. Munkacsoportunk több vizsgálatot végzett e téren. A génexpressziós microarray vizsgálatokat nemcsak a patogenezis megismerésére, hanem a kezelési lehetőségek vizsgálatára is felhasználhatjuk. Ennek keretében elsőként végeztük el a mellékvesekéreg carcinoma kezelésében alkalmazott, de csak részben ismert hatásmechanizmusú mitotán génexpresszióra kifejtett hatásának vizsgálatát.

A daganatok molekuláris patogenezisének új fejezetét jelentik a poszttranszkripciós szabályozásban szerepet játszó kis molekulású RNS molekulák, a mikroRNS-ek. Mellékvesekéreg daganatokban tapasztalt eltérő kifejeződésükről munkacsoportunk az elsők között számolt be [2]. A mikroRNS-ek génexpressziós vizsgálatát közlő tanulmányok eredményei között jelentős különbségek vannak. A mikroRNS-ek által befolyásolt kórfolyamatok átfogó bioinformatikai elemzéséről eddig nem készült tanulmány. Értekezésemben a mellékvesekéreg daganatok különböző

vizsgálataiban közölt mikroRNS profilok biológiai jelentőségét kíséreltem meg jellemezni egy átfogó elemzés keretében.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. A mellékvesekéreg carcinoma

A mellékvesekéreg carcinoma (ACC) ritka, rosszindulatú endokrin daganat, melynek éves incidenciája 0,5-2 fő/millió [3-5]. A carcinomában szenvedők átlagos életkora 45 év [6], de az életkor szerinti megoszlásban két nagy csoport különíthető el: az 5 évnél fiatalabb, és a 40-59 év közötti korosztály [7-9]. A nő-férfi előfordulási arány 1.5:1 [10, 11]. Prognózisa rendkívül rossz, előrehaladott stádiumban (Sullivan-McFarlane III-IV stádium) az ötéves túlélési aránya 35% alatti [12-14].

A mellékvesekéreg carcinoma az esetek döntő többségében sporadikus megjelenésű. A ritka örökletes formái is előfordulnak, mint a Li-Fraumeni-szindróma (LFS), a Beckwith-Wiedemann-szindróma (BWS) és a familiáris adenomatosus polyposis (FAP) szindróma [9].

A mellékvesekéreg carcinomák többsége hormontermelő (60%), míg kisebb részük (40%) hormonálisan inaktív [15]. A hormontermelő formák jellegzetes tünetegyüttest hoznak létre, míg a hormonálisan inaktív carcinomák általános daganat tüneteket, ill. a daganat méretével összefüggő panaszokat eredményeznek. A hormontermelő carcinomák között a kortizol (30%), az androgén (20%), az ösztrogén (10%), illetve nagyon ritkán az aldosteron (2%) termelődése [16, 17] jellemző. A kortizolt szekretáló daganatok gyors progressziójú Cushing-szindrómát okoznak [18, 19]. Az androgéntermelő ACC-k nőknél hirsutismust és virilizációt eredményeznek. Az ösztrogéntermelő mellékvesekéreg daganatok férfiaknál gynecomastiát és testicularis atrophíát okoznak [20]. Az aldosteron túltermelődése magas vérnyomást és hypokalaemiát eredményezhet [21].

A vizelet szteroidhormon metabolitjainak metabolomikai vizsgálatai arra utalnak, hogy a mellékvesekéreg carcinomák döntő többsége (90%) hormontermelő, csak a rutinvizsgálatban használt hormon meghatározásokkal ezek nagy része nem kerül felismerésre [22].

A mellékvesekéreg carcinoma kifejezetten agresszív daganat, amely gyakran lokális recidívát, regionális nyirokcsomó áttétet képez. A betegek 30%-nál a betegség felismerésekor már távoli (máj, csont, tüdő) áttétek figyelhetők meg. Távoli áttétek diagnosztizálásakor az ötéves túlélési arány 18% alá csökken [23].

A mellékvesekéreg daganatok szövettani vizsgálata, a jó- és rosszindulatú daganatok elkülönítése nehéz, nagy gyakorlatot igényel. Azonosításukra, jelenleg a számos problémát okozó, módosított Weiss-score-t használják. A bioinformatikai és mikroRNS vizsgálatok segíthetnek a daganatok dignitásának megállapításában, sőt prognosztikai jelentőségűek lehetnek. Az új microarray alapú vizsgálatok alapján a mellékvesekéreg carcinoma két fő csoportba, egy jobb és egy rosszabb prognózisúba sorolható [24-25].

II.2. A mellékvesekéreg carcinoma molekuláris patogenezeise

A mellékvesekéreg carcinomák kialakulásában szereplő kórfolyamatok megismerésében a ritka öröklődő formák vizsgálata, illetve az utóbbi években végzett bioinformatikai elemzések meghatározó jelentőségűek voltak.

A mellékvesekéreg carcinoma kialakulására hajlamosít a Beckwith-Wiedemann-szindróma, a Li-Fraumeni-szindróma és a familiáris adenomatosus polyposis. A multiplex endokrin neoplasia 1 (MEN1), a McCune-Albright-szindróma és a Carney-komplex (CNC) esetében elsősorban mellékvesekéreg adenoma fordul elő. A Beckwith-Wiedemann-szindrómában alapvetően fokozott *IGF-2* kifejeződést, a Li-Fraumeni-szindrómát okozó *p53* mutációkat és a familiáris adenomatosus polyposisra jellemző, fokozott *Wnt/β-katenin* út aktivitást mellékvesekéreg carcinomában is megtalálták.

A daganatok patogenezisének vizsgálatában jelentős előrelépésre vezettek a korszerű, nagy áteresztőképességű génexpressziós microarray vizsgálatok. A DNS microarray-k hibridizáción alapuló, egyszerre több szekvencia párhuzamos vizsgálatára alkalmas rendszerek [26]. Az elemzés során a vizsgálandó génekre specifikus DNS-próbákat szilárd hordozó felülethez, általában üveglemezekhez rögzítik (egyres eljárásoknál eleve azokon szintetizálják), majd a szövetmintából izolált, fluoreszcens festékkel jelölt RNS izolátumot DNS microarray lemezekhez hibridizáltatva analizálják a gének szöveti kifejeződését. Így lehetővé válik több ezer gén egyidejű kifejeződésének tanulmányozása [26]. A jelenleg rendelkezésre álló DNS-próbákat tartalmazó microarray lemezek a teljes humán genomot reprezentálják, és az RNS-variánsokat is kimutatják [26, 27].

A génexpressziós vizsgálatok egyik leghatékonyabb alkalmazási területe a daganatbiológia. Segítségével összehasonlíthatók az ép és daganatos, a jó- és a

rosszindulatú szövetek, illetve a rosszindulatú daganatok különböző stádiumai. Azonosíthatók a szignifikáns génexpressziós eltérések, a patogenetikai mechanizmusok, a benignus és malignus daganatok elkülönítésére alkalmas génexpressziós mintázatok. Ez utóbbinak olyan daganatok esetén van nagy jelentősége, ahol a malignitás megállapítása nehézségekbe ütközik. Ide sorolhatóak a mellékvesekéreg daganatok is.

A génexpressziós profil meghatározásával lehetőségünk adódik a daganatok pontosabb jellemzésére, alosztályrendszereik kialakítására, jobb prognózis becslésére és új terápiás célpontok meghatározására.

A mellékvesekéreg daganatok mRNS expressziós profilalkotás vizsgálatát először Giordano és mtsai végezték 2003-ban [28]. Ezt számos hasonló vizsgálat követte. [24, 29-33].

II.2.1. IGF-2 gén és a 11p15 kromoszóma régió

Az IGF rendszer 2 fehérje ligandból (*IGF-1*, *IGF-2*), 2 IGF receptorból (*IGF-1R*, *IGF-2R/mannóz-6-foszfát receptor*) és 6 magas affinitású kötőfehérjéből áll [34].

A sporadikus mellékvesekéreg carcinomákban míg az *IGF-1* nem mutat érdemi változást [35], addig az *IGF-2* jelentősen megnövekedett expressziója a legkövetkezetesebben észlelt génexpressziós eltérés [24, 36]. Az *IGF-2* expressziója mind egészséges mellékvesekéreg szövetekhez, mind jóindulatú adenomákhoz viszonyítva jelentősen fokozott [28, 29, 31]. Az *IGF-2* gént hordozó 11p15 kromoszóma régiót érintő heterozigócia vesztes (LOH) ACC esetén 67%-ban, adenomák esetén 13%-ban azonosítható [1].

In vitro kísérletek egyértelműen bebizonyították, hogy az *IGF-2* a mellékvesekéreg carcinoma sejtek osztódását serkenti. Az *IGF-2* hiperszekréción keresztül a PI3K/Akt/mTOR útvonal aktiválásának következtében fokozott sejtproliferációt eredményez [37]. Az *IGF-2* hatását számos kötőfehérje befolyásolja. Az inzulinszerű növekedési faktorokat kötő fehérjék közül az *IGFBP2* fokozott szöveti expresszióját áttét nélküli és előrehaladott, metasztatikus mellékvesekéreg carcinomákban is azonosították [35]. Az *IGF-2* és a *Ki-67* proliferációs markerek együttes alkalmazása a jó- és a rosszindulatú mellékvesekéreg daganatok elkülönítésére alkalmas megoldás lehet [38].

II.2.2. TP53 gén és a 17p13 kromoszóma régió

A *TP53* gén szomatikus mutációit a felnőttkori sporadikus mellékvesekéreg carcinomák 25-30%-ban azonosították. Jelenlétét rosszabb prognózissal és rövidebb túléléssel jellemezték [39]. E mutációk megjelenése döntően a nagyméretű, előrehaladott daganatokat jellemzi. A *TP53* gént hordozó 17p13 kromoszomális régió heterozigócia vesztesége a carcinomák 75-80%-ban fellelhető [9, 39]. A szomatikus *TP53* mutációk, s a 17p13 LOH gyakorisága közötti eltérés magyarázata nem teljesen tisztázott. Elképzelhető, hogy a patogenezis kialakulásában az érintett kromoszomális régió más génjének elvesztése játszik szerepet.

A tumor szupresszor gének daganatkeltő hatásához mindkét allél elvesztése szükséges. Mivel az érintett gén csak egy allélt érintő csírarsejtes mutációt örököl, a másik allél elvesztését szomatikus mutáció okozza. A heterozigócia veszteség (LOH, loss of heterozygosity) jelensége ezt jelzi, vagyis a csírarsejtes mutáció következtében heterozigóta, a második szomatikus mutáció következtében elveszti heterozigóciáját, homozigótává válik.

II.2.3. PRKARIA gén és a 17q22-q24 kromoszóma régió

A Carney-komplex esetek többségére jellemző *PRKARIA* mutációt a mellékvesekéreg adenomák 10%-ban igazolták, carcinomákban azonban nem sikerült kimutatni [40]. Ezzel szemben egy tanulmány a *PRKARIA*-t hordozó 17q22-q24 kromoszomális régió heterozigócia veszteségét a carcinomák több mint 50%-ban igazolta. Oka valószínűleg az LOH jelenség nem a *PRKARIA*-n keresztüli érvényesülésével magyarázható [39]. Bár az ACTH-adenilát-cikláz-cAMP jelátviteli út eltérései a benignus daganatok patogenezisében szerepet játszhatnak, a malignus daganatokban betöltött patogenetikai jelentőségükről nincsenek meggyőző adatok [9].

II.2.4. Wnt/ β -katenin útvonal

Wnt/ β -katenin útvonal a sejt differenciálódást és a sejtproliferációt szabályozó folyamat. Működésének hátterében a hasonló aminosav szekvenciákból felépülő, növekedési faktorok csoportja, a *Wnt* család áll. A *Wnt* a receptor komplexéhez kötődve korlátozza az *axin-APC-GSK3* (axin-adenomatosus polyposis coli-glikogén-szintáz kináz 3 β) komplex működését, ami gátolja a β -katenin foszforilációját, s a sejtmagba történő

transzlokáció növekedését eredményezi. Az *APC* gén mutáció következtében a komplexhez való kötődés nélkül önállóan aktiválódhat, s ez a sejtosztódás serkentésén keresztül daganatok kialakulását okozhatja [41].

Sporadikus mellékvesekéreg carcinomában a *Wnt/β-katenin* útvonal jelenlétét számos microarray megfigyelés alátámasztotta [24, 25, 29, 30, 31]. A jelátviteli út aktiválására jellemző diffúz citoplazmatikus *β-katenin* festődését az ACC-k többségében igazolták, a rosszabb prognózisú ACC-kben e fehérje sejtmagi lokalizációját prediktív folyamatként azonosították [42]. Ugyanakkor a *β-katenin* szomatikus mutációját a mellékvesekéreg daganatok 25-35%-ban detektálták [42].

II.2.5. A mellékvesekéreg daganatok funkcionális genomikai metaanalízise

Munkacsoportunk a mellékvesekéreg daganatok különböző vizsgálataiban eddig közölt mRNS microarray adatait és a kromoszómák komparatív genom hibridizációs vizsgálatok eredményeit a funkcionális genomikai metaanalízis keretében elemezve három fő patogenetikai utat azonosított: 1. a sejtciklus eltéréseit, 2. a retinsav jelátvitelt és 3. a komplementrendszer és antigénprezentáció eltéréseit. A sejtciklus eltérései között jól ismertek a ciklinek, a ciklin-dependens kinázok és a topoizomeráz 2 eltérései. Új megfigyelésként, hálózatelemzéssel megerősítve, a *c-MYC* protoonkogén csökkent kifejeződését észlelték, ami a patogenezis központi eleme lehet. A csökkent *c-MYC* expresszió – amit független kísérletes vizsgálatok is megerősítettek – meglepő, mivel a daganatok többségét fokozott kifejeződése jellemzi. A retinsav jelátviteli expressziójának csökkenése és csökkent retinsav képződés is azonosítható mellékvesekéreg carcinomában. Emellett leírtak számos lipid bioszintézisben szereplő, fehérjét kódoló génexpressziós eltérést is. A komplementrendszer eltérései sokrétűek, ezek patogenetikai jelentőségét ismerjük a legkevésbé [43].

II.2.6. A mikroRNS-ek

A mikroRNS-ek (miRNS, miR) rövid, 20-24 nukleotidból álló, egyláncú, fehérjét nem kódoló RNS molekulák, melyek az alapvető sejtleletani folyamatok szabályozásában meghatározó szerepet töltenek be [44]. A máig azonosított humán miRNS-ek száma több mint 1500-ra tehető. A miRNS-eket külön gének kódolják, amelyek a jelenleg azonosított humán gének 3%-át teszik ki. Az RNS interferencia endogén mediátoraként

a cél-mRNS-molekulák át nem íródó 3'-régiójához kötődve előidéznek a hírvivő mRNS-ek posztranszlációs gátlását, s a cél-mRNS-ek degradációját [45]. Hatásuk pleiotróp, azaz egy miRNS akár több száz komplementer szekvenciájú mRNS-t is gátolhat, s egy mRNS molekula számos miRNS szabályozás alatt is állhat [46, 47]. A miRNS-ek gátló hatása nem szigorúan fajlagos.

A miRNS-ek számos élettani és kóreltani folyamat szabályozásában vesznek részt [48]. Így befolyásolják a jelátvitelt, a sejt differenciálódást, a proliferációt [46] és az apoptózis folyamatát [49], részt vesznek a szervezet homeosztázisának fenntartásában [50, 51]. Szerepet játszanak az immunrendszer működésében, az adipocyták fejlődésében és az inzulinszekréció szabályozásában is [52].

A miRNS-ek expressziós változásait számos betegségben azonosították, azonban a legtöbb irodalmi adat a miRNS-ek daganatképződésben betöltött szerepét támasztja alá. A miRNS-ek expressziós mintázata a daganatok osztályozására, a dignitás megállapítására, a prognózis előrejelzésére, a jó- és rosszindulatú daganatok elkülönítésére is alkalmas lehet. A miRNS-ek expressziós eltéréseit többek között hematológiai [53], emlő [54], hipofízis [55], hasnyálmirigy [56], follikuláris és papilláris pajzsmirigy tumorokban [57] azonosították. Az expressziós eltérések mintázatainak különösen azon szervek daganataiban lehet kiemelkedő jelentősége, ahol a szövettani vizsgálattal nehezen lehet a malignitást megállapítani [52]. Ezek közé tartoznak a pajzsmirigy follikuláris daganatai [57] és a mellékvesekéreg daganatok is [2].

A miRNS-ek biológiai funkciójának megértésében alapvető szerepet játszik a célmolekulák azonosítása. Mivel a miRNS-ek pleiotróp hatásúak, vagyis egy miRNS több száz mRNS molekulát szabályozhat [46, 47], így a cél-mRNS molekulák azonosítása a költséges és időigényes kutatási folyamatok helyett, különböző *in silico* target predikciós algoritmusok segítségével történik. Az *in silico* target predikció során az algoritmusok, matematikai algoritmusok segítségével részleges vagy teljes bázis komplementaritást, úgynevezett miRNS-kötő "site"-okat keresnek a cél genom teljes területén. A rendelkezésre álló target predikciós algoritmusok ezen komplementaritást különböző súlyozással vesznek figyelembe. Jelenleg a legszélesebb körben használt algoritmusok a TargetScan 5.2 (<http://www.targetscan.org>), a Pictar (<http://pictar.org>) és

a MicroCosm Targets (www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5). Ezen algoritmusok szabadon hozzáférhetőek, webes alkalmazás formájában letölthetőek.

A mellékvesekéreg ép és daganatos szöveteiben (N, ACA, ACC) a mi kutatócsoportunk mellett több kutatócsoport is végzett mikroRNS expressziós vizsgálatokat [2, 58-62]. A szignifikánsan eltérően expresszálódó miRNS-ek esetén a különböző munkacsoportok eredményei között jelentős eltérések vannak. Ebben a daganatok felosztásának különbségei, a daganatminták száma, a metodikai változatosságok is szerepet játszhatnak, melyek alapján általános következtetések levonása nehézségekbe ütközik. Ezek alapján megkíséreltük az eddig közölt miRNS profilok által potenciálisan érintett útvonalak komplex bioinformatikai elemzését, szövetspecifikus miRNS target predikció és útvonalelemzés segítségével.

II.2.6.1. A mikroRNS-ek nevezéktana

A különböző szekvenciájú érett miRNS-eket a "miR-" előtag után feltüntetett számmal azonosítjuk (pl: miR-424). Fajok elkülönítésekor a "miR-" előtag előtt megtalálható, hárombetűs rövidítéseket alkalmazunk (pl: cel-miR: C. elegans). Ha egy fajon belül a genom különböző lókuszeitől átíródó, azonos szekvenciájú érett miRNS-eket azonosítunk, akkor a miRNS száma után kötőjellel feltüntetett újabb számot applikálunk (pl: miR-542-5). Néhány nukleotidban eltérő miRNS-ek esetén a számozás után betűt használunk (pl: miR-125b). A miRNS-ek bioszintézise során, ha a miRNS a prekurzor 5' karjáról kerül kihasításra, úgy a számozás után a -5p (pl: miR-483-5p), ha a 3' karról, akkor a -3p kerül feltüntetésre (pl: miR-127-3p).

II.3. A mellékvesekéreg carcinoma kezelése

A mellékvesekéreg carcinoma kezelése nem tekinthető megoldottnak. Elsődleges a daganatok sebészeti úton történő eltávolítása. Mivel a daganatok jelentős része a felismeréskor már áttétet képzett, a teljes sebészeti eltávolítás sokszor nem lehetséges. A daganattömeg csökkentése azonban még ekkor is hatékony megoldás lehet. A mellékvesekéreg carcinoma sugárkezelésre kevésbé érzékeny, bár egyes adatok szerint a daganatágy besugárzása a daganat eltávolítása után kedvező lehet a recidíva megelőzés szempontjából [18]. A daganat kemoterápiára sem kifejezetten érzékeny; mindazonáltal az előrehaladott daganatokban más rendelkezésre álló terápiás lehetőség nincs. Jelenleg

az egyetlen mellékvesekéregre specifikus per os alkalmazható citotoxikus szer a mitotán, amit mind monoterápiában, mind citosztatikus kombinációkban alkalmaznak.

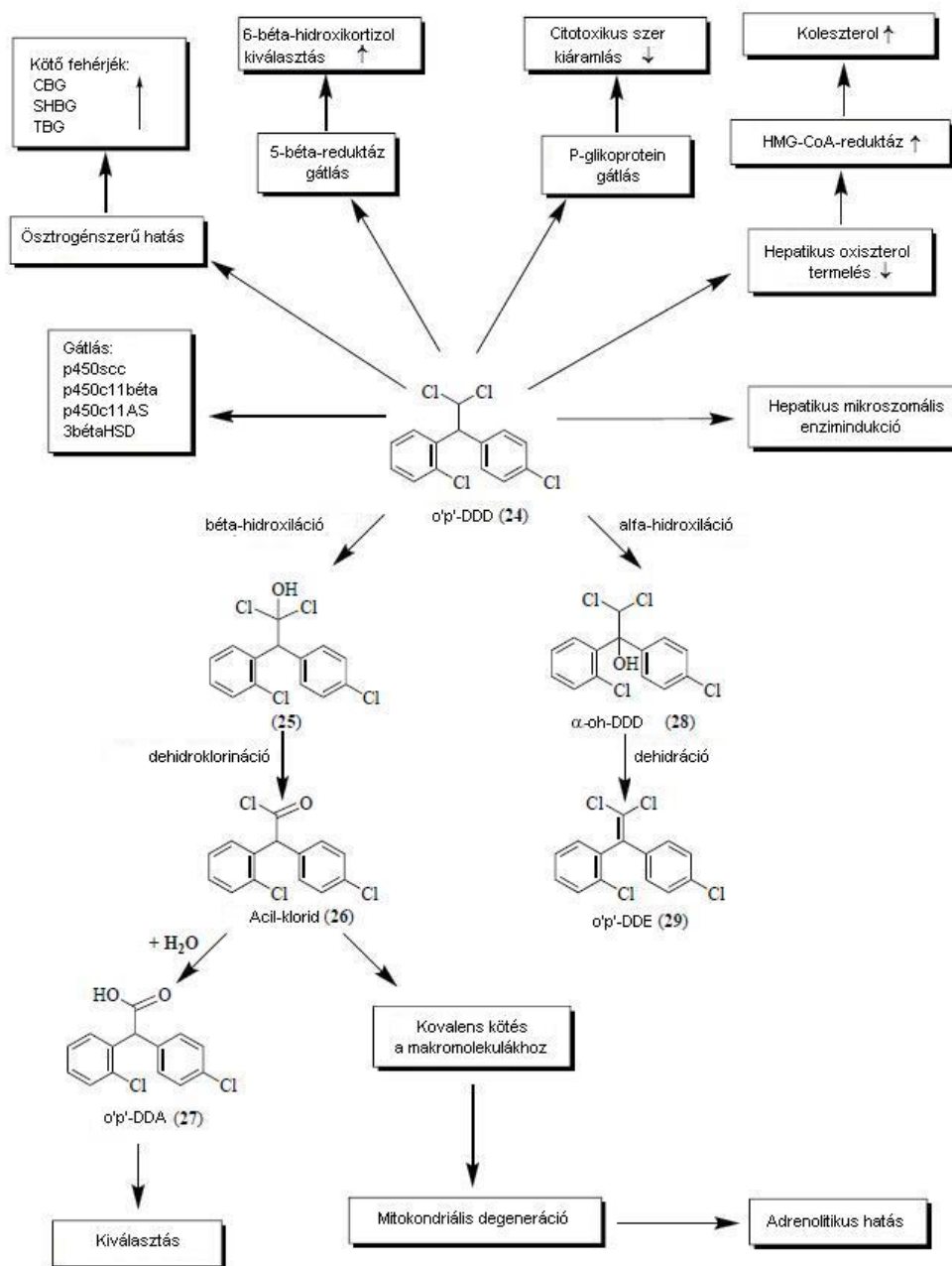
II.3.1. A mitotán

A mitotán (1,1-dikloro-2-(o-klorofenil)-2-(p-klorofenil) etán vagy o,p'-DDD) a mellékvesekéreg carcinoma kezelése során széles körben elterjedt adrenolitikus szer, amely mind adjuváns monoterápiás kezelésként, mind citotoxikus kezeléssel kombinálva alkalmazható [63]. Annak ellenére, hogy a mitotánt már több mint 50 éve alkalmazzák az ACC kezelésében, pontos hatásmechanizmusa a mai napig nem ismert.

Elsődleges, feltételezett hatásmechanizmusa az adrenocorticalis atrophíához és necrosishoz vezető mitokondriális degeneráció indukciója [63, 64]. Adrenolitikus hatása mellett közvetlenül képes gátolni a szteroidhormon bioszintézisben részt vevő enzimek aktivitását: a koleszterin oldallánc hasító enzimet (*CYP11A1*) [65] és a 11 β -hidroxilázt (*CYP11B1*) [66, 67]. Fokozza a hormonkötő fehérjék szintézisét, csökkenti a multidrog rezisztencia fehérje, a glykoprotein P expresszióját, növeli a koleszterin szintézist és a hepatikus mikroszomális enzimek aktivitását [63, 68]. A mitotán, a mellékvesekéreg sejteire citotoxikus hatást fejt ki, mely a zona fasciculata és reticularis fokális degenerációját eredményezi. Hatása a zona glomerulosában kevésbé jelentkezik [69]. A mitotán génexpressziós hatásait ezidáig kevésbé vizsgálták, teljes genom génexpressziós vizsgálatot eddig nem közöltek.

A mitotán metabolizmusa összetett. A máj által indukált, a mitotán metabolikus aktiválásának két metabolitja az 1-(o-klorofenil)-1-(p-klorofenil) ecetsav (o,p'-DDA) és az 1-(o-klorofenil)-1-(p-chlorofenil)-2,2-dikloroetén (o,p'-DDE), amelyek az o,p'-DDD α - illetve β -hidroxilációja során keletkeznek (**1. ábra**) [70].

A fő útvonalon az o,p'-DDD β -hidroxilációval acil-kloriddá alakul. Az acil-klorid, mint reakcióképes vegyület, képes kovalensen kötődni a mellékvese intracelluláris makromolekuláihoz, főként a mitokondriális fehérjékhez, hatást gyakorolva ezzel a biológiai aktivitásukra. Víz jelenlétében az acil-klorid a mitotán aktív metabolitjává, o,p'-DDA származékká alakul. A mellékútvonalon o,p'-DDD α -hidroxilációja során egy inaktív metabolit, az o,p'-DDE képződik [71]. Ezen ismereteink alapján feltételezhető, hogy a mellékvesekéreg carcinomában szenvedő betegeknél az o,p'-DDA szint monitorozása alapján a mitotán válaszreakciója megjósolható lehet [72].

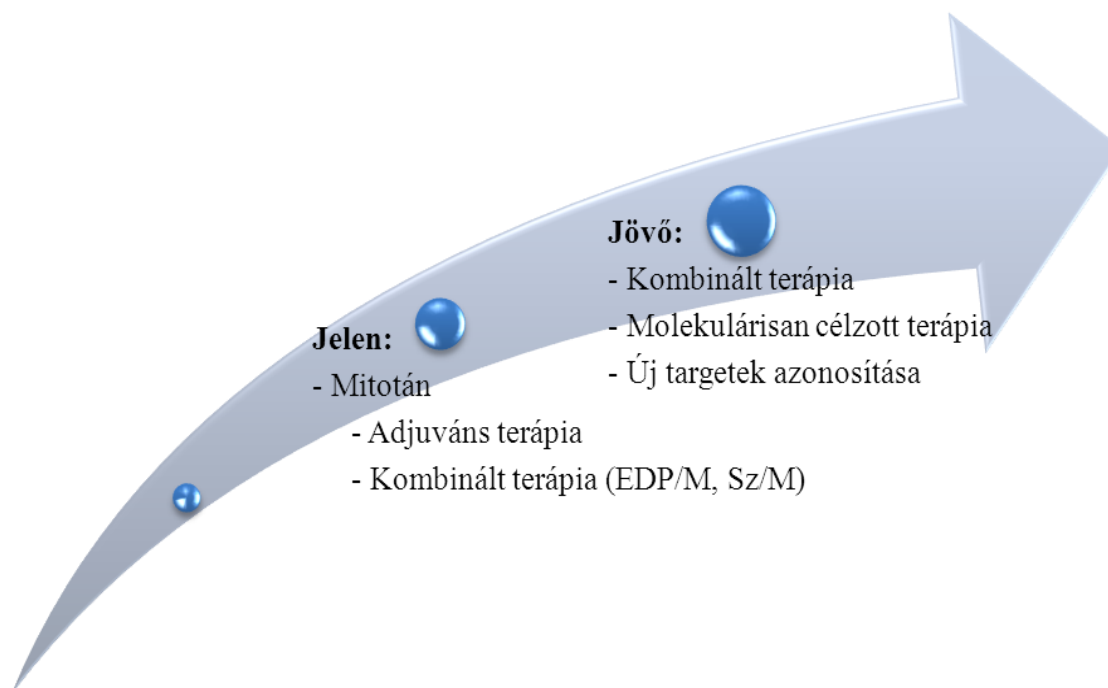


1. ábra: A mitotán metabolizmusa és főbb hatásai.

Igaz P, Tömböl Z, Szabó PM, Likó I, Rác K. (2008) Steroid biosynthesis inhibitors in the therapy of hypercortisolism: theory and practice. *Curr Med Chem*, 15: 2734-47. - ábrája alapján.

A mitotán terápiás ablaka szűk, 14-20 mg/l szérumszint esetén hatékony [73]. Rendszeres szérumszint meghatározás szükséges a mitotán kezelés beállításához. Alkalmazását számos mellékhatás korlátozza, így egyes betegek a használatát egyáltalán nem tolerálják.

A mitotán mellékhatásai dózisfüggőek. Terápiás szérumszint mellett a kezelt betegek több mint 80%-ánál okozott legalább egy nem kívánt mellékhatást [63, 68]. Mellékhatásai elsősorban neurológiai (járszavarok, szédülés, depresszió, levertség, aluszékonyosság, látóideg toxicitás és ataxia), gasztrointesztinális (hasmenés, hányinger, hányás, étvágytalanság és mucositis) endokrin (gynecomastia) és urogenitális (haematuria, haemorrhagiás cystitis és albuminuria) vonatkozásúak [63, 68, 74]. A mellékhatások magas száma, a hatóanyag szűk terápiás indexe miatt a mitotán klinikai alkalmazása meglehetősen nehéz, ezért jelenleg is intenzív kutatások folynak az ACC kezelésnél alkalmazható új terápiás támadáspontok azonosítására (**2. ábra**). A mitotán hatásmechanizmusának felderítése azért is fontos, mert támadáspontjainak megismerése lehetőséget adhat új, hatékonyabb, specifikusabb és kedvezőbb mellékhatásprofilú szerek kifejlesztésére.



2. ábra: *A mellékvesekéreg carcinoma terápiája. – Jelen és jövő.*

II.3.2. Citotoxikus kezelés

A mitotánt mind monoterápiában, mind citotoxikus szerekkel kombinálva alkalmazzák [63]. A citotoxikus kezelést a sebészeti úton el nem távolítható, lokálisan agresszív vagy metasztatikus mellékvesekéreg carcinomák esetén használják.

Adrenolitikus hatása mellett a mitotán citosztatikumokkal való kombinációjának hatékonyságában szerepet játszik, hogy a mitotán hatékonyan képes gátolni egy multidrog rezisztencia fehérjének, az *MRD-1/P*-glikoproteinnek a kifejeződését, javítva így a különböző kemoterápiás szerek sejtbe jutását és hatékonyságát [75, 76].

Az eddigi vizsgálatok alapján a mellékvesekéreg carcinoma kezelésében jelenleg az etopozid, doxorubicin, ciszplatin, mitotán (EDP/M) együttes kombinációját tartják a leghatékonyabb terápiának. Berruti és munkatársai fázis II vizsgálatban igazolták, hogy az említett kombinált terápia alkalmazásával 6,66%-ban teljes (5/72) és 41,66%-ban részleges (30/72) válaszreakció érhető el [77]. Más tanulmányok a sztreptozotocin és mitotán (Sz/M) együttes kombinációját javasolják. Ezen kombinált kezelés mellékhatásai ugyan enyhébbek, de ebben az esetben a válaszreakció is kisebb mértékű (4,54%-ban teljes (1/22) és 31,81%-ban részleges (7/22) a válaszreakció) [78]. Ezeket az eredményeket az első randomizált klinikai vizsgálat (FIRM-ACT) is megerősítette (<http://www.firm-act.org/>) [79].

II.3.3. Új potenciális lehetőségek a mellékvesekéreg carcinoma kezelésében; a targetált terápia

Az *IGF-2* patogenetikai fontosságára való tekintettel az *IGF-2* hatását gátló, *IGF-1R* receptort kötő, jelátvitelét korlátozó ellenanyagról, valamint kis molekulású gátlószerekről jelenleg fázis 3 klinikai vizsgálatok folynak [23]. Sajnos a köztes eredmények nem utalnak hatékonyságukra.

További targetált terápiák, mint az *FGFR*-, *EGFR*-, *mTOR* gátlók és a sunitinib egyike sem produkált jelentős eredményeket [75].

II.3.4. *PPAR* γ receptor

A peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor (*PPAR* γ) egy nukleáris transzkripciós faktor, amely a tiazolidindion (TZD) hatóanyag antidiabetikus hatását közvetíti. Különböző sejttípusokban a TZD antiproliferatív hatását korábbi tanulmányok igazolják

[80]. Ezt a hatást *in vitro* mellékvesekéreg carcinoma sejtvonalakon is bizonyították [81-83]. Részletes vizsgálatok alapján a szer antiproliferatív hatása *PPAR* γ receptor függő [81, 84]. Sajnos a tiazolidindionok alkalmazása a mellékhatások száma miatt visszaszorulóban van, így nem valószínű, hogy a mellékvesekéreg carcinoma kezelésében a jövőben bevezetésre kerülnének.

Mint a fentiekből látható, a jelenleg vizsgált molekuláris megközelítések nem tűnnek túlzottan reménykeltőknek, így további, új kezelési módok azonosítása nagy jelentőségűek lennének.

A hatékony, de nem teljesen ismert hatásmechanizmusú mitotán felderítése azért is fontos lenne, mert hatásának pontosabb megismerésével hatékonyabb, kevesebb mellékhatást okozó szerek kifejlesztése válhat lehetségessé. A mikroRNS-ek által befolyásolt kórfolyamatok felderítése is olyan utakat jelezhet, ami potenciális kezelési támadáspontokat foglalhat magában.

III. CÉLKITŰZÉSEK

1. A mitotán teljes genom génexpressziós hatásainak vizsgálata *in vitro* mellékvesekéreg carcinoma sejtvonalon.
2. Ezen belül vizsgáltuk annak kérdését, hogy a mitotán szteroidhormon bioszintézist gátló hatásában génexpressziós hatások szerepet játszanak-e.
3. Az eddig közölt mikroRNS expressziós mintázatot leíró tanulmányok eredményeit összegezve, a szignifikánsan változó kifejeződésű mikroRNS-ek által befolyásolt kórfolyamatok bioinformatikai elemzését végeztük.

IV. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

IV.1. A mitotán teljes genom génextpressziós hatásainak vizsgálata

IV.1.1. Sejtenyésztés és kezelések

A humán mellékvesekéreg carcinoma NCI-H295R sejt (American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) monolayer tenyészetet Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM:F-12 (1:1); Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA) táptalajon hoztuk létre kiegészítve:

0,00625 mg/ml inzulinnal (Sigma-Aldrich Chemical Co.),

0,00625 mg/ml transferrinnel (Sigma-Aldrich Chemical Co.),

6,25 ng/ml szelénnel (Sigma-Aldrich Chemical Co.),

0,00535 mg/ml linolénsavval (Sigma-Aldrich Chemical Co.),

1,25 mg/ml szarvasmarha szérum albuminnal (Sigma-Aldrich Chemical Co.),

1% penicillin/sztreptomicinnel (Sigma-Aldrich Chemical Co.),

2,5% Nu-szérummal (BD Biosciences, San Jose, CA, USA),

2,5% L-glutaminnal (Sigma-Aldrich Chemical Co.) és

1% 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsavval (HEPES; Sigma-Aldrich Chemical Co.). A sejteket párás környezetben, 37°C-on, 5% CO₂ tartalmú inkubátorban (MCO-18AIC CO₂ incubator, Sanyo Electric Co. Ltd; Sakata, Japán) 50 ml-es tenyésztő flakában (Soft Flow Hungary Kft., Pécs, Magyarország) tenyésztettük. A médiumot heti két-három alkalommal cseréltük és hét naponta szubkultúrát készítettünk. A sejteket 24, 48, 72 és 96 órán keresztül mitotánnal kezeltük (Chem Service, Inc., West Chester, PA, USA), 10⁻⁴M, 10⁻⁵M, 5×10⁻⁶M és 10⁻⁶ M koncentrációkon abszolút etanolban oldva. A kontroll csoporthoz azonos mennyiségű és koncentrációjú etanolt adtunk.

IV.1.2. Sejt viabilitás vizsgálatok

IV.1.2.1. MTT teszt

A sejtek metabolizmusának és életképességének a meghatározására MTT (metil-thiazol-tetrazolium) tesztet alkalmaztunk. A teszt alkalmazása során a sejtek mitokondriális dehidrogenázainak hatására az oldott MTT festék (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil-tetrazólium bromid, 5mg/ml, Sigma-Aldrich Chemical Co., Budapest, Magyarország) formazán kristállyá alakul, amelynek mennyisége DMSO-ban (Reanal, Budapest, Magyarország) történő oldás következtében spektrofotometriásan meghatározható.

Vizsgálataink során NCI-H295R sejteket 96-lyukú plate-re (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) kiültettük 1×10^4 sejt/lyuk denzitásban, komplett tápközegben. 48 órás inkubálást követően a táptalajt óvatosan eltávolítottuk, majd 10^{-4} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M koncentrációjú mitotánt tartalmazó tápközeg alkalmazásával a sejtenyészetet 24, 48, 72 és 96 órán keresztül újra inkubáltuk. Mivel a mitotán teljes oldása ethanolban történik, így az MTT teszt során kontrollként azonos mennyiségű etanollal kezelt sejteket használtunk. Az inkubálást követően 20 μ l MTT (5mg/ml, Sigma-Aldrich Chemical Co, Budapest, Magyarország) oldatot adtunk minden tenyészethez, majd további 24 órán keresztül inkubáltuk 37°C-os környezetben. Ezután a tápközeget lyukanként 100 μ l DMSO-ra (Reanal, Budapest, Magyarország) cseréltük, hogy feloldjuk a keletkezett formazán kristályokat. A megfelelő oldódás érdekében a plate-ket 15 percig rázóberendezésen rázattuk, majd az optikai denzitást spektrofotometriásan, Labsystem Multiscan Multisoft microplate leolvasó (Labsystem, Helsinki, Finnország) segítségével 540 nm-en mértük (az alkalmazott háttér hullámhossz 620 nm volt).

IV.1.2.1. Áramlási citometria vizsgálat

Az áramlási citometria (flow cytometry) a sejtek gyors, multiparaméteres vizsgálatára alkalmas laboratóriumi eljárás. A sejtek lézer fénnel történő gerjesztését követően a készülék a sejtfelszínről és a citoplazmatikus alkotórészekről szóródó, ill. a fluoreszcens festékek által emittált fényt detektálja. Ennek megfelelően lehetőség van a fluoreszkáló festékkel jelölt sejtek szétválasztására és elkülönítésére.

Munkám során az NCI-H295R sejteket 12-lyukú plate-re (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) ültettük ki $1,5 \times 10^5$ sejt/lyuk sűrűségben, komplett tápközegben. 48 órás inkubáció után a tápközéget 10^{-4} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M és 10^{-6} M koncentrációjú mitotán tartalmú tápközegre cseréltük, majd 24, 48, 72 és 96 órán keresztül újra inkubáltuk a tenyészetet. Kontrollként azonos mennyiségű etanollal kezelt sejteket használtunk. Ezt követően a sejteket 0,5 g/L koncentrációjú tripszinnel (Sigma-Aldrich Chemical Co.) kezeltük, majd lyukanként 300 μ l PBS-ben összegyűjtöttük. A mérések FACSCalibur típusú áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) történtek, mérésenként legalább 1×10^4 eseményt regisztráltunk. Az adatok elemzését CellQuest Pro™ Software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) segítségével elemeztük. A mérés alatt detektált élő és elpusztult sejtek méretét az előre irányuló fényszórás (forward scatter, FSC) segítségével, granuláltságát, pedig az oldalra irányuló fényszórás (side scatter, SSC) alapján különböztettük meg [85].

IV.1.3. Szteroidhormon szintek meghatározása

A szteroidhormon mérésekhez NCI-H295R sejteket 12-lyukú plate-re (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) helyeztük $1,5 \times 10^5$ sejt/lyuk denzitásban, komplett tápközegben. 48 órás inkubációt követően a sejteket mitotánnal kezeltük 10^{-6} M koncentráción, majd 24, 48, 72 és 96 órán keresztül a tenyészetet ismét inkubáltuk. A felülúszó segítségével két hormont, a kortizol és az androsztendion szint mérését végeztük el.

A kortizol szint meghatározása Elecsys Immunoanalyser System (Roche Diagnostics Ltd, Basel, Svájc) segítségével történt, Roche Cobas kortizol elektrokemilumineszcens immunoassay (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) alkalmazásával. Az androsztendion szint azonosítását Androstenedione Radioimmunoassay Kit (DiaSorin SPA, Saluggia, Olaszország) használatával valósítottuk meg a gyártó utasításai alapján.

IV.1.4. RNS izolálás

Összesen 2×10^6 számú NCI-H295R sejt mitotános (5×10^{-6} M) és etanos (kontroll csoport) kezelése után Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével teljes RNS izolálást végeztünk, a gyártó előírása alapján.

Mivel a minták ezt követően microarray vizsgálatban kerültek felhasználásra, így a tiszta, DNS-mentes RNS minták kinyerése érdekében RNase-Free DNase Set (Qiagen GmbH, Hilden, Németország) segítségével oszlopos DNáz emésztést végeztünk, a gyártó utasítása szerint.

Az RNS koncentráció meghatározásához NanoDrop 1000 Spektrofotométert (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) használtunk, míg az RNS-integritásának mérése Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) segítségével történt. A kinyert RNS mintákat csak abban az esetben alkalmaztuk további microarray és qRT-PCR vizsgálatokban, amennyiben az RNS integritás száma (RIN) 8.0 feletti, az A260/280, illetve az A260/230 aránya elérte az 1.8-at és DNS kontaminációtól mentes volt.

IV.1.5. mRNS expressziós profil meghatározása

Munkánk során összesen 16 független NCI-H295R (4 minta 48 órán át etanol-kezelt (48h kontroll), 4 minta 72 órán át etanol-kezelt (72h kontroll), 4 minta 48 órán át mitotán-kezelt (48h mitotán) és 4 minta 72 órán át mitotán-kezelt (72h mitotán)) minta mRNS expressziós mintázatát vizsgáltuk. Az mRNS expressziós profil meghatározása 4×44K Agilent Whole Human Genome Microarray (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA) lemezek segítségével történt. Az expresszió detektálására egyszínű fluoreszcens festékkel (Cy3) jelölt RNS-t alkalmaztunk.

200 ng teljes RNS-t amplifikáltuk és Cy3 festékkel jelöltük Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies Inc.) segítségével a gyártó utasításai szerint. A továbbiakban a jelölt RNS-eket Qiagen RNeasy Kit alkalmazásával megtisztítottuk, majd a protokoll szerint az 1650 ng jelölt RNS-hez a Gene Expression Hybridization Kit (Agilent Technologies Inc.) segítségével hibridizációs mixet készítettünk. Ezt követően a minták Agilent Whole Human Genome Microarray (Agilent Technologies Inc.) lemezekre történő hibridizálását végeztük 65°C-on, 17 órán keresztül a gyártó utasítása alapján. A hibridizációt követően a microarray lemezeket Gene Expression Wash Buffer (Agilent Technologies Inc.) pufferekkel mostuk, s az eredményeket Agilent DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies Inc.) segítségével olvastuk le. Az eredmények elemzését Feature Extraction 9.5.3 (Agilent Technologies Inc.) szoftverrel végeztük, majd exportáltuk. GeneSpring Software 10.1 (Agilent Technologies Inc.)

használatával a nyers (raw) szignál értékek 75. percentilisére normalizáltuk, majd a gyártó utasításait követve az alapvonalat (baseline) az egyes array-k mediánjára transzformáltuk. Az adatok statisztikai elemzése előtt a microarray eredmények kiértékelésénél általánosan elfogadott szűrési kritériumokat állítottunk fel: 100% "marginális flag" vagy "present" alkalmazása legalább egy vizsgált csoportban, illetve a "fold change" >2 használata a mitotánnal kezelt és a kontroll sejtkultúrák között. A szűréseket követően a RNS-ek normalizált szignálintenzitás értékeit hierarchikus klaszter elemzésnek vetettük alá GeneSpring Software 10.1. (Agilent Technologies Inc.) alkalmazásával.

IV.1.6. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA, Géncsoport dúsulás vizsgálat)

A GSEA egy olyan bioinformatikai módszer, amellyel az adott két génkészlet (gene set) finom expressziós különbségei is meghatározhatók. A program a génkészletek közötti expressziós különbségek alapján egy rangsorolt génlistát készít, a géneket génextpressziós értékük alapján sorrendbe állítja. A génlista tartalmazza a legnagyobb mértékben felülexpresszált és a legnagyobb mértékben alulexpresszált géneket egyaránt [86].

Elemzéseink során a GSEA Software v2.0 (www.broad.mit.edu) segítségével arra kerestük a választ, hogy az összehasonlított (48 órás kontroll versus 48 órás mitotánnal kezelt, valamint 72 órás kontroll versus 72 órás mitotánnal kezelt) mintapárokban a gének expressziós növekedést, illetve expressziós csökkenést mutatnak-e. A GSEA során a Gene Ontology (GO) kategóriáknak a vizsgált csoportokban való felül- vagy alulreprezentáltságát "c5 Gene Ontology" géncsoportok használatával azonosítottuk. A statisztikai elemzés során a permutációk génlista alapúak voltak, a permutációs szám értéke 1000 volt. A szignifikancia szintet $p < 0.05$ és False Discovery Rate (FDR) < 0.125 -höz állítottuk be. A géneket akkor tekintettük további vizsgálatra alkalmasnak, ha szignifikánsan alul- és felülexpresszáltak voltak.

IV.1.7. QRT- PCR vizsgálatok

A microarray vizsgálatok során azonosított, szignifikáns expressziós eltérést mutató gének (n=7) validálása a csoportonkénti esetszám növelését követően (n=24)

kvantitatív, valós idejű (real-time) reverz transzkripció polimeráz láncreakció (qRT-PCR) módszerrel történt.

Első lépésben a teljes RNS mennyiségéből (10 ng/minta) High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével cDNS-t szintetizáltunk a gyártó által adott előírások szerint.

A qRT-PCR méréshez szükséges reakcióelegy a hígított cDNS-en kívül TaqMan Gene Expression Assay Mixet (Applied Biosystems) és RNáz mentes vizet tartalmazott, majd TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems) felhasználásával a végtérfogat 20 μ l lett, a gyártó által megadott protokollnak megfelelően. A méréseket 96-lyukú plate-en, három párhozamos reakció futtatásával végeztük 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Szingapúr) készüléken az előírt időtartamok és hőmérsékletek alkalmazásával.

Az alábbi génekre specifikus TaqMan Gene Expression Assay-eket alkalmaztuk: *HSD3B1* (00426435), *HSD3B2* (00605123), *CYP21A2* (00365734), *GDF-15* (00171132), *ALDH1L2* (004028769), *SERPINE2* (00385730), *TRIB3* (01082394), (minden termék Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Microarray tanulmányunkban a legkisebb változási érték különbség és a szórástényező vizsgálata alapján a *ZNF625* (00377010) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) gént találtuk a legalkalmasabb referencia (housekeeping) génnek. A kapott eredményeket a komparatív C_T -módszer segítségével értékeltük ki. A vizsgált gének és a referencia gén közötti eltérésekből megállapítottuk a relatív expressziót (ΔCT), majd az egyes csoportok közötti eltéréseket a comparative CT ($\Delta\Delta CT$) módszerrel határoztuk meg (SDS Program, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) [87].

IV.1.8. Statisztikai elemzés

A microarray adatok statisztikai elemzését GeneSpring Software 10,1-el (Agilent Technologies Inc.) végeztük. A microarray analízis során a génexpressziók változásai közötti különbségek kimutatásához kétutas ANOVA módszert és Tukey-féle post hoc tesztet használtunk ($p < 0.05$), majd Benjamini-Hochberg módszerrel False Discovery Rate-et ($FDR < 0.25$) számoltunk.

A viabilitás vizsgálat, a szteroidhormon szint meghatározás és qRT-PCR adatok statisztikai elemzése során Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond,

WA, USA) és Statistica 8,0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftvereket alkalmaztunk. A qRT-PCR adatokat kétutas ANOVA módszerrel és Tukey-féle post hoc teszttel elemeztük ($p < 0.05$).

IV.2. A mikroRNS-ek által befolyásolt patogenetikai útvonalak bioinformatikai elemzése

IV.2.1. Adatkészletek

Felnőtt ép mellékvesék, ACA és ACC miRNS expressziós adatait öt vizsgálatból gyűjtöttük össze [2, 58-61]. ACC-ben, ACA-hoz és N mellékveséhez viszonyítva, összesen 631 miRNS-t vizsgáltunk, melyből 305 miRNS felülexpresszált, 326 miRNS alulexpresszált volt.

A legnagyobb miRNS számú, Schmitz és mtsai. [60] által végzett tanulmányban 197 felülexpresszált és 259 alulexpresszált miRNS-t vizsgáltunk. A felülexpresszált miRNS-ek közül 124 miRNS-t ACA-ACC, 73 miRNS-t N-ACC összehasonlításban azonosítottunk. Az alulexpresszált miRNS-ek között 197 miRNS-t ACA-ACC, míg 62 miRNS-t N-ACC vonatkoztatásában identifikáltunk. Özata és mtsai. [61] vizsgálatában 77 felülexpresszált (38 miRNS ACA-ACC, 39 miRNS N-ACC egybevetésben) és 20 alulexpresszált miRNS-t (17 miRNS ACA-ACC, 3 miRNS N-ACC hasonlításban) azonosítottunk. Soon és mtsai. kísérlete alapján [58] összesen 14 felülexpresszált (14 miRNS ACA-ACC összevetésben) és 11 alulexpresszált miRNS-t (9 miRNS ACA-ACC, 2 miRNS N-ACC vonatkoztatásban), míg Patterson és mtsai. [59] tanulmányában 10 felülexpresszált (5 miRNS ACA-ACC, 5 miRNS N-ACC egyeztetésben) és 30 alulexpresszált miRNS-t (18 miRNS ACA-ACC, 12 miRNS N-ACC párhuzam vonásában) analizáltunk. Saját vizsgálatunkban [2] 7 felülexpresszált (3 miRNS ACA-ACC, 4 miRNS N-ACC viszonyításban) és 6 alulexpresszált miRNS-t (2 miRNS ACA-ACC, 4 miRNS N-ACC hasonlításban) elemeztünk. Az említett vizsgálatokat szakirodalom alapján azonosítottuk (PubMed, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

Ezeket a nyers miRNS expressziós adatokat a következő módon csoportosítottuk: az ACA fokozott kifejeződésű miRNS-ei versus ACC fokozott kifejeződésű miRNS-ei, az ACA csökkent kifejeződésű miRNS-ei versus ACC csökkent kifejeződésű miRNS-ei, ép mellékvese fokozott kifejeződésű miRNS-ei versus

ACC fokozott kifejeződésű miRNS-ei, valamint ép mellékvese csökkent kifejeződésű miRNS-ei versus ACC csökkent kifejeződésű miRNS-ei. A további vizsgálatokban legalább 2 tanulmányban szereplő miRNS-eket használtuk (**1. táblázat**).

	Közös miR-ek	Tanulmányok
felülexpresszált ACC-ben, ACA-ACC alapján	miR-106b	[58, 61]
	miR-127-3p	[60, 61]
	miR-130b	[58, 60]
	miR-135a	[58, 60]
	miR-136	[60, 61]
	miR-148b	[58, 60]
	miR-184	[2, 60]
	miR-210	[2, 60, 61]
	miR-376c	[60, 61]
	miR-410	[60, 61]
	miR-424	[60, 61]
	miR-432	[60, 61]
	miR-450a	[58, 60]
	miR-483-5p	[58, 59, 60, 61]
	miR-487b	[60, 61]
	miR-503	[2, 58, 60, 61]
	miR-506	[60, 61]
	miR-542-3p	[58, 60]
	miR-542-5p	[58, 60]
	miR-642	[59, 60]
alulexpresszált ACC-ben, ACA-ACC alapján	miR-101	[60, 61]
	miR-125b	[59, 60]
	miR-195	[58, 59, 60, 61]
	miR-199a-3p	[60, 61]
	miR-199a-5p	[60, 61]
	miR-202	[58, 61]
	miR-214	[2, 59, 60, 61]
	miR-335	[58, 60]
	miR-497	[60, 61]

	miR-511	[2, 60]
	miR-557	[58, 60, 61]
	miR-572	[60, 61]
	miR-600	[59, 60]
	miR-617	[58, 60]
	miR-647	[58, 60]
	miR-708	[58, 60]
	miR-99a	[60, 61]
	miR-let-7b	[59, 60]
felülexpresszált ACC-ben, N-ACC alapján	miR-127-3p	[60, 61]
	miR-184	[2, 60]
	miR-210	[60, 61]
	miR-424	[60, 61]
	miR-432	[60, 61]
	miR-483-5p	[60, 61]
	miR-487b	[60, 61]
	miR-503	[2, 60]
alulexpresszált ACC-ben, N-ACC alapján	miR-214	[2, 60]
	miR-375	[2, 60]
	miR-511	[2, 60]

1. táblázat: *Legalább 2 tanulmányban szereplő, felül- és alulexpresszált közös miR-ek ACA és ACC, illetve N és ACC összehasonlításban. N: ép mellékvese, ACA: mellékvesekéreg adenoma, ACC: mellékvesekéreg carcinoma.*

Felnőtt ép mellékvesék, ACA és ACC mRNS expressziós adatait három vizsgálatból gyűjtöttük össze [2, 24, 25].

IV.2.2. Szövetspecifikus miRNS target predikció

Az ép mellékvese és a mellékvesekéreg carcinomák, valamint a mellékvesekéreg adenomák és a mellékvesekéreg carcinomák közötti, legalább 2 tanulmányban szignifikánsnak bizonyult miRNS-ek lehetséges mRNS célpontjait különböző

számítógépes target predikciós algoritmusok segítségével azonosítottuk. A predikció során az egyes algoritmusok az eltérő szempontokat különböző súllyal veszik figyelembe. Mivel az egyes target predikciós adatbázisok preferenciája nem egyértelmű, így az elemzésünk során a legszélesebb körben használt algoritmusokat alkalmaztuk [88-92].

Az ép mellékvese és a mellékvesekéreg daganatok között miRNS-ek potenciális mRNS célpontjainak azonosításához három web alapú algoritmust, név szerint a TargetScan 5.2-t (<http://www.targetscan.org>), Pictart (<http://pictar.org>) és a MicroCosm Targets-et (www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5) használtuk.

A target predikciós algoritmusok eredményeit egy saját, Java programnyelvű szoftver segítségével egyesítettük. A szoftver képes azonosítani az adott mRNS összes prediktált target miRNS-ét, valamint jelölni a két vagy több adatbázisban egymást átfedő mRNS targeteket. A szoftver által kapott eredmény tartalmazza az elemzett mikroRNS-ek összes mRNS targetjét, valamint a külön-külön megjelölt, egymást átfedő összes mRNS targetet.

A szövetspecifikusság eléréséhez az mRNS expressziós tanulmányok eredményeit a miRNS adatokkal párhuzamosan vizsgáltuk. Először azokat a nem expresszáldott mRNS-eket szűrtük ki a target listáról, melyek egyik csoportban sem expresszáldtak, mivel ezek nem lehetnek a miRNS alapú reguláció célpontjai. Ezt követően a Gene Set Enrichment analízist (GSEA, Broad Institute, Cambridge, MA, USA; www.broad.mit.edu) alkalmaztunk Leading Edge-Analysis (LEA) megközelítéssel azon mRNS-ek felderítéséhez, melyeknek szabályozó miRNS-ei a saját inverz expressziós változatai. A GSEA egy olyan számítási módszer, amelyet a hagyományos microarray statisztikai megközelítések számára kimutathatatlan, kisebb génexpressziós eltérések elemzésére fejlesztettek ki. A GSEA azt határozza meg, hogy a felhasználó által megadott génkészlet statisztikailag szignifikáns, egybehangzó különbséget mutat-e két minta készlet között. A GSEA a génexpressziós adatokat rangstatisztikák alapján elemzi, s meghatározza, hogy a génkészlet felül- vagy alulexpresszált-e az összehasonlított mintákban [86].

A GSEA elemzés során azon géncsoport permutációját vettük alapértelmezésként, melynek a permutációs szám értéke 1000, statisztikai szignifikancia szint p -érték alapján <0.05 , a hamis találati arány (FDR) pedig <0.25 volt.

IV.2.3. Útvonalelemzés

GSEA módszerrel szűrt, szövetspecifikus miRNS célpontokon az útvonalelemzést Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 7.1 szoftver segítségével végeztük (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA; www.ingenuity.com). Az útvonalelemzés alkalmazásával lehetőségünk van a génexpressziós változások molekuláris hálózatba való beillesztésére.

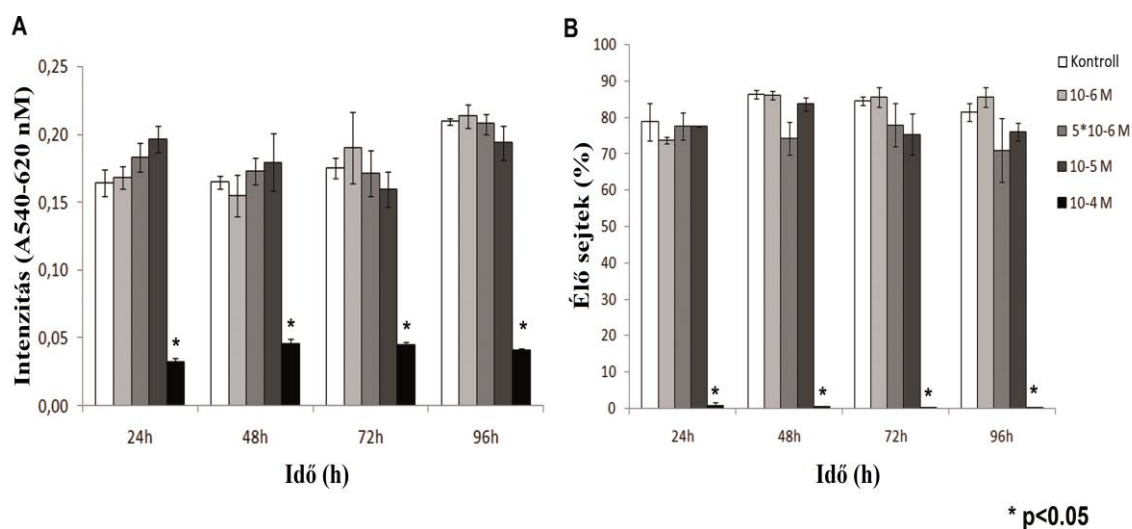
Ingenuity Pathway Analysis Knowledge Base (Ingenuity Systems, Redwood City, CA, USA; www.ingenuity.com) egy olyan útvonalakat tartalmazó adatbázis, amely a különböző fehérjék és a különböző gének közötti kapcsolatokat vizsgálja. Ezek a kapcsolatok minden esetben az irodalomban található adatokkal vannak alátámasztva. Az útvonalelemzés első lépéseként a szoftver a felhasználó által megadott génlistákat egy algoritmus vizsgálatnak veti alá. A vizsgálat során a szoftver eldönti, hogy az adott génlisták milyen mértékű szignifikanciát mutatnak az IPA útvonalaival. A következő lépésben egy statisztikai elemzés arra adja meg a választ, hogy a felhasználó által megadott génlista és a kapott hálózat közötti átfedés mekkora eséllyel jöhet létre véletlenszerűen. Amennyiben az átfedés szignifikáns ($p < 0.05$), úgy a véletlenszerűség statisztikailag elhanyagolható.

V. EREDMÉNYEK

V.1. A mitotán teljes genom génexpressziós hatásainak vizsgálata

V.1.1. Sejt viabilitás vizsgálatok

A mitotán kezelés NCI-H295R sejtekre való hatását két különböző viabilitás vizsgálattal állapítottuk meg: MTT teszttel, amely elsősorban a sejtek metabolizmusának és életképességének indexét jelöli [93] és áramlási citometriás mérésrel, amely az élő és az elpusztult sejtek arányát határozza meg [94]. A 10^{-5} , 5×10^{-6} és 10^{-6} M koncentrációjú mitotán kezelésnek nem volt szignifikáns hatása a sejtek életképességére 24, 48, 72 és 96 órás inkubációs idő után sem. Azonban a mitotán 10^{-4} M koncentrációban drasztikusan csökkentette a sejtek életképességét ($p < 0.05$). A sejtek életképességének csökkenését mindkét vizsgálattal azonos mértékben detektáltuk (3. ábra).



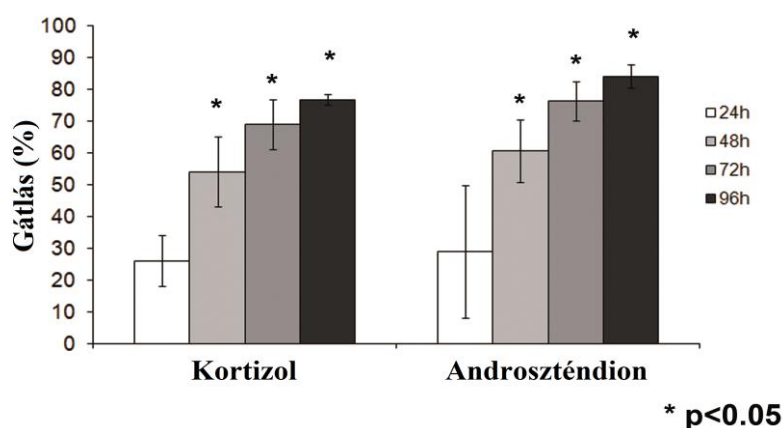
3. ábra: Az NCI-H295R sejtek viabilitás vizsgálat eredményei 10^{-4} , 10^{-5} , 5×10^{-6} és 10^{-6} M koncentrációjú mitotán kezelés hatására.

(A) MTT teszt ($n=7$)(* $p < 0.05$)

(B) Áramlási citometriás vizsgálat ($n=3$)(* $p < 0.05$).

V.1.2. Szteroidhormon szintek meghatározása

Az NCI-H295R sejtek különböző szteroidhormonokat (mineralokortikoidokat, glükokortikoidokat és androgén hormonokat) szekretálnak [95-97]. A mitotán hormonszekréciónra kifejtett hatását a kortizol (glükokortikoid) és az androszténdion (androgén) hormon szintek mérésével vizsgáltuk a kontroll és a mitotán kezelt sejteken 24, 48, 72 és 96 órás inkubációs időtartamnál. Megfigyeléseink, s korábbi tanulmányok alapján [98, 99] 5×10^{-6} M mitotán kezelési koncentrációt választottunk ki további vizsgálatainkhoz, mivel ez a koncentráció hatékonyan képes gátolni a hormonszekréción a sejtek életképességének befolyásolása nélkül. A **4. ábrán** jól látható, hogy az 5×10^{-6} M koncentrációjú mitotán egyaránt hatékonyan gátolta a kortizol és az androszténdion szekréción.



Kortizol (µg/µl)	24h	48h	72h	96h
Kontroll átlag ± szórás:	0.058 ± 0.014	0.166 ± 0.009	0.297 ± 0.021	0.419 ± 0.017
Mitotán kezelt átlag ± szórás:	0.052 ± 0.010	0.065 ± 0.012	0.073 ± 0.013	0.098 ± 0.009

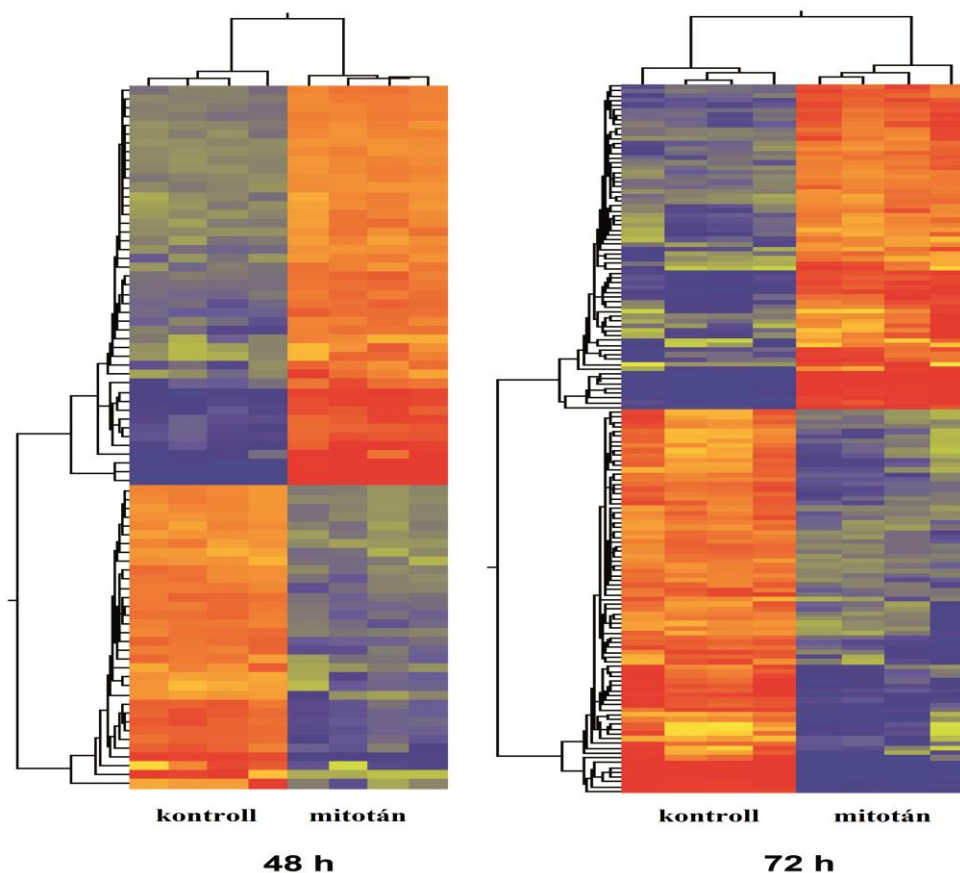
Androszténdion (µg/µl)	24h	48h	72h	96h
Kontroll átlag ± szórás:	59 ± 9	227 ± 6	523 ± 13	957 ± 103
Mitotán kezelt átlag ± szórás:	33 ± 8	75 ± 9	100 ± 7	150 ± 18

4. ábra: 5×10^{-6} M mitotán kezelési koncentrációjának hatása a kortizol és az androszténdion szekréciónra 24, 48, 72 és 96 órás inkubációs kezelési időtartamnál ($n=5$) és (* $p < 0.05$).

V.1.3. Microarray elemzés

A szteroidhormon vizsgálatok több mint 50%-os hormonszintézis gátlás eredménye alapján a további génexpressziós analízishez 48 és 72 órás kezelési periódusokat választottunk ki. A korábbi, NCI-H295R sejteket vizsgáló tanulmányokban a proliferációs gátlás szintén 48. órában kezdődött el [95, 100, 101]. A mitotán intracelluláris felhalmozódása is időfüggőnek tűnik, csúcsertékét 24 óránál éri el [100].

A microarray analízishez összesen 16 független mintát választottunk ki. 4 minta 48 órás etanol-kezelt (48h kontroll), 4 minta 72 órás etanol-kezelt (72h kontroll), 4 minta 48 órás mitotán-kezelt (48h mitotán) és 4 minta 72 órás mitotán-kezelt (48h mitotán) volt. A kísérleti csoportok hierarchikus klaszterezését az expressziós profilok hasonlóságai alapján végeztük. Az **5. ábrán** jól látható, hogy a microarray adatokon elvégzett hőtércép (Heat Map cluster) elemzés egyértelműen kimutatta a kontroll és a mitotánnal kezelt csoport génexpressziós mintázat határozott elkülönülését mind 48, mind 72 órában.



5. ábra: Génexpressziós adatok hierarchikus klaszter analízise.

A 48 és 72 órás etanol- és mitotán-kezelt 16 NCI-H295R minta (csoportonként 4-4) mRNS microarray eredményeinek hő térkép ("heatmap") elemzése. A microarray eredmények szűrési kritériumai a 100% "marginális flag" vagy "present" alkalmazása és a "fold change">2 használata volt. Hierarchikus klaszterelemzés GeneSpring Software 10.1. segítségével történt. A piros szín az expresszió fokozódását, a kék az expresszió csökkenését jelöli.

Több mint kétszeres expressziós változással, összesen 117 szignifikánsan kifejeződő gént azonosítottunk a 48 órás és a 72 órás mitotánnal kezelt csoportokban ($p < 0.05$), a megfelelő kontroll csoportokhoz viszonyítva ($p < 0.05$). Ezen eredmények alapján a 48 órás kezelt mintáknál 63 ($p < 0.05$) (**melléklet 1. táblázat**), a 72 órás mintáknál 111 szignifikánsan eltérően kifejeződő gént detektáltunk ($p < 0.05$) (**melléklet 2. táblázat**). A kontroll és a mitotán-kezelt minták összehasonlítása során 45 közös gént találtunk a 48 és a 72 órás kezelt csoportokban. A 48 órás mitotán-kezelt és kontroll mintákban 18 gént, a 72 órás mitotán-kezelt és kontroll mintákban pedig 66 gént sikerült azonosítani. A mitotán kezelés hatására, időfaktor nélkül a mintákban 60 szignifikánsan eltérően kifejeződő gént azonosítottunk Student t-próba módszer segítségével ($p < 0.05$) (**2. táblázat**). Ezek a gének a szteroidhormon bioszintézisben, a retinsav bioszintézisben és a lipid metabolizmusban is részt vesznek.

A GO kategóriák GSEA elemzése során az alulexpresszált gének száma a 48 órás kezelés hatására 36, a 72 órás kezelés hatására 124 volt. A felulexpresszált gének száma 48 órás kezelésnél 1, a 72 órás kezelés hatására 21 volt. Ezeknél a géneknél a lipid bioszintézis, a szteroid bioszintézis, a szteroid metabolikus folyamat és számos sejt ciklus folyamat (mint pl.: mitózis, M-fázis) alulexpresszáltasága volt közös (48 és 72 óránál egyaránt) (**melléklet 3. és 4. táblázat**).

A microarray vizsgálat alapján szignifikáns eltérést mutató gének azonosítása után 7 gént validáltunk qRT-PCR módszer segítségével. Mivel kutatásaink során a mitotánnak a szteroidhormon bioszintézisre való lehetséges hatásait szeretettük volna vizsgálni, így a validáláshoz a 3 legnagyobb változást mutató szteroidhormon bioszintézisben részt vevő, csökkent expressziójú gént választottuk. Így a 3 béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz/delta(5)-delta(4) izomeráz 1-es típusát (3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta(5)-delta(4) isomerase type 1, *HSD3B1*), a 3 béta-

hidroxiszteroid-dehidrogenáz/delta(5)-delta(4) izomeráz 2-es típusát (3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta(5)-delta(4)isomerase type 2, *HSD3B2*) és a 21 α -hidroxiláz 2-es típusát (21 α -hydroxylase type 2, *CYP21A2*) vizsgáltuk (**melléklet 1. és melléklet 2. táblázat**). Ezen kívül a 4 legnagyobb mértékű fokozott expressziós változást mutató gént, a növekedési és differenciációs faktor 15-t (growth differentiation factor 15, *GDF-15*), az aldehid dehidrogenázt (aldehyde dehydrogenase 1 family, member L2, *ALDH1L2*), a tribbles homológ 3-t (tribbles homolog 3, *TRIB3*) és a szerin peptidáz inhibitor (serpin peptidase inhibitor, clade E, member 2, *SERPINE2*) azonosítottuk (**2. táblázat**). A microarray eredményeket szintén felhasználtuk a qRT-PCR normalizáláshoz szükséges potenciális referencia gén kiválasztásához.

Gén	Fold change	Gén név
GDF15	9.08668583706024	növekedési és differenciációs faktor 15
ALDH1L2	6.83664280210577	aldehid dehidrogenáz 1, L2. tagja
TRIB3	5.28429148943683	tribbles homológ 3
SERPINE2	4.19577833019775	szerin peptidáz inhibitor 2-es típusa
SLC43A1	4.13754995355193	solute carrier 43 fehérje család 1. tagja
SNCAIP	3.69987270415477	synuclein
NUPR1	2.98561047913934	nukleáris fehérje 1
LOC283454	2.75251189801421	LOC283454 klón
ASNS	2.6869233851948	aszparagin szintetáz
PRPH	2.47399172534234	peripherin
PSAT1	2.34514358231207	foszfoszerin aminotranszferáz 1
PITPNC1	2.30883315933906	foszfatidilinositol transzfer protein 1
RASEF	2.27514172081005	RAS és EF-hand motívumot tartalmazó domén
PCK2	2.19087340705668	foszfoenolpiruvát karboxikináz 2
SMOX	2.1173346149218	spermin oxidáz
HRK	2.09684210693492	harakiri
ATF3	2.06151110815375	aktiváló transzkripció faktor 3
GAS5	2.05287165734988	growth arrest-specific 5
CCPG1	1.96429783002366	CCP8 mRNA
MYH7B	1.91983820171651	miozin, nehéz lánc 7B
PGM2L1	1.89515608025621	foszfo-glukomutáz 2
CBS	1.88203962069529	cisztation béta-szintetáz
FLJ22536	1.82311557776622	FLJ22536 klón
SLC1A5	1.77770017957099	solute carrier 1 fehérje család 5. tagja
PYCR1	1.7631393893556	pirrolin-5-karboxilát-reduktáz 1
DFNB31	1.73978935820508	süketség autoszomális recesszív 31

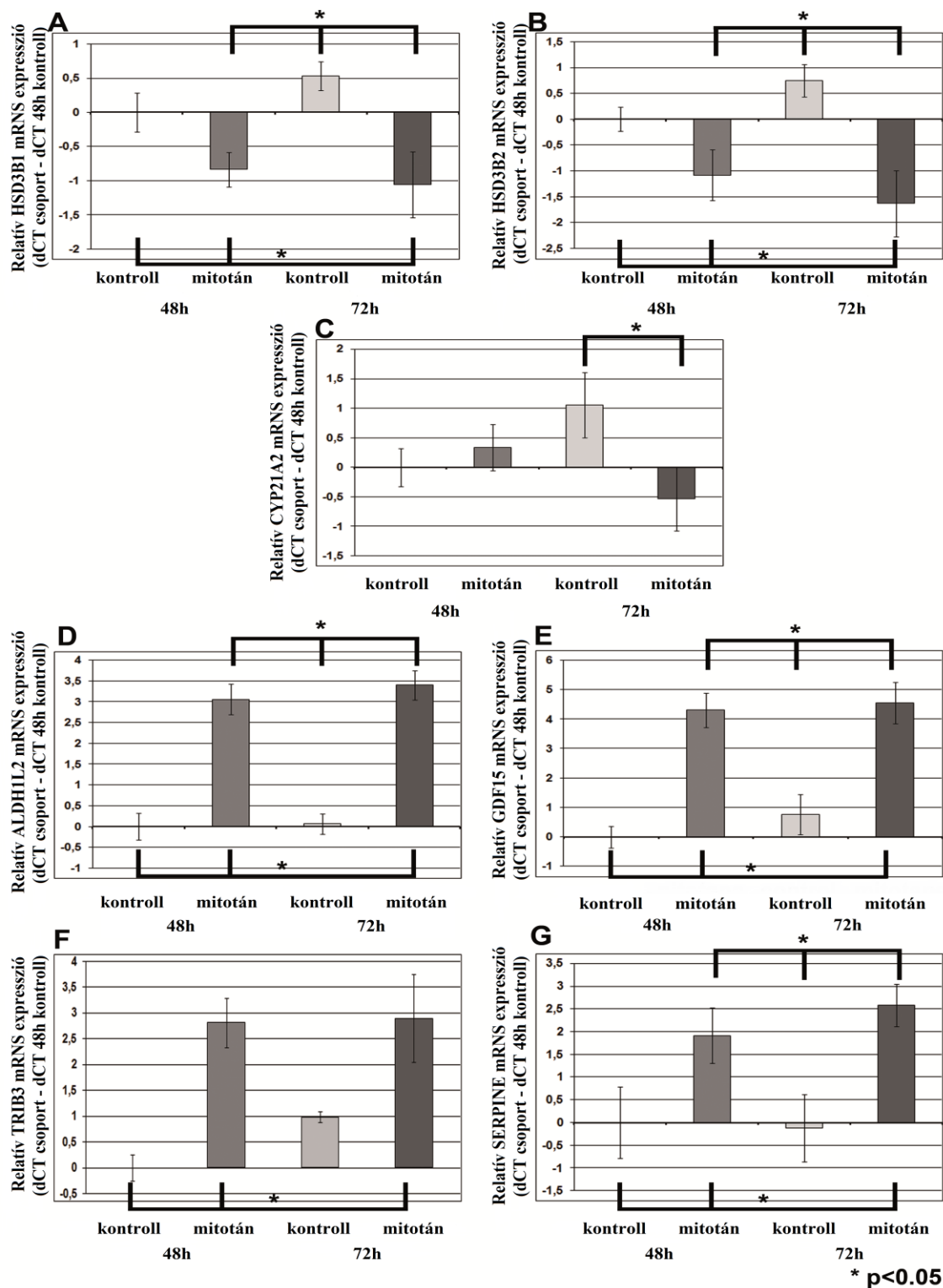
PCDHB10	1.61468408902454	protokadherin béta 10
NAV3	-1.5457526538346	neuron navigátor 3
FER1L5	-1.6450966781817	fer-1-like 5
AURKB	-1.7147717134034	aurora kináz B
APOC1	-1.7449140321965	apolipoprotein C-I
GALNTL4	-1.7643990209453	polipeptid N-acetylgalactosaminyltransferase 4
SULT2A1	-1.7873906282265	szulfotranszferáz család
FCN2	-1.7974379652853	ficolin
DENND1C	-1.8015400379557	DENN/MADD domént tartalmazó 1C
FGFR1	-1.8044841923658	fibroblaszt növekedési faktor receptor 1
ACVRL1	-1.8433444816446	aktivin A receptor II típus
VEGFC	-1.8482175999575	vaszkuláris endoteliáris növekedési faktor C
RNASE1	-1.8487997950663	ribonukleáz 1
AIM1L	-1.8634751494523	melanoma hiány 1
MMP15	-1.8761205485634	mátrix metallopeptidáz 15
FADS1	-1.8768458657201	zsírsav deszaturáz 1
KIAA1199	-1.8871501700216	KIAA1199
MVD	-1.9470466425389	mevalonát-dekarboxiláz
KCNB1	-1.9618559499618	feszültség-függő kalcium csatorna
IL22RA1	-1.9680622718496	interleukin 22
ABCA1	-1.9702775305358	ATP-kötő kazetta G1
TUBB4	-1.9805620282391	tubulin, béta 4
DPYSL3	-2.0733380117059	dihidropirimidináz 3
C21orf81	-2.1183284078571	21-es kromoszóma nyitott leolvasási keret 81
KCNN2	-2.1880472911224	kalcium-aktivát csatorna
LOC389895	-2.2093467838482	LOC389895 klón
TNNC2	-2.5970083992658	troponin C2
LILRB5	-2.606685951094	leukocita immunglobulin-szerű receptor
SLC22A15	-2.6433678393585	oldott anyag hordozó család 1
PTGS1	-2.7479919063536	prostaglandin-endoperoxidot szintetáz 1
GNRHR	-2.9334440997310	gonadotropin felszabadító hormon receptor
CDH22	-3.0046726036907	kadherin 22
FOXA2	-3.2955799035102	forkhead box A2
OLFML2B	-3.5535719865088	olfactomedin-like 2B

2. táblázat: A 60 szignifikánsan eltérően expresszálódó gén fold change alapján csökkenő sorrendben rendezett listája az időfaktor nélküli kontroll és mitotán-kezelt mintákban ($p < 0.05$).

V.1.4. A kiválasztott gének expressziójának validálása kvantitatív valós idejű PCR módszerrel

A microarray vizsgálatok által azonosított, szignifikáns expressziós különbséget mutató gének validálása a csoportonkénti esetszám kiterjesztését követően (n=24) kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció segítségével történt. A legkisebb változási érték (fold-change) különbség és a szórástényező vizsgálata alapján a feltételezett transzkripció faktor, a zinc finger protein 625 (*ZNF625*) bizonyult a legalkalmasabb referencia génnek. Korábbi tanulmányok igazolják, hogy a transzkripcióval kapcsolatos gének gyakran a legmegfelelőbb referencia gének [102]. Munkánk során a qRT-PCR által validált gének (*HSD3B1*, *HSD3B2*, *CYP21A2*, *GDF-15*, *ALDH1L2*, *TRIB3* és *SERPINE2*) expressziós változásai nagyfokú hasonlóságot mutatnak a microarray által mért értékekkel, bizonyítva ezzel az általunk kapott microarray eredmények megbízhatóságát (**6. ábra**).

Vizsgálataink során a *GDF-15*, az *ALDH1L2*, a *TRIB3* és a *SERPINE2* gének esetén a mitotánnal kezelt csoportok kontroll csoporthoz viszonyított expressziójának erőteljes növekedését azonosítottuk 48 órás és 72 órás kezelési időpontban is. A legnagyobb mértékben fokozott expressziós értéket a *GDF-15* mutatott 48 és 72 órás csoportokban egyaránt. A *TRIB3* gén felülexpresszálttsága szignifikáns volt a kontroll mintákhoz viszonyított 48 és 72 órás mitotán kezelt mintákban. A kontrollhoz viszonyított *HSD3B1* és *HSD3B2* gének csökkent expressziója jelentős volt a 48 és a 72 órás mitotánnal kezelt mintákban is. A *CYP21A2* csökkent expressziója a 72 órás csoportokban volt szignifikánsan eltérő.



6. ábra: A (A) *HSD3B1*, (B) *HSD3B2*, (C) *CYP21A2*, (D) *ALDH1L2*, (E) *GDF-15*, (F) *TRIB3* és (G) *SERPINE2* a *ZNF625* referencia génhez viszonyított, kvantitatív valós idejű PCR módszerrel validált eredményei (n=6), (* p<0.05), dCT: relatív cycle threshold.

V.2. A mikroRNS-ek által befolyásolt patogenetikai útvonalak bioinformatikai elemzése

V.2.1. Szövet-specifikus target predikció

Statisztikai elemzést követően, legalább két közölt vizsgálatban megtalált 39 különböző, szignifikánsan változó (alul- és felülexpresszált) miRNS-nek összesen 49817 mRNS molekuláját prediktáltuk célpontként. Mivel egyetlen mRNS-molekulát számos miRNS célozhat meg, ez valójában összesen 29079 különböző célpontot jelent. 23010 mRNS-t a TargetScan, 1771 mRNS-t a Pictar és 8913 mRNS-t a MicroCosm segítségével azonosítottunk.

V.2.2. Útvonalelemzés

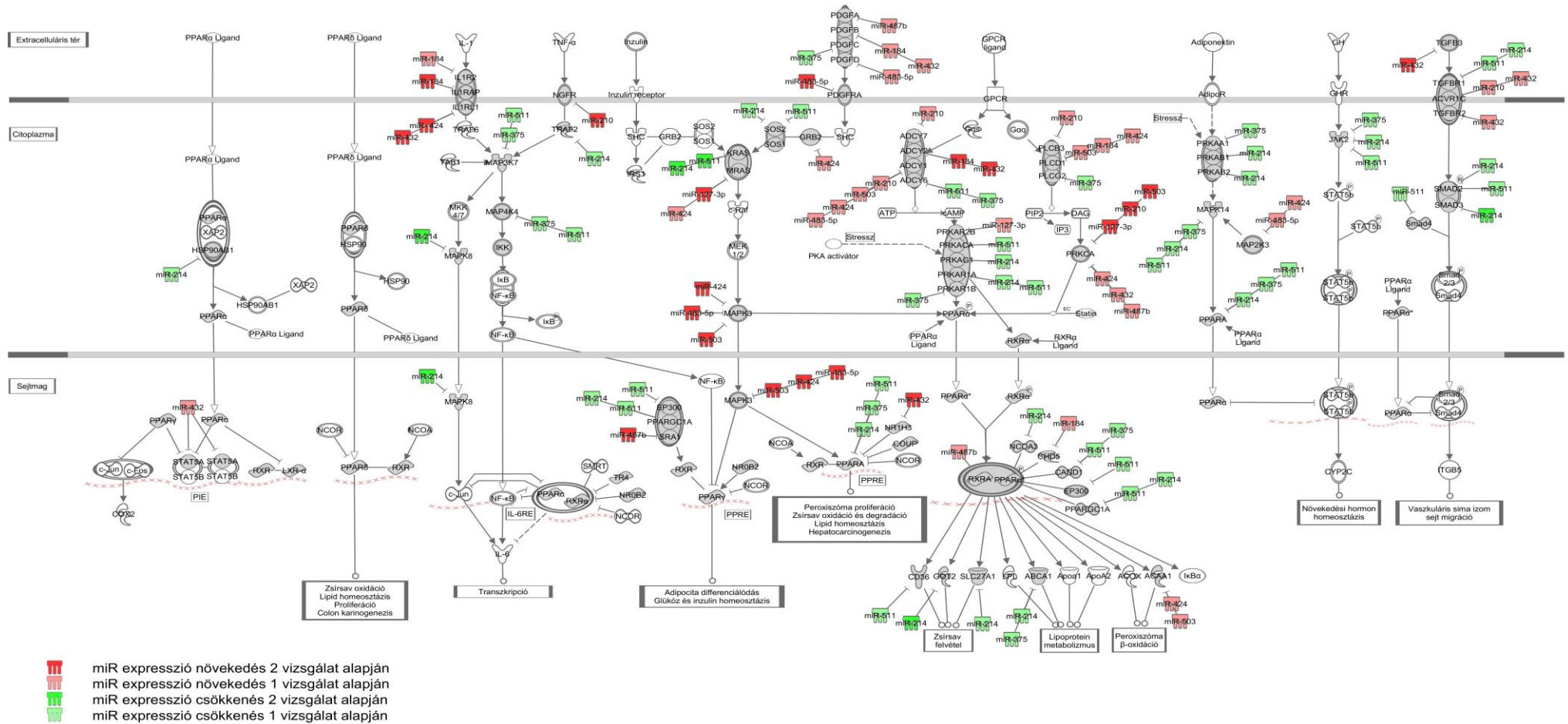
Az Ingenuity Pathway analízis segítségével összesen 820 olyan útvonalat sikerült azonosítanunk, amelyek a közös miRNS-ek által legalább két különböző vizsgálatban érintettek voltak. Ezek közül, a p-érték alapján ($p < 0.05$) 418 szignifikáns útvonalat identifikáltunk. Ezt követően, minden tanulmányban részt vevő útvonalak között ($n = 178$) ($p < 0.05$) megtaláltuk a retinsav jelátvitel, a sejtciklus szabályozás, az apoptózis, a sejtnövekedés, az intracelluláris jelátvitel, a sejtproliferáció és differenciálódás, valamint a humorális és celluláris immunválasz útvonalait (**melléklet 5. és 6. táblázat**).

A korábbi, munkacsoportunk által végzett metaanalízis vizsgálat alapján [43] ezen útvonalak közül összesen 12, a retinsav jelátvitelben és a sejtciklus szabályozásban részt vevő útvonalat választottuk ki a további elemzésünkhöz.

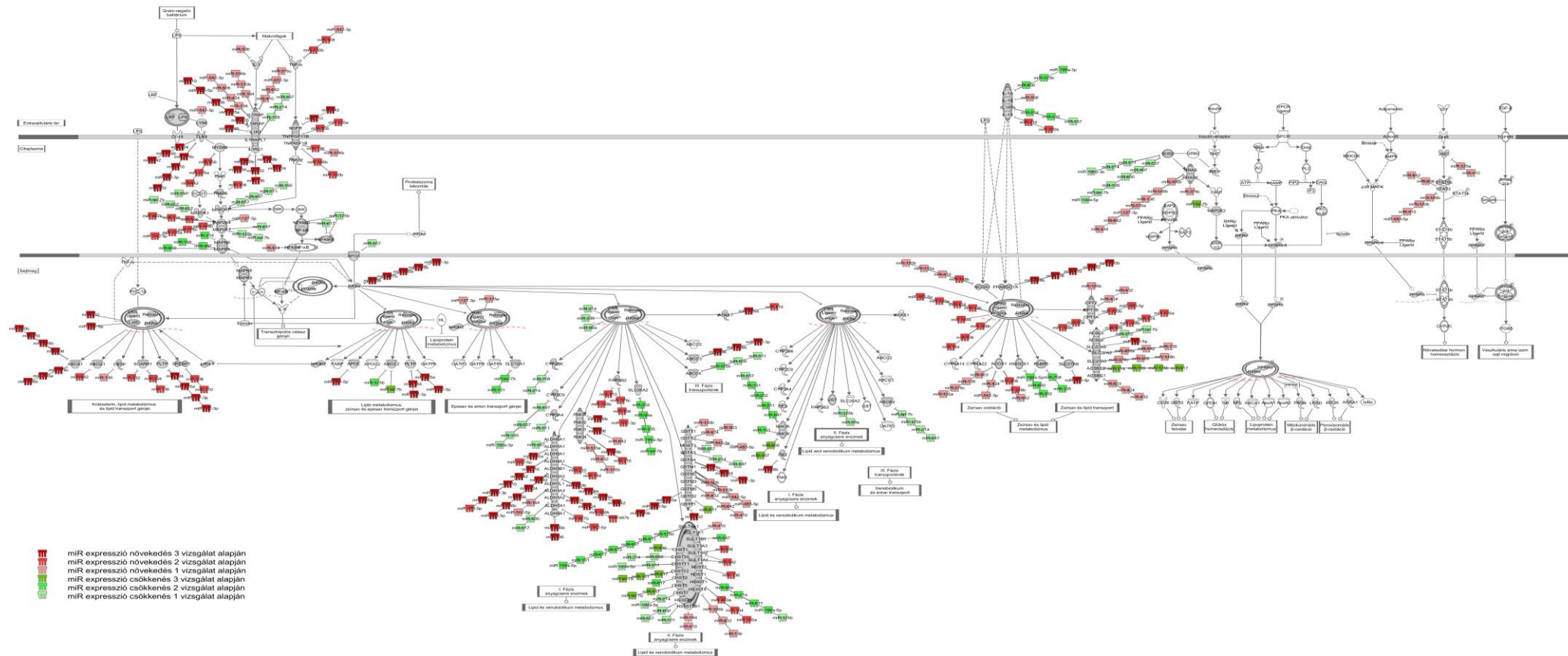
V.2.2.1. Retinsav jelátviteli útvonalak

A retinsav jelátvitelhez kapcsolódó ($p < 0.05$) útvonalak között az ép mellékvese és ACC összehasonlításban a peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor alfa/retinoid X receptor alfa (*PPAR α /RXR α*) és a peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor (*PPAR*) jelátviteli útvonalakat (**7. ábra**) azonosítottuk.

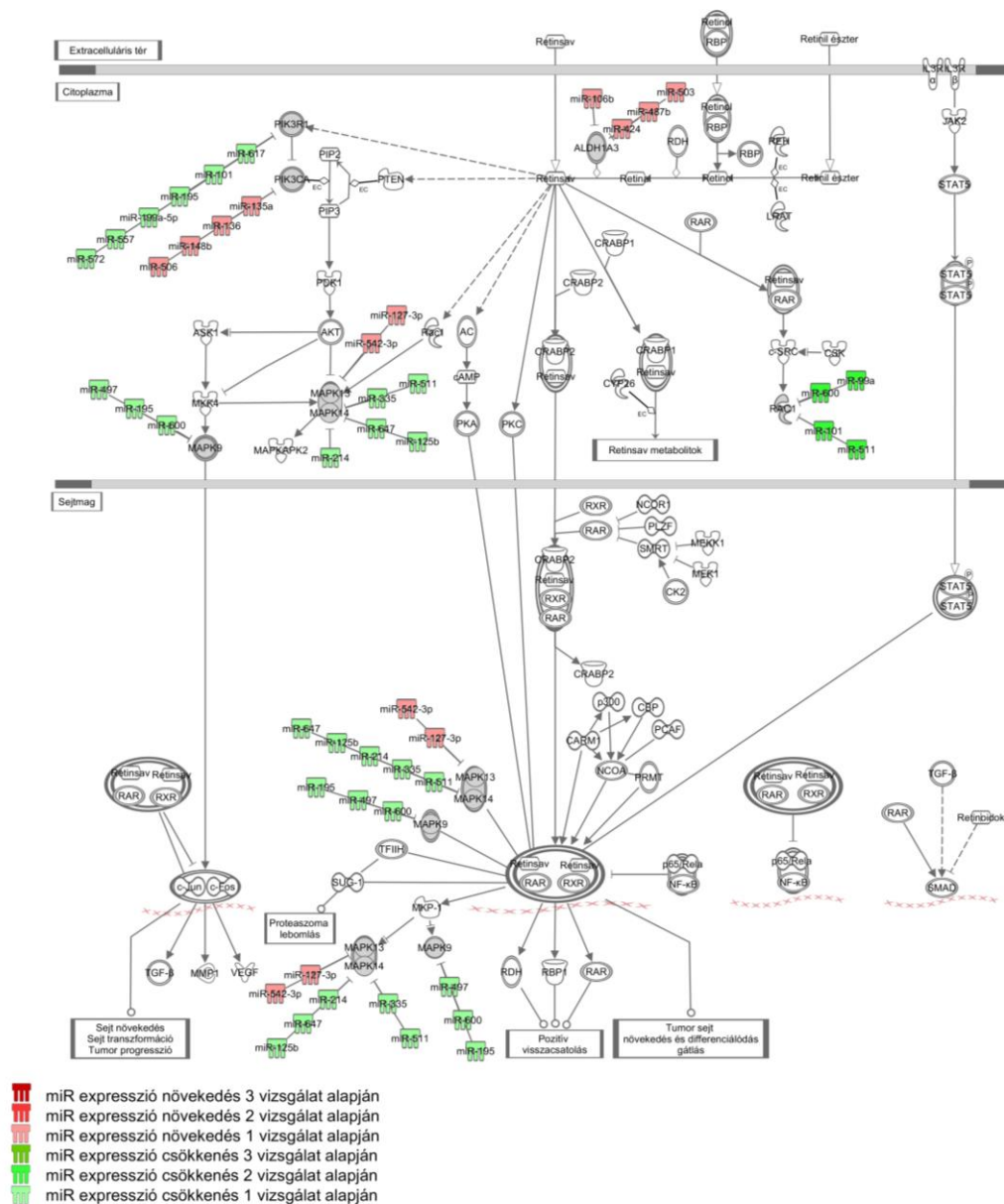
Az ACA és ACC összehasonlítás esetén a lipopoliszacharid/interleukin-1 (*LPS/IL-1*) által közvetített retinoid X receptor (*RXR*) funkció gátlás, a *PPAR α /RXR α* aktiválási (**8. ábra**) és a retinsav receptor (*RAR*) aktiválási útvonalakat identifikáltuk (**9. ábra**).



7. ábra: Az ép mellékvese és ACC mintacsoportok összehasonlításából adódó, miRNS-ekkel kiegészített peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor alfa/retinoid X receptor alfa (PPAR α /RXR α) és peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor (PPAR) jelátviteli útvonalak (p-érték<0.05).



8. ábra: Az ACA és ACC mintacsoportok összehasonlításából adódó, miRNS-ekkel kiegészített lipopoliszacharid/interleukin-1 (LPS/IL-1) által közvetített retinoid X receptor (RXR) funkció gátlás és a PPAR α /RXR α aktiválási útvonalai (p-érték<0.05).



9. ábra: Az ACA és ACC mintacsoportok összehasonlításából adódó, miRNS-ekkel kiegészített retinsav receptor (RAR) aktiválási útvonal (p -érték < 0.05).

V.2.2.1.1. PPAR α /RXR α és a PPAR jelátviteli útvonalak

Az ép mellékvese és ACC összehasonlításban, a mi szövetspecifikus target predikciós megközelítésünket alapul véve, mellékvesekéreg daganat esetén a PPAR α /RXR α és a PPAR jelátviteli útvonalak mRNS expressziós változásai kapcsolatban állhatnak a következő felülexpresszált miRNS-ekkel (két vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is

megtalálható, közös miRNS-ek: *miR-127-3p*, *miR-184*, *miR-210*, *miR-424*, *miR-432*, *miR-483-5p*, *miR-487b*, *miR-503*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (két vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is előforduló, közös miRNS-ek: *miR-214*, *miR-511* és egy vizsgált miRNS-mRNS interakcióban lévő, közös miRNS: *miR-375*) (**7. ábra**).

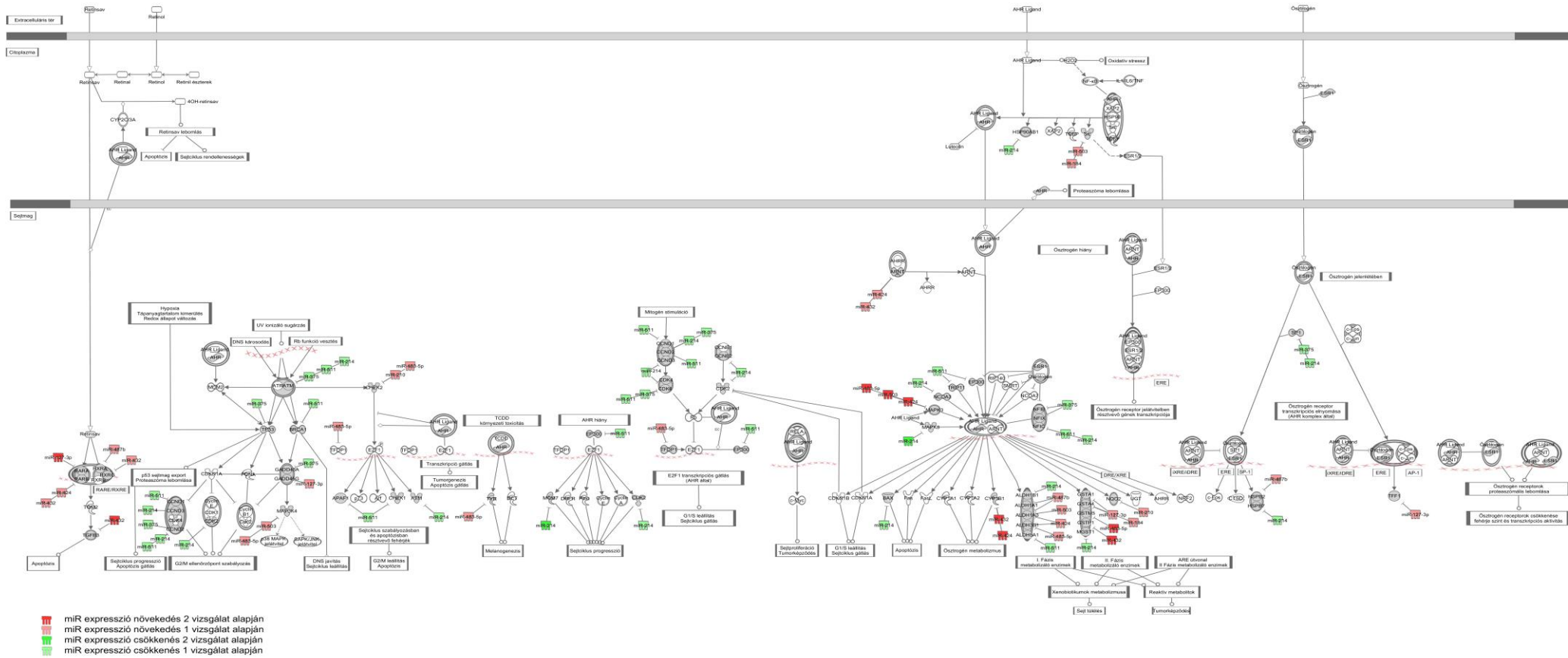
V.2.2.1.2. LPS/IL-1 által közvetített RXR funkció gátlás, a PPAR α /RXR α és az RAR aktiválási útvonalak

ACA és ACC összevetésben, mellékvesekéreg daganat esetén az LPS/IL-1 által közvetített RXR funkció gátlás, a PPAR α /RXR α és az RAR aktiválási útvonalak mRNS expressziós változásai összefüggésben lehetnek a következő felülexpresszált miRNS-ekkel (három vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is fellelhető, közös miRNS-ek: *miR-106b*, *miR-127-3p*, *miR-130b*, *miR-135a*, *miR-136*, *miR-148b*, *miR-184*, *miR-210*, *miR-376c*, *miR-410*, *miR-424*, *miR-432*, *miR-483-5p*, *miR-487b*, *miR-503*, *miR-506*, *miR-542-3p*, *miR-542-5p*, *miR-642* és két vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is megjelenő, közös miRNS: *miR-450a*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (három vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is megtalálható, közös miRNS-ek: *miR-let-7b*, *miR-101*, *miR-125b*, *miR-195*, *miR-214*, *miR-497*, *miR-557*, *miR-600*, *miR-617* és két vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is előforduló, közös miRNS-ek: *miR-199a-3p*, *miR-199a-5p*, *miR-202*, *miR-335*, *miR-511*, *miR-572*, *miR-647*, *miR-708*, *miR-99a*) (**8. ábra és 9. ábra**).

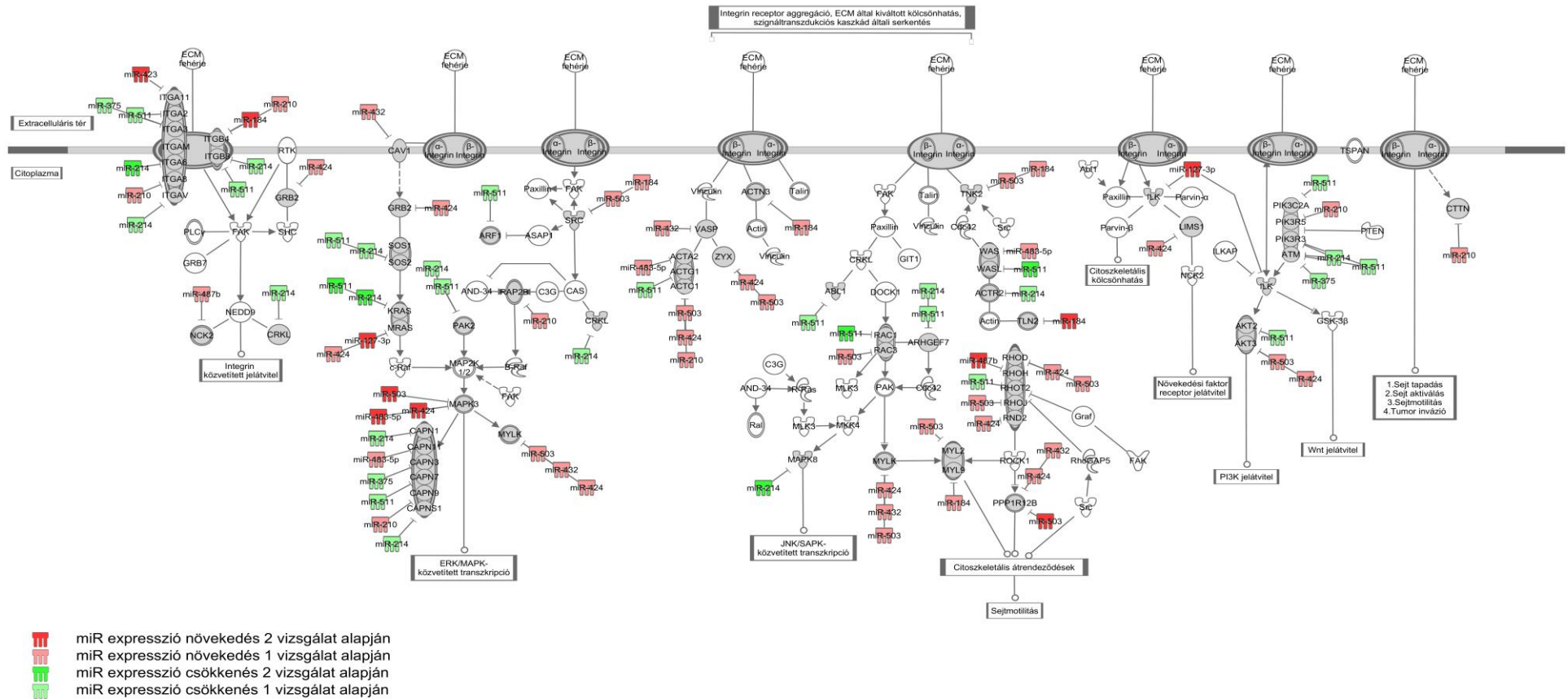
V.2.2.2. Sejtciklust szabályozó útvonalak

A sejtciklust szabályozó útvonalak ($p < 0.05$) között az ép mellékvese és ACC összehasonlítást alapul véve megtaláltuk az aril hidrokarbon receptor, a DNS károsodás indukálta 45 (*GADD45*) jelátviteli (**10. ábra**), valamint az integrin jelátviteli útvonalakat (**11. ábra**).

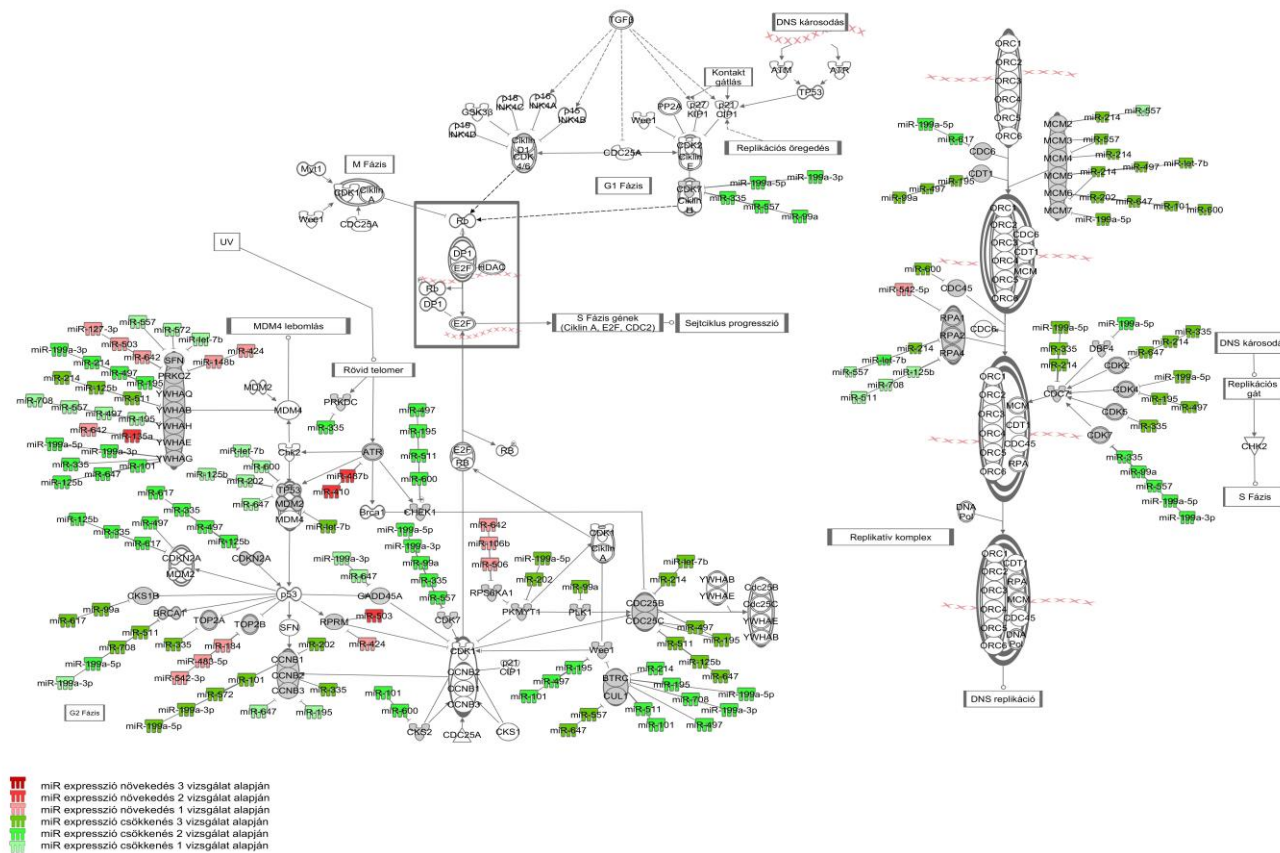
Az ACA és ACC mintacsoportok összehasonlításánál az integrin jelátviteli útvonalat (**12. ábra**), a G2/M ellenőrzési pont szabályozás, a kromoszóma replikáció sejtciklus szabályozás, illetve a ciklin és sejtciklus szabályozás útvonalait (**13. ábra**) azonosítottunk.



10. ábra: Az ép mellékvese és ACC mintacsoportok összehasonlításából adódó, miRNS-ekkel kiegészített aril hidrokarbon receptor és a DNS károsodás indukálta 45 (GADD45) jelátviteli útvonalak (p-érték<0.05).



11. ábra: Az ép mellékvese és ACC mintacsoportok összehasonlításából adódó, miRNS-ekkel kiegészített integrin jelátviteli útvonal (p -érték <0.05).



13. ábra: Az ACA és ACC mintacsoportok összehasonlításából adódó, miRNS-ekkel kiegészített G2/M ellenőrzési pont szabályozás, a kromoszóma replikáció sejtciklus szabályozás, illetve a ciklin és sejtciklus szabályozás útvonalai (p-érték<0.05).

V.2.2.2.1. Aril hidrokarbon receptor és GADD45 jelátviteli útvonalak

Az ép mellékvese és ACC összehasonlításban, mellékvesekéreg daganat esetén az aril hidrokarbon receptor és a *GADD45* jelátviteli útvonalak mRNA expressziós változásai összeköttetésben lehetnek a következő felülexpresszált miRNS-ekkel (két vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is fellelhető, közös miRNS-ek: *miR-127-3p*, *miR-424*, *miR-432*, *miR-483-5p*, *miR-503* és egy vizsgált miRNS-mRNS interakcióban lévő, közös miRNS-ek: *miR-184*, *miR-210*, *miR-487b*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (két vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is megjelenő, közös miRNS: *miR-214* és egy vizsgált miRNS-mRNS interakcióban található, közös miRNS-ek: *miR-375*, *miR-511*) **(10. ábra)**.

V.2.2.2.2. Integrin jelátviteli útvonal

Az ép mellékvese és ACC összevonásban, mellékvesekéreg daganat esetén az integrin jelátviteli útvonal mRNA expressziós változásai a következő felülexpresszált miRNS-ekkel (két vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is előforduló, közös miRNS-ek: *miR-127-3p*, *miR-184*, *miR-423*, *miR-424*, *miR-483-5p*, *miR-487b*, *miR-503* és egy vizsgált miRNS-mRNS interakcióban lévő, közös miRNS-ek: *miR-210*, *miR-432*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (két vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is megtalálható, közös miRNS-ek: *miR-214*, *miR-511* és egy vizsgált miRNS-mRNS interakcióban lelhető, közös miRNS: *miR-375*) lehetnek kapcsolatban **(11. ábra)**.

Az ACA és ACC összehasonlításban, a mi szövetspecifikus target predikciós megközelítésünket alapul véve, mellékvesekéreg daganat esetén az integrin jelátviteli útvonal mRNA expressziós változásai a következő felülexpresszált miRNS-ekkel (három vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is megjelenő, közös miRNS-ek: *miR-106b*, *miR-127-3p*, *miR-135a*, *miR-136*, *miR-148b*, *miR-376c*, *miR-424*, *miR-432*, *miR-503*, *miR-506*, *miR-542-3p*, *miR-542-5p*, *miR-642*, két vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is megtalálható, közös miRNS-ek: *miR-130b*, *miR-210*, *miR-410*, *miR-483-5p*, *miR-487b* és egy vizsgált miRNS-mRNS interakcióban lévő, közös miRNS: *miR-450a*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (három vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is előforduló, közös miRNS-ek: *miR-let-7b*, *miR-101*, *miR-125b*, *miR-195*, *miR-199a-3p*, *miR-199a-5p*, *miR-202*, *miR-214*, *miR-335*, *miR-511*, *miR-557*, *miR-*

600, *miR-617*, *miR-647*, *miR-708*, *miR-99a* és két vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is fellelhető, közös miRNS-ek: *miR-497*, *miR-572*) függhetnek össze (**12. ábra**).

V.2.2.2.3. *G2/M ellenőrzési pont szabályozása, kromoszóma replikáció szabályozás, ciklin és sejtciklus szabályozás útvonalai*

Az ACA és ACC összevetésben, mellékvesekéreg daganat esetén a sejtciklus szabályozás mRNS expressziós változásai összefüggésben állhatnak a következő felülexpresszált miRNS-ekkel (három vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is megjelenő, közös miRNS-ek: *miR-135a*, *miR-487b*, *miR-410*, *miR-503* és egy vizsgált miRNS-mRNS interakcióban található, közös miRNS-ek: *miR-106b*, *miR-127-3p*, *miR-148b*, *miR-184*, *miR-424*, *miR-483-5p*, *miR-506*, *miR-542-3p*, *miR-542-5p*, *miR-642*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (három vizsgált miRNS-mRNS interakcióban is előforduló, közös miRNS-ek: *miR-let-7b*, *miR-101*, *miR-125b*, *miR-195*, *miR-199a-3p*, *miR-199a-5p*, *miR-202*, *miR-214*, *miR-335*, *miR-497*, *miR-511*, *miR-557*, *miR-572*, *miR-600*, *miR-617*, *miR-647*, *miR-708*, *miR-99a*) (**13. ábra**).

VI. MEGBESZÉLÉS

VI.1. A mitotán genomikus/génexpressziós hatásai

Munkánk során a NCI-H295R mellékvesekéreg carcinoma sejtvonalon mitotán kezelés által kiváltott génexpressziós mintázatot vizsgáltuk. Ismereteink szerint a világon elsőként vizsgáltuk a mitotán genomikus hatásait. A részletes szakirodalmi keresésünk során publikációnk megjelenéséig összesen egyetlen olyan közleményt találtunk (www.pubmed.com), amelyben a mitotán génexpresszióra gyakorolt hatásáról számoltak be. Ebben az elemzésben a mitotán kezelés által indukált *SHBG* (szexuálhormont kötő globulin) és *CBG* (kortikoszteroid kötő globulin) gének expressziójának fokozásáról, illetve a HepG2/Hep89 sejtvonalaknak egy ösztrogén receptor ($ER\alpha$)-függő mechanizmus általi szekréciójáról tesznek említést [103].

Vizsgálatainkhoz a mitotán 5×10^{-6} M koncentrációját alkalmaztunk, mivel ez a koncentráció a sejtek károsítása nélkül hatékonyan gátolta a hormonszekréciót, mind kortizol és mind androsztendion esetén is. Ez a koncentráció megfelel a mitotán R- és S-enantiomer 50%-os gátló koncentrációjának (inhibitory concentration₅₀, IC₅₀) [104]. Az általunk alkalmazott 5×10^{-6} M koncentráció alacsonyabb, mint az eddigi szakirodalomban közölt 10^{-5} M citotoxikus koncentráció [105].

Mivel tanulmányunkban jelentős hangsúlyt fektettünk a szteroidhormon bioszintézis enzimeinek lehetséges expressziós változásaira, így 48 és 72 órás kezelési periódusokat választottuk, mivel ezekben az inkubációs periódusokban több mint 50%-os hormonszekréció gátlás volt megfigyelhető.

A mitotánnal kezelt és a kontroll sejtek között összesen 117 szignifikánsan, eltérő módon expresszálandó gén volt kimutatható. Ez a szám összehasonlítható a daganat terápia során használt, más sejtvonalakon alkalmazott egyéb citotoxikus hatóanyagok (ciszplatin [106, 107], a doxorubicin [108] vagy az ifoszfamid) *in vitro* hatásaival [109].

Stigliano és mtsai a mitotán (10^{-5} M) indukálta proteomikai profilváltozásokról számoltak be NCI-H295R sejtvonalon. 2D térképezés során összesen 350 fehérje foltot találtak, ezek közül 29-et azonosítottak peptid tömeg ujjlenyomat (mass fingerprint) alapján. Az energia metabolizmusban résztvevő fehérjék expressziós változásait (például: D3-foszfoglicerát-dehidrogenázt, trióz-foszfát-izomerázt, α -enolázt és

adrenodoxin-reduktázt), stresszválaszt (például: periredoxinokat és hősokk fehérjéket), citoszkéletont (tubulin β -2 és profilin-1) és tumorigenezist (Hint) szintén azonosították [95]. Habár Stigliano tanulmányában és a mi tanulmányunkban is szerepelnek hasonló fehérjék és mRNS-ek, azonban a proteomikai vizsgálat és pán-genomikus megközelítésünk során mégsem találtunk azonos elemeket. Lehetséges, hogy a Stigliano és mtsai által kimutatott proteomikus eltéréseket a mitotán nem-genomikus hatásai okozzák. A fehérje foltok azonosításának bonyolult mivolta és az azonosított foltok kis hányada alapján feltételezhető, hogy a nagyobb, azonosítatlan fehérje folt hányadok esetében átfedések lehetnek. Elképzelhető, hogy ezen eltérések kialakításában az eltérő mitotán koncentráció is szerepet játszhat (Stigliano tanulmányban 10^{-5} M, a mi vizsgálatunkban az alkalmazott mitotán koncentráció 5×10^{-6} M volt).

Eredményeinkben figyelemre méltó a szteroid bioszintézisben részt vevő GO géncsoportok mitotán által indukált alulexpresszálsága, valamint számottevő a 3 valós idejű PCR-rel validált, szteroid bioszintézisben részt vevő gén kifejeződésének (*HSD3B1*, *HSD3B2* és *CYP21A2*) mitotán általi gátlása. Ez a megfigyelés rávilágít arra a lehetőségre, hogy a mitotán szteroid gátló hatása nem csak az adrenolitikus és közvetlen enzimatikus szintű hatásának köszönhető, hanem hogy ezeknek a géneknek a csökkent expressziója szintén közreműködhet a hatás kialakításában. A *CYP21A2* csökkent expressziójának szintén szerepe lehet a kortizol és az aldoszteron szekréció gátlásban, míg a *HSD3B2* csökkent expressziója befolyásolhatja a kortizol, az aldoszteron és a mellékvese androgén szekrécióját is. Annak ellenére, hogy a NCI-H295R sejtvonalon a *HSD3B1*-nek a mitotán által csökkent expresszióját validáltuk, meg kell jegyeznünk, hogy ez az enzim elsősorban a placentában, a bőr faggyúmirigyeiben, az emlőmirigyekben és a prosztatában expresszálódik [110]. A *HSD3B1* expressziós gátlás biológiai jelentősége az NCI-H295R mellékvesekéreg carcinoma sejtvonalban így nem egyértelmű.

A mitotán által kiváltott *ALDH1L2*, *SERPINE2*, *GDF-15* és *TRIB3* gének fokozott expresszióját nehéz összefüggésbe hozni a mitotán farmakológiai hatásával. Ezeknek a géneknek a mitotán által indukált fokozott expressziója figyelemfelkeltő lehet a mitotán kulcsfontosságú mitokondriális hatásainak függvényében, azonban a relevancia tisztázásához további vizsgálatokra lenne szükség.

Az *ALDH1L2* gén egy olyan fehérjét kódol, amely az aldehid-dehidrogenáz szupercsaládhoz és a formiltranszferáz szupercsaládhoz egyaránt tartozik. Ez a 10-formiltetrahydrofolát dehidrogenáz (*FDH*) egy mitokondriális forma, mely átalakítja a 10-formil-tetrahydrofolátot tetrahydrofoláttá, alapvető szerepet játszva a sejt citoszol és mitokondriális kompartmentjei közötti egy szénatomú csoportok eloszlásában [111].

A *SERPINE*-k (szerin-proteáz inhibitorok) csoportja volt az első, azonosított proteázgátló fehérjecsoport. A *SerpinE1* és a *SerpinE2* részt vesz az extracelluláris mátrix lebontásában, a daganat sejtek terjedésében és az áttétek kialakulásában. Korábbi kutatások alapján a *SerpinE2* (vagy *PNI*) növeli a rákos sejtek potenciálját. A *SerpinE2* fokozott expresszióját már azonosították agresszív humán emlő daganatokban [112], hasnyálmirigy daganatokban [113], liposarcomákban [114], orális pikkelysejtes carcinomában [115] és a colorectalis daganatok esetében is [116]. A mitotán indukált *SerpinE2* expressziós növekedést nehéz egyeztetni a mitotán antitumor hatásával. Fontos megjegyezni, hogy egy másik *SERPINE* mRNS, a *SerpinG1* csökkent expresszióját már mellékvesekéreg daganatokban kimutatták, validálták, s malignus tumor markerként való alkalmazását javasolták [117].

A *GDF-15* a TGF- β szupercsalád tagja. Expresszióját a *p53* tumor szupresszor fehérje szabályozza, ami részt vesz az apoptotikus útvonalak gátlásában. Bizonyos carcinomákban a *GDF-15* fokozott expressziója figyelhető meg [118]. Kemoterápiával kezelt petefészek carcinoma folyadékgyülemében a *GDF-15* magas koncentrációja és expressziója mutatható ki [119]. A *GDF-15* fokozott expressziójának jelentősége a mitotán kezelés hatására még nem egyértelmű.

A *TRIB3* számos alapvető sejtbiológiai folyamat szabályozásában (a sejt osztódásban, az apoptózisban, a glükóz és lipid metabolizmusban) részt vesz [120, 121]. Bebizonyosodott, hogy a legkülönbözőbb intracelluláris fehérjékkel is kölcsönhatásba lép. Kapcsolatot alakít ki transzkripciós faktorokkal, az ubiquitin ligázzal és a jelátviteli útvonalakkal (pl. az Smad3-mal a TGF- β jelátviteli útvonallal és a MAPK útvonallal) egyaránt [121]. Számos rosszindulatú daganat esetében beszámoltak a *TRIB3* fokozott expressziójáról [122]. A tumorigenezisben a *TRIB3* jelentőségét kiemeli az a megfigyelés, mely szerint az *TRIB3* gátlása negatív hatással van a tumor migrációjára és inváziójára [121]. Kimutatták, hogy a *TRIB3* fokozott expressziója negatív prognosztikai faktor az emlő és a colorectális daganatok esetében [123, 124]. A *TRIB3*

fokozott expressziójának jelentősége a mitotán adrenolitikus hatásában az egyéb validált, fokozott kifejeződésű mRNS-ekhez hasonlóan nem világos, hiszen fokozott kifejeződése inkább daganatsegítő hatású.

Tanulmányunk megjelenése óta a mitotán génexpressziós hatásával más kutatócsoport is foglalkozott [125]. A mi vizsgálatunkhoz hasonlóan tanulmányukban 24 órás mitotán kezeléskor a kortizol és a dehidroepiandrosteron (*DHEA*) koncentrációjának a csökkenését azonosították. Ugyancsak észlelték a szteroid bioszintézisben résztvevő enzimek (koleszterin oldallánc hasító enzim (*CYP11A1*) és a 17α -hidroxiláz (*CYP17A1*)) csökkent expresszióját. Bár ezek az enzimek nem ugyanazok, mint az általunk validált (*CYP21A*, *HSD3B1* és *HSD3B2*) gének, eredményeik megerősítik megfigyelésünket, hogy a mitotán szteroidhormon bioszintézist gátló hatásában génexpressziós szintű eltérések is szerepet játszanak. Ezen kívül Lehmann és mtsai. az apoptózisban szerepet játszó kaszpáz-3 és -7 fokozódását identifikálták.

VI.2. A mikroRNS-ek által befolyásolt útvonalak bioinformatikai elemzése

A mikroRNS-ek mRNS célpontjai által befolyásolt patogenetikai utak közül, korábbi mRNS-szintű funkcionális genomikai metaanalízisünk alapján, a retinsav jelátviteli és a sejtciklus útvonalakra összpontosítottunk. Az alábbiakban ezek jelentőségét, mikroRNS-ekkel fennálló kapcsolatait elemezzük.

VI.2.1. Retinsav jelátviteli útvonalak

VI.2.1.1. PPAR α /RXR α és a PPAR jelátviteli útvonalak, az LPS/IL-1 által közvetített RXR funkció gátlás, a PPAR α /RXR α és az RAR aktiválási útvonalak

A retinsav (RA) az A-vitamin metabolitjaként (retinol) számos sejtműködésben (embrionális fejlődésben, a morfogenezisben, a túlélésben, a sejtnövekedésben és a differenciálódásban) vesz részt [126].

A retinoid receptoroknak két fő formája van: a retinsav receptor (*RAR*, izotípusai: *RAR α* , *RAR β* , *RAR γ*) és a retinoid X receptor (*RXR*, izotípusai: *RXR α* , *RXR β* , *RXR γ*). Míg az *RAR* receptorok képesek kötődni a 9-cisz-retinsavhoz és az all-transz-

retinsavhoz is, addig az *RXR* receptorok csak a 9-cisz-retinsavval képesek a kapcsolat kialakításra.

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában az *RXR α* szignifikáns alulexpresszálságát figyelte meg mellékvesekéreg daganatokban [2].

Az *RXR* receptorokhoz kötődő RA, heterodimereket képezhet számos más, különböző jelátviteli kaszkádra ható nukleáris receptorral. Ezek a heterodimerek, mint a máj X receptor (*LXR*), a farnezoid X receptor (*FXR*), a pregnán X receptor (*PXR*), a konstitutív androsztán receptor (*CAR*) és a peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor (*PPAR*) megtalálhatók az általunk vizsgált retinsav útvonalakban is.

A *PPAR*-család három fő izoformából áll (*PPAR α* , *PPAR β* és *PPAR γ*), melyek ligand aktivált transzkripciós szabályozóként töltik be szerepüket. A *PPAR α* képes az *RXR α* -val heterodimerizálódni, azaz különböző dimerformákat alkotni, s így aktív komplexként számos szövet esetében kulcsfontosságú szerepet játszik a zsírsav oxidációjában és felvételében [127]. Korábbi tanulmányokban már igazolták, hogy az apoptózis indukálásával a *PPAR γ* ligandok elnyomják a tumorsejtek proliferációját és/vagy egy differenciáltabb fenotípussal különböző rákos megbetegedésekben (beleértve az ACC-t is) megjelennek [81, 83]. Bioinformatikai megközelítésünk alapján a miRNS-ek befolyásolhatják a *PPAR* izoformák expresszióját.

Az ép mellékvese és az ACC összehasonlításunkban, az általunk azonosított miRNS-ek (**7. ábra**) kapcsolatban állhatnak a retinsav jelátviteli útvonalak mRNS expressziós változásaival.

Néhány, általunk felismert miRNS-ről megállapítható, hogy korábbi miRNS expressziós tanulmányokban validált, más humán daganatokban hasonlóképpen expresszálódó miRNS. Az all-transz-retinsavval kezelt humán neuroblastoma sejtekben a *miR-184* az apoptózis indukációjában részt vevő, legszignifikánsabban felülexpresszált miRNS [128].

Humán emlőrák sejtekben a retinsav kezelés képes a *miR-210* expresszióját fokozni [129].

A *miR-503* szignifikáns felülexpresszálságát már humán retinoblastoma sejtekben megállapították, azonban a tumorigenezisben betöltött pontos szerepe még tisztázatlan [130].

ACA és ACC összehasonlításunkban, az általunk azonosított miRNS-ek (**8. és 9. ábra**) befolyásolhatják a retinsav jelátviteli útvonalak mRNS expressziós változásait.

Számos előző kutatási eredmény rávilágít az egyéb szövetekben történő, PPAR szabályozással összefüggésben lévő, általunk azonosított miRNS-ek biológiai aktivitására. Tong és mtsai tanulmányukban leírták, hogy a *PPAR α* a *miR-506* célpontja. Ez a miRNS (a mi ACC megfigyelésünkhöz hasonlóan) humán vastagbél tumorokban felülexpresszálságot mutat, s a *PPAR α* expresszió csökkentésével hozzájárul a kemoterápia rezisztencia kialakulásához [131].

Romao és mtsai leírták, hogy a *miR-let-7b* a *PPAR- γ 2* expresszióját szabályozza zsírs sejtekben [132]. Mellékvesekéreg carcinomákhoz hasonlóan, hasnyálmirigy daganatban is azonosították a *miR-let-7b* alulexpresszálságát. Az alulexpresszált *miR-let-7b* érintett lehet a cél mRNS-einek felülexpresszálságában, beleértve a malignus sejtekben lévő *RAS* és *c-Myc* protoonkogéneket is [133,134]. Ezen kívül a *miR-let-7* család miRNS-ei szabályozzák a *RAS* onkogéneket az all-transz-retinsavval kezelt humán akut promielocitás leukémiában [135].

VI.2.2. Sejtciklust szabályozó útvonalak

VI.2.2.1. Aril hidrokarbon receptor és *GADD45* jelátviteli útvonalak

Az aril hidrokarbon receptor (*AHR*) olyan citoszol fehérje, amely chaperon (dajkafehérje) és immunofilin-szerű fehérjékhez kapcsolódik. Aktiválást és átalakulást követően az *AHR* komplex indukálja azon gének transzkripcióját, amelyek a sejtciklus progressziójában és apoptózisában részt vesznek. Az *AHR* ezen kívül képes kapcsolatba lépni számos különböző olyan jelátviteli útvonallal, amelyek szerepet játszanak a sejtciklus progresszióban, a sejtproliferációban, az apoptózisban [136] és a tumorigenezisben [137] is.

A *GADD45* fehérjéket (*GADD45 α* , *GADD45 β* , *GADD45 γ*) az élettani és környezeti stressz ingerekre reagáló stressz-érzékelőként azonosították. A *GADD45* fehérjék számos különböző növekedésszabályozó mechanizmusban vesznek részt. Így szerepet játszanak a sejtciklus leállításban, a DNS-replikációban és javításban, a sejtek túlélésében, a G2/M ellenőrzési pont szabályozásában és az apoptózisban [138].

Az ép mellékvese és ACC összehasonlításunkban, az általunk azonosított miRNS-ek (**10. ábra**) kapcsolatban állhatnak az aril hidrokarbon receptor és *GADD45* jelátvitel útvonalak mRNS expressziós változásaival. Ezen miRNS-ek és az említett jelátviteli útvonalak kapcsolatát korábbi vizsgálatokban nem igazolták.

VI.2.2.2. Integrin jelátviteli útvonal

Az integrinek az inter- és extracelluláris adhéziós kölcsönhatásokat közvetítő nagy sejtfelszíni receptor család. Az integrinek által közvetített kölcsönhatások közreműködnek a daganatos sejtek növekedésében, áttétképzésében, a gyulladásos folyamatok kialakulásában, a programozott sejthalálban és az immunreakciókban. A miRNS-ek megváltozott expressziója szerepet játszik az integrin expresszió deregulációjában, ami a daganatok progressziójához, s fejlődéséhez vezet [139].

Az ép mellékvese és ACC összehasonlításunkban, az általunk azonosított miRNS-ek (**11. ábra**) befolyásolhatják az integrin jelátvitel útvonalak mRNS expressziós változásait.

Kimutatták, hogy a *miR-214* az integrin $\alpha 3$ (*ITGA3*) és az AP-transzkripció faktor (*TFAP2*) célgének regulációjának csökkentésén keresztül modulálja a malignus melanoma metasztázis terjesztésében részt vevő többszörös felületi molekulákat a migráció, az invázió, az extravazáció és a sejt-túlélés növelésével [140]. Más miRNS-eknek az integrin útvonalakkal való kölcsönhatásaira vonatkozó további megállapításokat nem találtunk.

ACA és ACC összehasonlításunk alapján, az általunk azonosított miRNS-ek (**12. ábra**) részt vehetnek az integrin jelátvitel útvonalak mRNS expressziós változásaiban.

Korábbi vizsgálatok igazolják, hogy a vastagbélrákban az *miR-542-3p* expressziója szignifikánsan korrelál a *c-Src* és az integrin-kötött kináz (*ILK*) felülexpressziójával, ami arra utal, hogy a *c-Src-miR-542-3P-ILK-FAK* kör fontos szerepet játszik a tumor progresszió kontrolljában [141].

VI.2.2.3. G2/M ellenőrzési pont szabályozása, kromoszóma replikáció szabályozás, ciklin és sejtciklus szabályozás útvonalai

A sejtciklus szabályozás zavara a tumorigenezis egyik legfontosabb mechanizmusa. Több tanulmány a G1/S [142] és a G2/M [143, 144] tranzícióban részt vevő mRNS-ek miRNS-einek expressziós változásairól számol be különböző daganatokban.

Az ACA-ACC összehasonlításunkban, az általunk azonosított miRNS-ek (**13. ábra**) befolyásolhatják a sejtciklus szabályozás mRNS expressziós változásait.

A munkacsoportunk által azonosított miRNS-ek egy része a mellékvesekéreg daganatokban más daganatokhoz képest ellentétes irányban mutat kifejeződés változást. A különböző szövetekben ezen miRNS-ek ellentétes irányú expresszátsága a miRNS hatás szövetspecifikus természetével valószínűsíthető, vagyis ugyanaz a miRNS az egyik szövetben onkogénként, a másik szövetben viszont tumor szupresszorként viselkedhet [2, 46].

A felülexpresszált *miR-125b* gátolja a hepatocelluláris carcinoma sejtek (HCC) sejtproliferációját és sejtciklus progresszióját a myeloid sejt leukémia szekvencia-1 (*Mcl-1*) és az interleukin-6 receptor (*IL-6R*) gének kifejeződésének gátlása révén. Ez az eredmény arra utal, hogy HCC sejtekben a *miR-125b* tumor szupresszor miRNS-ként, illetve a sejtciklus fontos szabályozójaként is működik [145]. A mellédaganat sejtekben a *miR-125b* felülexpresszátsága csökkent sejtnövekedéshez és csökkent sejtproliferációhoz vezetett, indukálta a G1 sejtciklus leállást és gátolta a tumorigenezist az *ETS1* célgéneken keresztül. A *miR-125b*-t potenciális tumor szupresszor miRNS-ként írták le emlődaganatban [146]. Ezen kívül a *miR-125b* expressziója az *E2F3* targetálásával gátolhatja a cyclin A2-t húgyhólyag daganat szövetekben és húgyhólyag daganat sejtvonalakban egyaránt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *miR-125b* szabályozhatja a G1/S tranzíciót (átmenetet) az *E2F3*-ciklin A2 jelátviteli útvonal által és esetleg érintett lehet a tumorigenezisben [142].

A *miR-195* felülexpresszátsága G1-fázis leállást indukálhat húgyhólyag daganat sejtekben [147].

A *miR-let-7* felülexpresszátsága képes volt növelni a sejtfrakciót a sejtciklus G2/M fázisában primer fibroblasztok esetén [143]. Továbbá a *miR-let-7* felülexpresszátsága gátolta a prosztata daganat sejtek proliferációját, a tumor újraképződését és a G2/M fázisban indukálja a sejtciklus leállását [144].

A *miR-199a-3p* szignifikánsan csökkentette a sejtnövekedést és a sejtmigrációt humán osteosarcoma sejtpopulációban. Ez a gátló hatás a G1-fázis növekedését és az S-fázis csökkenését eredményezte [148].

Egy másik vizsgálat azt mutatta, hogy emlőrákban a *miR-497* felülexpresszálttsága a Bcl-w fehérje targetálásával sejtnövekedés gátlást, apoptózis fokozást, valamint a G0/G1 fázis leállást okozott [149].

Bioinformatikai megközelítésünk hátránya, hogy a mikroRNS-ek által potenciálisan befolyásolt mRNS-ek és útvonalak nincsenek validálva, így ezen eredmények csak *in silico* predikcióknak tekinthetők. E kórfolyamatok igazolásához további *in vitro* vizsgálatok szükségesek.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

Munkám során elsőként vizsgáltuk a mellékvesekéreg carcinoma kezelésében általánosan használt, de csak részben ismert hatásmechanizmusú szer, a mitotán teljes genom génextpressziós hatásait.

Eredményeimet az alábbi pontokban összegezve:

- Megállapítottuk, hogy az NCI-H295R mellékvesekéreg carcinoma sejtvonalon a mitotán 5×10^{-6} M koncentrációja az az optimális kezelési koncentráció, mely a sejtek életképességét még nem befolyásolja, de a hormonszintézist már hatékonyan gátolja.
- Ezen kezelési koncentrációt és 48 - 72 órás kezelési időpontokat alkalmazva, microarray analízis során összesen 117 szignifikánsan változóan expresszáldó gént azonosítottunk.
- Ezek közül legnagyobb mértékben alul- és felülexpresszált géneket (n=7) qRT-PCR módszer segítségével validáltuk.
- Közülük 3 a szteroidhormon bioszintézisében alapvető szerepet játszó, szignifikánsan csökkent expressziójú gén (*HSD3B1*, *HSD3B2* és a *CYP21A2*). A mitotán szteroidhormon bioszintézist gátló hatásában ez alapján az ismert közvetlen enzimgátló hatásai mellett génextpressziós, a szteroidhormon bioszintetikus enzimek kifejeződését gátló hatások is szerepet játszanak.
- A legnagyobb mértékű, fokozott expressziós változást mutató géneket (*GDF-15*, *ALDH1L2*, *TRIB3* és a *SERPINE2*) jelenleg nehéz összefüggésbe hozni a mitotán farmakológiai hatásával, mivel génextpressziós változásaik iránya az eddigi ismeretek szerint inkább daganatnövekedést elősegítő hatású. Ezeknek a géneknek, a mitotán hatásban játszott jelentőségük tisztázásához további vizsgálatokra lesz szükség.

Mellékvesekéreg carcinomákban, a mikroRNS-ek által befolyásolt kórfolyamatok átfogó bioinformatikai elemzéséről eddig még nem számoltak be. Így értekezésem másik részében, a mellékvesekéreg daganatokban közölt (legalább 2 vizsgálatban leírt),

szignifikáns változást mutató mikroRNS-ek biológiai jelentőségét kísértem meg jellemezni.

- Statisztikai elemzés alapján: 39 szignifikánsan változó miRNS-t, 49817 mRNS molekulát, s 29079 különböző célpontot prediktáltunk.
- Az Ingenuity Pathway analízis segítségével 418 szignifikáns változást mutató útvonalat ($p < 0.05$) találtunk, melyek közül (korábbi vizsgálatunk alapján) 12, a retinsav jelátvitelben és sejtciklus szabályozásban részt vevő útvonalakat elemeztük.
- Megállapítottuk, hogy ezen útvonalak mRNS expressziós változásai, kapcsolatban lehetnek a szignifikáns változást mutató mikroRNS-ekkel.
- Ezek az útvonalak:

Ép mellékvese és ACC összehasonlításban: a peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor alfa/retinoid X receptor alfa ($PPAR\alpha/RXR\alpha$) útvonal, peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor ($PPAR$) jelátviteli útvonal, az aril hidrokarbon receptor útvonal, a DNS károsodás indukálta 45 ($GADD45$) jelátviteli útvonal és az integrin jelátviteli útvonal.

ACA és ACC összehasonlítás esetén: a lipopoliszacharid/interleukin-1 ($LPS/IL-1$) által közvetített retinoid X receptor (RXR) funkció gátlás útvonala, a $PPAR\alpha/RXR\alpha$ aktiválási útvonal, a retinsav receptor (RAR) aktiválási útvonal, integrin jelátviteli útvonal, a G2/M ellenőrzési pont szabályozása, a kromoszóma replikáció sejtciklus szabályozás, illetve a ciklin és sejtciklus szabályozás útvonala.

Mindazonáltal hangsúlyoznunk kell, hogy az általunk azonosított patogenetikai útvonalak bioinformatikai módszerrel kerültek azonosításra, csak *in silico* predikcióknak tekinthetők, így a továbbiakban a kísérletes *in vitro* validálásuk elengedhetetlen.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

Munkám során a mellékvesekéreg carcinoma kezelésében alapvető, de ismeretlen hatásmechanizmusú adrenolitikus szernek, a mitotán genomikus hatásainak vizsgálatára, valamint a mellékvesekéreg daganatok különböző tanulmányaiban szignifikánsan eltérő kifejeződést mutató mikroRNS-ek által befolyásolt kórfolyamatok útvonalainak azonosítására tettem kísérletet.

Igazoltuk, hogy mellékvesekéreg carcinoma sejtvonal *in vitro* mitotán kezelése befolyásolja a génextpressziós mintázatot. A mitotán szteroidhormon bioszintézist gátló hatásában az ismert fehérjeszintű hatás mellett kimutattuk, hogy a mitotán gátolja a szteroidhormon bioszintézis három kulcsfontosságú enzimének génextpresszióját (*HSD3B1*, *HSD3B2* és *CYP21A2*). Ezen kívül négy fokozott expressziójú gént validáltunk (*ALDH1L2*, *SERPINE2*, *GDF-15* és *TRIB3*), melyeknek patogenetikai jelentősége további vizsgálatra szorul.

Munkám másik részében a mellékvesekéreg daganatokban szignifikánsan eltérően kifejeződő, több tanulmányban leírt mikroRNS-ek *in silico* bioinformatikai elemzését végeztük el. Számos potenciális patogenetikai jelentőségű útvonalat találtunk, amelyek közül korábbi vizsgálataink alapján a sejtciklus károsodást és a retinsav jelátvitelt választottuk ki további tanulmányozásra. Ezek az aril hidrokarbon receptor útvonal, a *GADD45* jelátviteli útvonal, az integrin jelátviteli útvonal, a G2/M ellenőrzési pont szabályozása, a kromoszóma replikáció szabályozása, a ciklin és sejtciklus szabályozás útvonalai, a *PPAR α /RXR α* és a *PPAR* jelátviteli útvonalak, az *LPS/IL-1* által közvetített retinoid X receptor (*RXR*) funkció gátlása és az *RAR* aktiválási útvonal. Számos mikroRNS-t azonosítottunk, amelyek ezen útvonalakat befolyásolhatják.

Vizsgálataim hasznosak lehetnek olyan potenciális gyógyszeres támadáspontok azonosításában, amelyek a mellékvesekéreg carcinoma kezelésében hatékonyak lehetnek.

1. **Zsippai A**, Szabó DR, Tömböl Zs, Szabó PM, Éder K, Pállinger É, Gaillard RC, Patócs A, Tóth S, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2012) Effects of mitotane on gene expression in the adrenocortical cell line NCL-H295R: microarray study. *Pharmacogenomics*, 13: 1351-1361. IF: 3,974
2. **Zsippai A**, Szabó PM, Szabó DR, Nagy Z, Patócs A, Rácz K, Igaz P. (2013) In silico analysis of pathways affected by differentially expressed microRNAs in adrenocortical tumors. *J Endocrinol Invest*, DOI: 10.3275/9024.
3. **Zsippai A**, Szabó DR, Szabó PM, Tömböl Z, Rácz K, Igaz P. (2010) Génextpressziós vizsgálatok mellékvesekéreg daganatokban. *Magyar Belorvosi Archivum*, 63: 425-434.

IX. SUMMARY

I have attempted to identify the genomic effects of mitotane - an adrenolytic agent that is essential in the treatment of adrenocortical carcinoma, yet its mechanism of action is still unclear. I have also attempted to identify the pathological processes affected by microRNAs showing significantly differential expression in various studies in adrenocortical tumours.

We have proved that *in vitro* mitotane treatment of adrenocortical carcinoma cell line affects the gene expression pattern. Besides the known protein level effect partly responsible for the steroid hormone biosynthesis inhibitory effect, we have shown that mitotane also inhibits the gene expression of three key enzymes in steroid hormone biosynthesis (*HSD3B1*, *HSD3B2* and *CYP21A2*). We have validated four overexpressed genes (*ALDH1L2*, *SERPINE2*, *GDF-15* and *TRIB3*), though the pathogenic significance of these is still unclear.

The other segment of my work includes *in silico* bioinformatic analysis of significantly differently expressed microRNAs (described in at least two studies) in adrenocortical tumours. We have found numerous potential pathways with pathogenic significance. Based on our previous experiences, we chose cell cycle damage and retinoic acid signaling for further testing (aryl hydrocarbon receptor signaling, *GADD45* signaling pathway, integrin signaling, G2/M damage checkpoint regulation, cell cycles control of chromosomal replication, cyclins and cell cycle regulation, *PPAR α /RXR α* activation, *PPAR* signaling, LPS/*IL-1* mediated inhibition of *RXR* function and *RAR* activation pathways). We have identified several microRNAs that may have an effect on these pathways.

These results may be useful in identifying potential molecular mechanisms that might be potential targets in the treatment of adrenocortical carcinoma.

1. **Zsippai A**, Szabó DR, Tömböl Zs, Szabó PM, Éder K, Pállinger É, Gaillard RC, Patócs A, Tóth S, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2012) Effects of mitotane on gene expression in the adrenocortical cell line NCL-H295R: microarray study. *Pharmacogenomics*, 13: 1351-1361. IF: 3,974
2. **Zsippai A**, Szabó PM, Szabó DR, Nagy Z, Patócs A, Rácz K, Igaz P. (2013) In silico analysis of pathways affected by differentially expressed microRNAs in adrenocortical tumors. *J Endocrinol Invest*, DOI: 10.3275/9024.
3. **Zsippai A**, Szabó DR, Szabó PM, Tömböl Z, Rácz K, Igaz P. (2010) Génexpressziós vizsgálatok mellékvesekéreg daganatokban. *Magyar Belorvosi Archivum*, 63: 425-434.

X. IRODALOMJEGYZÉK

1. Koch CA, Pacak K, Chrousos GP. (2002) The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 5367-5384.
2. Tömböl Z, Szabó PM, Molnár V, Wiener Z, Tölgyesi G, Horányi J, Riesz P, Reismann P, Patócs A, Likó I, Gaillard RC, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2009) Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer*, 16: 895-906.
3. Maluf DF, de Oliveira BH, Lalli E. (2011) Therapy of adrenocortical cancer: present and future. *Am J Cancer Res*, 1: 222–232.
4. Langer P, Bartsch D, Moebius E, Rothmund M, Nies C. (2000) Adrenocortical carcinoma – our experience with 11 cases. *Langenbecks Arch Surg*, 385: 393–397.
5. Berruti A, Ferrero A, Sperone P, Daffara F, Reimondo G, Papotti M, Dogliotti L, Angeli A, Terzolo M. (2008) Emerging drugs for adrenocortical carcinoma. *Expert Opin Emerg Drugs*, 13: 497–509.
6. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini NC, Liberman B, Carlos Gomes G, Krischner MA. (2000) Adrenocortical carcinoma: Clinical and laboratory observations. *Cancer*, 88: 711–736.
7. Bielinska M, Parviainen H, Kiiveri S, Heikinheimo M, Wilson DB. (2009) Review paper: origin and molecular pathology of adrenocortical neoplasms. *Veterinary Pathology*, 46: 194–210.
8. Patalano A, Brancato V, Mantero F. (2009) Adrenocortical cancer treatment. *Hormone Research*, 71: 99–104.
9. Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. (2008) Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *Oncologist*, 13: 548-561.
10. Wooten MD, King DK. (1993) Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. *Cancer*, 72: 3145–3155.

11. Allolio B, Fassnacht M. (2006) Clinical review: Adrenocortical carcinoma: Clinical update. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 2027–2037.
12. Libe R, Fratticci A, Bertherat J. (2007) Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer*, 14: 13–28.
13. Boscaro M, Fallo F, Barzon L, Danielle O, Sonino N. (1995) Adrenocortical adenoma: epidemiology and natural history. *Minerva Endocrinol*, 20: 89-94.
14. Cai W, Counsell RE, Djanegara T, Schteingart DE, Sinsheimer JE, Wotring LL. (1995) Metabolic activation and binding of mitotane in adrenal cortex homogenates. *J Pharm Sci*, 84: 134–138.
15. Peppas M, Pikounis V, Papaxoinis G, Macheras A, Economopoulos T, Raptis SA, Hadjidakis D. (2009) Adrenocortical carcinoma secreting cortisol, androgens and aldosterone: a case report. *Cases J*, 10: 8951.
16. Icard P, Chapuis Y, Andreassian B, Bernard A, Proye C. (1992) Adrenocortical carcinoma in surgically treated patients: a retrospective study on 156 cases by the French Association of Endocrine Surgery, 112: 972-979.
17. Pommier R, Brennan M. (1992) An eleven-year experience with adrenocortical carcinoma. *Surgery*, 112: 963-970.
18. Fassnacht M, Allolio B. (2009) Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Practice and Research*, 23: 273–289.
19. Zini L, Porpiglia F, Fassnacht F. (2011) Contemporary management of adrenocortical carcinoma. *European Urology*, 60: 1055–1065.
20. Fassnacht M, Kenn W, Allolio B. (2004) Adrenal tumors: how to establish malignancy? *Journal of Endocrinological Investigation*, 27: 387–399.
21. Seccia TM, Fassina A, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. (2005) Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma: an unusual cause of Conn's syndrome with an ominous clinical course. *Endocrine-Related Cancer*, 12: 149–159.
22. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libé R, Hughes BA, Schneider P, Smith DJ, Stiekema H, Krone N, Porfiri E, Opocher G, Bertherat J, Mantero F, Allolio B, Terzolo M, Nightingale P, Shackleton CH, Bertagna X, Fassnacht M, Stewart PM. (2011) Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 96: 3775-3784.

23. Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B. (2009) Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer*, 115: 243–250.
24. de Reyniès A, Assié G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, René-Corail F, Dousset B, Bertagna X, Clauser E, Bertherat J. (2009) Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol*, 27: 1108-1115.
25. Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, Sanders D, Thomas DG, Doherty G, Hammer G. (2009) Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res*, 15: 668-676.
26. Szabó P, Rácz K, Tulassay Zs, Igaz P. (2006) A funkcionális genomika lehetőségei a mellékvese és hypophysis daganatok patogenezisének vizsgálatában. *Orvosi Hetilap*, 147: 1267-1271.
27. Igaz P, Wiener Z, Szabó P, Falus A, Gaillard RC, Horányi J, Rácz K, Tulassay Z. (2006) Functional genomics approaches for the study of sporadic adrenal tumor pathogenesis: Clinical implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 101: 87-96.
28. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JM, Hanash SM. (2003) Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol*, 162: 521–531.
29. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, Bertherat J, Bertagna X, Plouin PF, Baudin E, Berger F, Gicquel C, Chabre O, Feige JJ. (2005) Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab*, 9: 1819-29.
30. Velázquez-Fernández D, Laurell C, Geli J, Höög A, Odeberg J, Kjellman M, Lundeberg J, Hamberger B, Nilsson P, Bäckdahl M. (2005) Expression profiling

of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery*, 138: 1087-1094.

31. Slater EP, Diehl SM, Langer P, Samans B, Ramaswamy A, Zielke A, Bartsch DK. (2006) Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol*, 154: 587-598.
32. Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M, Ragazzon B, Launay P, Libé R, Chokri I, Audebourg A, Royer B, Sbiera S, Vacher-Lavenu MC, Dousset B, Bertagna X, Allolio B, Bertherat J, Tissier F. (2011) Beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res*, 17: 328–336.
33. Durand J, Lampron A, Mazzuco TL, Chapman A, Bourdeau I. (2011) Characterization of differential gene expression in adrenocortical tumors harboring beta-catenin (CTNNB1) mutations. *J Clin Endocrinol Metab*, 96: E1206–E1211.
34. Hoeflich A, Reisinger R, Lahm H, Kiess W, Blum WF, Kolb HJ, Weber MM, Wolf E. (2001) Insulin-like growth factor-binding protein 2 in tumorigenesis: Protector or promoter? *Cancer Res*, 61: 8601-8610.
35. Boulle N, Logié A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y. (1998) Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 83: 1703-1720.
36. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, Bertherat J, Chapuis Y, Duclos JM, Schlumberger M, Plouin PF, Luton JP, Le Bouc Y. (2001) Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Research*, 61: 6762–6767.
37. Ragazzon B, Assi'e G, Bertherat J. (2011) Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments. *Endocrine-Related Cancer*, 18: R15–R27.
38. Soon PS, Gill AJ, Benn DE, Clarkson A, Robinson BG, McDonald KL, Sidhu SB (2009) Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF-2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer*; 16: 573-583.

39. Bertherat J, Bertagna X. (2009) Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23: 261-271.
40. Stratakis CA. (2003) Genetics of adrenocortical tumors: gatekeepers, landscapers and conductors in symphony. *Trends Endocrinol Metab*, 14: 404-410.
41. Kikuchi A. (2003) Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci*, 94: 225-229.
42. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Val P. (2010) Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet*, 19: 1561-1576.
43. Szabó PM, Tamási V, Molnár V, Andrásfalvy M, Tömböl Z, Farkas R, Kövesdi K, Patócs A, Tóth M, Szalai C, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2010) Meta-analysis of adrenocortical tumour genomics data: novel pathogenic pathways revealed. *Oncogene*, 29: 3163-3172.
44. Bartel DP. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136: 215-233.
45. Stahlhut Espinosa CE, Slack FJ. (2006) The role of microRNAs in cancer. *Yale J Biol Med*, 79: 131-140.
46. Chen CZ. (2005) MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*, 353: 1768-1771.
47. Molnár V, Bakos B, Hegyesi H, Falus A. (2008) Nem kódoló genom és mikro-RNS-ek: új fejezet a genetika történetében. *LAM*, 18: 591-597.
48. Lionetti M, Agnelli L, Lombardi L, Tassone P, Neri A. (2012) MicroRNAs in the pathobiology of multiple myeloma. *Curr Cancer Drug Targets*, 12: 823-837.
49. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, Wojcik SE, Aqeilan RI, Zupo S, Dono M, Rassenti L, Alder H, Volinia S, Liu CG, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 13944-13949.
50. Ventura A, Jacks T. (2009) MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*, 136: 586-591.

51. Wijnhoven BP, Michael MZ, Watson DI. (2007) MicroRNAs and cancer. *Br J Surg*, 94: 23-30.
52. Tömböl Z, Szabó P, Rácz K, Tulassay Z, Igaz P. (2007) A mikro-RNS-ek jeletősége daganatos betegségekben. *Orvosi hetilap*, 148: 1135-1141.
53. de Leeuw DC, van den Ancker W, Denkers F, de Menezes RX, Westers TM, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Smit L. (2013) MicroRNA profiling can classify acute leukemias of ambiguous lineage as either acute myeloid leukemia or acute lymphoid leukemia. *Clin Cancer Res*, 19: 1-10.
54. Mar-Aguilar F, Mendoza-Ramírez JA, Malagón-Santiago I, Espino-Silva PK, Santuario-Facio SK, Ruiz-Flores P, Rodríguez-Padilla C, Reséndez-Pérez D. (2013) Serum circulating microRNA profiling for identification of potential breast cancer biomarkers. *Dis Markers*, 34: 163-169.
55. Bottoni A, Zatelli MC, Ferracin M, Tagliati F, Piccin D, Vignali C, Calin GA, Negrini M, Croce CM, Degli Uberti EC. (2007) Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*, 210: 370-377.
56. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Cappeli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. (2006) MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*, 24: 4677-4684.
57. Weber F, Teresi RE, Broelsch CE, Frilling A, Eng C. (2006) A limited set of human MicroRNA is deregulated in follicular thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 3584-3591.
58. Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, Yeh MW, Wong SG, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, Sidhu SB. (2009) miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res*, 15: 7684-7692.
59. Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E. (2011) MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer*, 117: 1630-1639.

60. Schmitz KJ, Helwig J, Bertram S, Sheu SY, Suttorp AC, Seggewiss J, Willscher E, Walz MK, Worm K, Schmid KW. (2011) Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. *J Clin Pathol*, 64: 529-535.
61. Özata DM, Caramuta S, Velázquez-Fernández D, Akçakaya P, Xie H, Höög A, Zedenius J, Bäckdahl M, Larsson C, Lui WO. (2011) The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 18: 643-655.
62. Singh P, Soon PS, Feige JJ, Chabre O, Zhao JT, Cherradi N, Lalli E, Sidhu SB. (2012) Dysregulation of microRNAs in adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol*, 351: 118-128.
63. Hahner S, Fassnacht M. (2005) Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Curr Opin Invest Drugs*, 6: 386–394.
64. Powers JM, Hennigar GR, Grooms G, Nichols J. (1974) Adrenal cortical degeneration and regeneration following administration of DDD. *Am J Pathol*, 75: 181–194.
65. Kurokohchi K, Nishioka M, Ichikawa Y. (1992) Inhibition mechanism of reconstituted cytochrome P-450_{sc}-linked monooxygenase system by antimycotic reagents and other inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 42: 287–292.
66. Brown RD, Nicholson WE, Chick WT, Strott CA. (1973) Effect of o,p'-DDD on human adrenal steroid 11 β -hydroxylation activity *J Clin Endocrinol Metab* 36: 730–733.
67. Touitou Y, Bogdan A, Auzéby A, Dommergues JP. (1979) Glucocorticoid and mineralocorticoid pathways in two adrenocortical carcinomas: comparison of the effects of o,p'-dichlorodiphenyldichloroethane, aminoglutethimide and 2-p-aminophenyl-2 phenylethylamine in vitro. *J Endocrinol* 82: 87–94.
68. Igaz P, Tömböl Z, Szabó PM, Likó I, Rácz K. (2008) Steroid biosynthesis inhibitors in the therapy of hypercortisolism: theory and practice. *Curr Med Chem* 15: 2734–2747.
69. Bergenstal DM, Hertz R, Lipsett MB, Moy RH. (1960) Chemotherapy of adrenocortical cancer with o, p-DDD. *Annals of Internal Medicine*, 53: 672–682.

70. Cai W, Benitez R, Counsell RE, Djanegaga T, Schteingart DE, Sinisheimer JE, Wotring LL. (1995) Bovine adrenal cortex transformations of mitotane [1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane; o,p'-DDD] and its p,p'- and m,p'-isomers. *Biochem Pharmacol*, 49: 1483–1489.
71. Benecke R, Keller E, Vetter B, de Zeeuw RA. (1991) Plasma level monitoring of mitotane (o,p'-DDD) and its metabolite (o,p'-DDE) during long-term treatment of Cushing's disease with low doses. *Eur J Clin Pharmacol*, 41: 259–261.
72. Hermesen IG, Fassnacht M, Terzolo M, Houterman S, den Hartigh J, Leboulleux S, Daffara F, Berruti A, Chadarevian R, Schlumberger M, Allolio B, Haak HR, Baudin E. (2011) Plasma concentrations of o,p'-DDD, o,p'-DDA, and o,p'-DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96: 1844–1851.
73. Bacchetta J, Droz JP. (2005) Practical use of o,p'-DDD in adrenocortical carcinoma. *Bull Cancer*, 92: 273-279.
74. Haak HR, Hermans J, van de Velde CJ, Lentjes EG, Goslings BM, Fleuren GJ, Krans HM. (1994) Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients. *Br J Cancer*, 69: 947–951.
75. Kirschner LS. (2006) Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91: 14–21.
76. Bates SE, Shieh CY, Mickley LA, Dichek HL, Gazdar A, Loriaux DL, Fojo AT. (1991) Mitotane enhances cytotoxicity of chemotherapy in cell lines expressing a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) which is also expressed by adrenocortical carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 73: 18–29.
77. Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Della Casa S, Gross DJ, Carnaghi C, Casali P, Porpiglia F, Mantero F, Reimondo G, Angeli A, Dogliotti L. (2005) Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocrine-Related Cancer*, 12: 657–666.

78. Khan TS, Imam H, Juhlin C, Skogseid B, Gröndal S, Tibblin S, Wilander E, Oberg K, Eriksson B. (2000) Streptozocin and o,p-DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use. *Annals of Oncology*, 11: 1281–1287.
79. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, Baudin E, Haak H, Berruti A, Welin S, Schade-Brittinger C, Lacroix A, Jarzab B, Sorbye H, Torpy DJ, Stepan V, Schteingart DE, Arlt W, Kroiss M, Leboulleux S, Sperone P, Sundin A, Hermsen I, Hahner S, Willenberg HS, Tabarin A, Quinkler M, de la Fouchardière C, Schlumberger M, Mantero F, Weismann D, Beuschlein F, Gelderblom H, Wilmink H, Sender M, Edgerly M, Kenn W, Fojo T, Müller HH, Skogseid B. (2012) Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*, 366: 2189-2197.
80. Blanquicett C, Roman J, Hart CM. (2008) Thiazolidinediones as anti-cancer agents. *Cancer Ther*, 6: 25–34.
81. Betz MJ, Shapiro I, Fassnacht M, Hahner S, Reincke M, Beuschlein F. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists suppress adrenocortical tumor cell proliferation and induce differentiation. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 3886–3896.
82. Cerquetti L, Sampaoli C, Amendola D, Bucci B, Masuelli L, Marchese R, Misiti S, De Venanzi A, Poggi M, Toscano V, Stigliano A. (2011) Rosiglitazone induces autophagy in H295R and cell cycle deregulation in SW13 adrenocortical cancer cells. *Exp Cell Res*, 317: 1397–1410.
83. Ferruzzi P, Ceni E, Tarocchi M, Grappone C, Milani S, Galli A, Fiorelli G, Serio M, Mannelli M. (2005) Thiazolidinediones inhibit growth and invasiveness of the human adrenocortical cancer cell line H295R. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90: 1332–1339.
84. Cantini G, Lombardi A, Piscitelli E, Poli G, Ceni E, Marchiani S, Ercolino T, Galli A, Serio N, Mannelli M, Luconi M. (2008) Rosiglitazone inhibits adrenocortical cancer cell proliferation by interfering with the IGF–IR intracellular signaling. *PPAR Res*, 904041.
85. Goon PK, Boos CJ, Stonelake PS, Blann AD, Lip GY. (2006) Detection and quantification of mature circulating endothelial cells using flow cytometry and

- immunomagnetic beads: a methodological comparison. *Thromb Haemost*, 96: 45–52.
86. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. (2005) Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 15545–15550.
87. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods*, 25: 402–408.
88. 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.
89. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27: 91-105.
90. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. (2005) Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 37: 495-500.
91. Grün D, Wang YL, Langenberger D, Gunsalus KC, Rajewsky N. (2005) MicroRNA target predictions across seven *Drosophila* species and comparison to mammalian targets. *PLoS Comput Biol*, 1: e13.
92. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36: D154-158.
93. Sylvester PW. (2011) Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods Mol Biol*, 716: 157–168.
94. Krajewski S, Kurz J, Wendel HP, Straub A. (2011) Flow cytometry analysis of porcine platelets: Optimized methods for best results. *Platelets*, 23: 386–394.
95. Stigliano A, Cerquetti L, Borro M, Gentile G, Bucci B, Misiti S, Piergrossi P, Brunetti E, Simmaco M, Toscano V. (2008) Modulation of proteomic profile in H295R adrenocortical cell line induced by mitotane. *Endocr Relat Cancer*, 15: 1–10.

96. Ohlsson A, Ullerås E, Cedergreen N, Oskarsson A. (2010) Mixture effects of dietary flavonoids on steroid hormone synthesis in the human adrenocortical H295R cell line. *Food Chem. Toxicol*, 48: 3194–3200.
97. Rainey WE, Saner K, Schimmer BP. (2004) Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol*, 228: 23–38.
98. Lindhe O, Skogseid B. (2010) Mitotane effects in a H295R xenograft model of adjuvant treatment of adrenocortical cancer. *Horm Metab Res*, 42: 725–730.
99. Cerquetti L, Sampaoli C, Amendola D, Bucci B, Misiti S, Raza G, De Paula U, Marchese R, Brunetti E, Toscano V, Stigliano A. (2010) Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation. *Int J Oncol*, 37: 493–501.
100. Luconi M, Poli G, Mangoni M, Pezzati P, Francalanci M, Gelmini S, Canu L, Cantini M, Serio M, Manelli M. (2011) Effects and kinetics of mitotane in in vitro and in vivo models of adrenocortical carcinoma. Presented at: European Congress of Endocrinology 2011. Rotterdam, Netherlands, 30 April–4 May.
101. Cerquetti L, Bucci B, Marchese R, Misiti S, De Paula U, Miceli R, Muleti A, Amendola D, Piergrossi P, Brunetti E, Toscano V, Stigliano A. (2008) Mitotane increases the radiotherapy inhibitory effect and induces G2-arrest in combined treatment on both H295R and SW13 adrenocortical cell lines. *Endocr Relat Cancer*, 15: 623–634.
102. Cheng WC, Chang CW, Chen CR, Tsai ML, Shu WY, Li CY, Hsu IC. (2011) Identification of reference genes across physiological states for qRT-PCR through microarray meta-analysis. *PLoS One*, 6: e 17347.
103. Nader N, Raverot G, Emptoz-Bonneton A, Déchaud H, Bonnay M, Baudin E, Pugeat M. (2006) Mitotane has an estrogenic effect on sex hormone-binding globulin and corticosteroid binding globulin in humans. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 2165–2170.
104. Asp V, Cantillana T, Bergman A, Brandt I. (2010) Chiral effects in adrenocorticolytic action of o,p'-DDD (mitotane) in human adrenal cells. *Xenobiotica*, 40: 177-183.

105. Schteingart DE, Sinsheimer JE, Counsell RE, Abrams GD, McClellan N, Djanegara T, Hines J, Ruangwises N, Benitez R, Wotring LL. (1993) Comparison of adrenalytic activity of mitotane and a methylated homolog on normal adrenal cortex and adrenal cortical carcinoma. *Cancer Chemother Pharm*, 31: 459–466.
106. Yatomi M, Takiguchi Y, Asaka-Amano Y, Arai M, Tada Y, Kurosu K, Sakao S, Kasahara Y, Tanabe N, Tatsumi K, Seki N, Kuriyama T. (2007) Altered gene expression by cisplatin in a human squamous cell lung carcinoma cell line. *Anticancer Res*, 27: 3235–3243.
107. Carminati PO, Mello SS, Fachin AL, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Carlotti CG, Dinadi EA, Passos GA, Sakamoto-Hojo ET. (2010) Alterations in gene expression profiles correlated with cisplatin cytotoxicity in the glioma U343 cell line. *Genet Mol Biol* 33: 159–168.
108. Hao H, Dong YB, Bowling MT, Zhou HS, McMasters KM. (2006) Alteration of gene expression in melanoma cells following combined treatment with E2F-1 and doxorubicin. *Anticancer Res*, 26: 1947–1956.
109. Bruheim S, Xi Y, Ju J, Fodstad O. (2009) Gene expression profiles classify human osteosarcoma xenografts according to sensitivity to doxorubicin, cisplatin, and ifosfamide. *Clin Cancer Res* 15: 7161–7169.
110. Simard J, Ricketts ML, Gingras S, Soucy P, Feltus FA, Melner MH. (2005) Molecular biology of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ 5- Δ 4 isomerase gene family. *Endocr Rev*, 26: 525–582.
111. Krupenko NI, Dubard ME, Strickland KC, Moxley KM, Oleinik NV, Krupenko SA. (2010) ALDH1L2 is the mitochondrial homolog of 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 285: 23056–23063.
112. Candia BJ, Hines WC, Heaphy CM, Griffith JK, Orlando RA. (2006) Protease nexin-1 expression is altered in human breast cancer. *Cancer Cell Int* 6: 16.
113. Buchholz M, Biebl A, Neesse A, Wagner M, Iwamura T, Leder G, Adler G, Gress TM. (2003) SerpinE2 (protease nexin I) promotes extracellular matrix production and local invasion of pancreatic tumors in vivo. *Cancer Res*, 63: 4945–4951.

114. Thelin-Järnum S, Lassen C, Panagopoulos I, Mandahl N, Aman P. (1999) Identification of genes differentially expressed in TLS–HOP carrying myxoid liposarcomas. *Int J Cancer* 83: 30–33.
115. Gao S, Krogdahl A, Sørensen JA, Kousted TM, Dabelsteen E, Andreasen PA. (2008) Overexpression of protease nexin-1 mRNA and protein in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 44: 309–313.
116. Bergeron S, Lemieux E, Durand V, Cagnol S, Carrier JC, Lussier JG, Boucher MJ, Rivard N. (2010) The serine protease inhibitor SerpinE2 is a novel target of ERK signaling involved in human colorectal tumorigenesis. *Mol Cancer*, 9: 271.
117. Fernandez-Ravier GG, Weng J, Yeh RF, Shibru D, Khafnashar E, Chung KW, Hwang J, Duh QY, Clark OH, Kebebew E. (2008) Candidate diagnostic markers and tumor suppressor genes for adrenocortical carcinoma by expression profile of genes on chromosome 11q13. *World J Surg*, 32: 873–881.
118. Staff AC, Bock AJ, Becker C, Kempf T, Wollert KC, Davidson B. (2010) Growth differentiation factor-15 as a prognostic biomarker in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 118: 237–243.
119. Bock AJ, Stavnes HT, Kempf T, Tropé CG, Berner A, Davidson B, Staff AC. (2010) Expression and clinical role of growth differentiation factor-15 in ovarian carcinoma effusions. *Int J Gynecol Cancer* 20: 1448–1455.
120. Ohoka N, Yoshii S, Hattori T, Onozaki K, Hayashi H. (2005) TRB3 a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4–CHOP pathway and is involved in cell death. *EMBO J*, 24: 1243–1255.
121. Hua F, Mu R, Liu J, Xue J, Wang Z, Lin H, Yang H, Chen X, Hu Z. (2011) TRB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion. *J Cell Sci*, 124: 3235–3246.
122. Xu J, Lv S, Qin Y, Shu F, Xu Y, Chen J, Xu BE, Sun X, Wu J. (2007) TRB3 interacts with CtIP and is overexpressed in certain cancers. *Biochim Biophys Acta*, 1770: 273–278.
123. Wennemers M, Bussink J, Scheijen B, Nagtegaal ID, van Laarhoven HW, Raleigh JA, Varia MA, Heuvel JJ, Rouschop KM, Sweep FC, Span PN. (2011) Tribbles homolog 3 denotes a poor prognosis in breast cancer and is involved in hypoxia response. *Breast Cancer Res*, 13: R82.

124. Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Nishida N, Tokuoka M, Akita H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. (2009) Abnormal expression of TRIB3 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis. *Br J Cancer*, 101: 1664–1670.
125. Lehmann TP, Wrzesiński T, Jagodziński PP. (2013) The effect of mitotane on viability, steroidogenesis and gene expression in NCI-H295R adrenocortical cells. *Mol Med Rep*, 7: 893-900.
126. Wen X, Li Y, Hu K, Dai C, Liu Y. (2005) Hepatocyte growth factor receptor signaling mediates the anti-fibrotic action of 9-cis-retinoic acid in glomerular mesangial cells. *Am J Pathol*, 167: 947-957.
127. Ferré P. (2004) The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. *Diabetes*, 53: S43-50.
128. Chen Y, Stallings RL. (2007) Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res*, 67: 976-983.
129. Saumet A, Vetter G, Bouttier M, Antoine E, Roubert C, Orsetti B, Theillet C, Lecellier CH. (2012) Estrogen and retinoic acid antagonistically regulate several microRNA genes to control aerobic glycolysis in breast cancer cells. *Mol Biosyst*, 8: 3242-3253.
130. Zhao JJ, Yang J, Lin J, Yao N, Zhu Y, Zheng J, Xu J, Cheng JQ, Lin JY, Ma X. (2009) Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis. *Childs Nerv Syst*, 25: 13-20.
131. Tong JL, Zhang CP, Nie F, Xu XT, Zhu MM, Xiao SD, Ran ZH. (2011) MicroRNA 506 regulates expression of PPARalpha in hydroxycamptothecin-resistant human colon cancer cells. *FEBS Lett*, 585: 3560-3568.
132. Romao JM, Jin W, Dodson MV, Hausman GJ, Moore SS, Guan LL. (2011) MicroRNA regulation in mammalian adipogenesis. *Exp Biol Med*, 236: 997-1004.
133. Kent OA, Mullendore M, Wentzel EA, López-Romero P, Tan AC, Alvarez H, West K, Ochs MF, Hidalgo M, Arking DE, Maitra A, Mendell JT. (2009) A resource for analysis of microRNA expression and function in pancreatic ductal adenocarcinoma cells. *Cancer Biol Ther*, 8: 2013-2024.

134. Rachagani S, Kumar S, Batra SK. (2010) MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Lett*, 292: 8-16.
135. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Visentini M, Aqeilan R, Cimmino A, Wang H, Sun H, Volinia S, Alder H, Calin GA, Liu CG, Andreeff M, Croce CM. (2007) MicroRNA gene expression during retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 26: 4148-4157.
136. Puga A, Marlowe J, Barnes S, Chang CY, Maier A, Tan Z, Kerzee JK, Chang X, Strobeck M, Knudsen ES. (2002) Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Toxicology* 2002, 182: 171-7.
137. Barouki R, Coumoul X, Fernandez-Salguero PM. (2007) The aryl hydrocarbon receptor, more than a xenobiotic-interacting protein. *FEBS Lett*, 581: 3608-15.
138. Liebermann DA, Tront JS, Sha X, Mukherjee K, Mohamed-Hadley A, Hoffman B. (2011) Gadd45 stress sensors in malignancy and leukemia. *Crit Rev Oncog*, 16: 129-140.
139. Augoff K, Das M, Bialkowska K, McCue B, Plow EF, Sossey-Alaoui K. (2011) miR-31 is a broad regulator of β 1-integrin expression and function in cancer cells. *Mol Cancer Res*, 9: 1500-1508.
140. Penna E, Orso F, Cimino D, Tenaglia E, Lembo A, Quaglino E, Poliseno L, Haimovic A, Osella-Abate S, De Pittà C, Pinatel E, Stadler MB, Provero P, Bernengo MG, Osman I, Taverna D. (2011) microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *EMBO J*, 30: 1990-2007.
141. Oneyama C, Morii E, Okuzaki D, Takahashi Y, Ikeda J, Wakabayashi N, Akamatsu H, Tsujimoto M, Nishida T, Aozasa K, Okada M. (2012) MicroRNA-mediated upregulation of integrin-linked kinase promotes Src-induced tumor progression. *Oncogene*, 31: 1623-1635.
142. Huang L, Luo J, Cai Q, Pan Q, Zeng H, Guo Z, Dong W, Huang J, Lin T. (2011) MicroRNA-125b suppresses the development of bladder cancer by targeting E2F3. *Int J Cancer*, 128: 1758-1769.
143. Legesse-Miller A, Elemento O, Pfau SJ, Forman JJ, Tavazoie S, Collier HA. (2009) let-7 Overexpression leads to an increased fraction of cells in G2/M,

direct down-regulation of Cdc34, and stabilization of Wee1 kinase in primary fibroblasts. *J Biol Chem*, 284: 6605-6609.

144. Liu C, Kelnar K, Vlassov AV, Brown D, Wang J, Tang DG. (2012) Distinct microRNA expression profiles in prostate cancer stem/progenitor cells and tumor-suppressive functions of let-7. *Cancer Res*, 72: 3393-3404.
145. Jia HY, Wang YX, Yan WT, Li HY, Tian YZ, Wang SM, Zhao HL. (2012) MicroRNA-125b Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci*, 13: 8762-8774.
146. Zhang Y, Yan LX, Wu QN, Du ZM, Chen J, Liao DZ, Huang MY, Hou JH, Wu QL, Zeng MS, Huang WL, Zeng YX, Shao JY. (2011) miR-125b is methylated and functions as a tumor suppressor by regulating the ETS1 proto-oncogene in human invasive breast cancer. *Cancer Res*, 71: 3552-3562.
147. Lin KY, Zhang XJ, Feng DD, Zhang H, Zeng CW, Han BW, Zhou AD, Qu LH, Xu L, Chen YQ. (2011) miR-125b, a target of CDX2, regulates cell differentiation through repression of the core binding factor in hematopoietic malignancies. *J Biol Chem*, 286: 38253-38263.
148. Duan Z, Choy E, Harmon D, Liu X, Susa M, Mankin H, Hornicek F. (2011) MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration. *Mol Cancer Ther*, 10: 1337-1345.
149. Shen L, Li J, Xu L, Ma J, Li H, Xiao X, Zhao J, Fang L. (2012) miR-497 induces apoptosis of breast cancer cells by targeting Bcl-w. *Exp Ther Med*, 3: 475-480.

XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

XI.1. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények jegyzéke

1. **Zsippai A**, Szabó PM, Szabó DR, Nagy Z, Patócs A, Rácz K, Igaz P. (2013) In silico analysis of pathways affected by differentially expressed microRNAs in adrenocortical tumors. *J Endocrinol Invest*, DOI: 10.3275/9024. IF: 1,566
2. **Zsippai A**, Szabó DR, Tömböl Zs, Szabó PM, Éder K, Pállinger É, Gaillard RC, Patócs A, Tóth S, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2012) Effects of mitotane on gene expression in the adrenocortical cell line NCL-H295R: microarray study. *Pharmacogenomics*, 13: 1351-1361. IF: 3.974
3. **Zsippai A**, Szabó DR, Szabó PM, Tömböl Z, Bendes MR, Nagy Z, Rácz K, Igaz P. (2011) mRNA and microRNA expression patterns in adrenocortical cancer. *American Journal of Cancer Research*, 1: 618-628.
4. **Zsippai A**, Szabó DR, Szabó PM, Tömböl Z, Rácz K, Igaz P. (2010) Génexpressziós vizsgálatok mellékvesekéreg daganatokban. *Magyar Belorvosi Archivum*, 63: 425-434.
5. Nagy Z, Szabó DR, **Zsippai A**, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2012) A hosszú, nem kodoló RNS-ek jelentősége a daganatbiológiában. *Orv Hetilap*, 153: 1494-501.
6. Szabó D, Tömböl Z, **Zsippai A**, Szabó P, Patócs A, Rácz K, Igaz P. (2010) A mikro-RNS expresszió vizsgálata mellékvesekéreg és mellékvesevelő daganatokban. *Magyar Belorvosi Archivum*, 2: 102.
7. Szabó D, **Zsippai A**, Bendes M, Tömböl Z, Szabó PM, Rácz K, Igaz P. (2010) A mellékvesekéreg carcinoma molekuláris patogenezise. *Orvosi Hetilap*, 151: 1163-1170.

XI.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények jegyzéke

1. Szabó PM, Pintér M, Szabó DR, **Zsippai A**, Patócs A, Falus A, Rácz K, Igaz P. (2012) Integrative analysis of neuroblastoma and pheochromocytoma genomics data. BMC Medical Genomics, 5: 48. IF: 3.693

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori munkám elkészítésével kapcsolatban köszönetemet szeretném kifejezni:

- Elsősorban programvezetőmnek, Dr. Rácz Károly Professor Úrnak, az MTA doktorának, aki lehetőséget biztosított a kutatási munkám elvégzésére;
- Témavezetőmnek, Dr. Igaz Péter egyetemi docensnek, az MTA doktorának, aki tanított, a munkámat végig figyelemmel kísérte, s segített az eredmények értékelésében és publikálásában;
- Dr. Falus András Professor Úrnak, aki lehetővé tette, hogy kísérletes munkámat a Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézetében végezzem;
- Dr. Éder Katalinnak és Dr. Pálinger Évának a vizsgálatok kivitelezésében és statisztikai elemzésében nyújtott segítségükért;
- A II. sz. Belgyógyászati Klinika volt és jelenlegi PhD hallgatóinak, akik segítségükkel megkönnyítették munkámat;
- A II. sz. Belgyógyászati Klinika orvosainak és laboratóriumi asszisztenseinek, akik barátsággal vettek körül;
- Végül, de semmiképpen sem utolsó sorban külön köszönettel tartozom édesanyámnak és testvéremnek, hogy munkám elkészítése során mindvégig türelemmel és szeretettel támogattak.

XIII. MELLÉKLETEK

Melléklet 1. táblázat: *A 63 szignifikánsan expresszáldó gén listája 48 órás kontroll és mitotán-kezelt mintákban (p-érték<0.05).*

Gén	Fold change	Gén név
GDF15	7.965613	növekedési és differenciációs faktor 15
ALDH1L2	6.952101	aldehid dehidrogenáz 1, L2. tagja
LAMP3	6.464083	lizoszóma-asszociált membrán protein 1
BC021677	5.023622	BC021677 klón
FAM129A	4.9363112	család szekvencia hasonlóság 129
TRIB3	4.525841	tribbles homológ 3
SLC43A1	3.9323595	solute carrier 43 fehérje család 1. tagja
DDIT3	3.6217215	DNS-károsodás-indukálta transzkripció 3
SERPINE2	3.4479864	szerin peptidáz inhibitor 2-es típusa
COL25A1	2.9896002	kollagén 25A1-es típusa
THC2568453	2.9139361	humán ts1 lsejtciklus szabályozó fehérje
LOC651255	2.8542912	foszfoszerin aminoszferáz izoforma 2
SLC7A11	2.754193	solute carrier 7 fehérje család 11. tagja
ASNS	2.7018478	aszparagin szintetáz
NUPR1	2.6567478	nukleáris fehérje 1
CHAC1	2.5871449	Chac, kation transzport regulátor homológ 1
XBP1	2.4638224	x-box kötő fehérje 1
CACNA1C	2.397782	Kalcium csatorna alfa 1C alegység
PSAT1	2.3319347	foszfoszerin aminoszferáz 1
ARHGEF2	2.3216443	rho/rac guanin nukleotid faktor 2
CCPG1	2.3140244	sejtciklus progresszió 1
PRPH	2.2632241	periferin
CBS	2.2557511	cisztation béta-szintetáz
SNCAIP	2.1997721	alfa-szinuklein fehérje
PCK2	2.1931915	foszfoenolpiruvát karboxikináz 2
LOC283454	2.177399	LOC283454 klón
TNFSF4	2.1244445	tumor nekrozis faktor 4
WARS	2.1215029	triptofenil-tRNS szintetáz 1
KIAA0746	2.116417	KIAA0746 fehérje
THC2651023	2.1054547	THC2651023
CUTL2	2.0955055	cut-like 2
SESN2	2.0879998	szesztrin 2
RASEF	2.0757992	EF-hand motívumot tartalmazó domén

THC2565422	2.0412114	Alu1
SMOX	2.0054536	spermin oxidáz
THC2656240	-2.0120676	THC2656240 fehérje
CABP7	-2.0375497	kalcium kötő fehérje 7
ENC1	-2.0376763	ektodermális-neurális kéreg
TXNIP	-2.0778475	thioredoxin kölcsönható fehérje
AK055386	-2.092817	AK055386 klón
ABCG1	-2.1242626	ATP-kötő kazetta G1
BI836739	-2.1277587	BI836739 klón
GSTA2	-2.141061	glutation-S-transzferáz A2
MVD	-2.1571555	mevalonát dekarboxiláz
DPYSL3	-2.164325	dihidropirimidináz 3
TNNC2	-2.1682138	troponin C2
GSTA1	-2.1929822	glutation-S-transzferáz A1
AF132203	-2.4017096	AF132203 klón
GNRHR	-2.4472418	gonadotropin felszabadító hormon receptor
FADS2	-2.4966803	zsírsav deszaturáz 2
FATE1	-2.525735	magzati és felnőtt tesztisz expresszió 1
AK126976	-2.6857297	AK126976 klón
ACAN	-2.6962335	aggrekan
SCD	-2.7653248	sztearoil-CoA deszaturáz
CDH22	-2.8088796	kadherin 22
FOXA2	-2.953749	forkhead box A2
LILRB5	-2.9911368	leukocita immunglobulin-szerű receptor B
LOC391081	-3.1429236	LOC391081 klón
HSD3B2	-3.2087908	3 béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz/delta(5)-delta(4) izomeráz 2
ELOVL3	-3.2236772	hosszú láncú zsírsavak nyúlása
HSD3B1	-3.2410967	3 béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz/delta(5)-delta(4) izomeráz 1
SREBF1	-3.313674	szterol szabályozó elemet kötő fehérje 1
CACNA2D3	-4.4327903	feszültség-függő kalcium csatorna alfa(2)-delta(3)

Melléklet 2. táblázat: A 111 szignifikánsan expresszáldó gének listája 72 órás kontroll és mitotán-kezelt mintákban (p -érték <0.05).

Gén	Fold change	Gén név
GDF15	10.369968	növekedési és differenciációs faktor 15
FAM129A	8.822195	család szekvencia hasonlóság 129
LAMP3	8.347355	lizoszóma-asszociált membrán protein 1
ALDH1L2	6.725974	aldehid dehidrogenáz 1, L2. tagja
TRIB3	6.172482	tribbles homológ 3
SERPINE2	5.107932	szerin peptidáz inhibitor 2-es típusa
SLC43A1	4.355308	solute carrier 43 fehérje család 1. tagja
COL25A1	3.950299	kollagén 25A1-es típusa
PRKCH	3.9130836	protein kináz C
LOC283454	3.4810157	LOC283454 klón
SLC7A11	3.4435337	solute carrier 7 fehérje család 11. tagja
CUX2	3.3991618	cut-like 2
NUPR1	3.356615	nukleáris fehérje 1
DDIT3	3.175093	DNS-károsodás-indukálta transzkripció 3
ARHGEF2	2.9882467	rho/rac guanin nukleotid faktor 2
KIRREL3	2.8751795	kin of IRRE like 3, transcript variant 1
CHAC1	2.8181992	Chac, kation transzport regulátor homológ 1
CACNA1C	2.7999635	kalcium csatorna alfa 1C alegység
XBP1	2.7589562	x-box kötő fehérje 1
RASEF	2.741239	EF-hand motívumot tartalmazó domén
SEL1L3	2.73596	lin-12-like 3 sel-1 szupresszora
ASNS	2.6732237	aszparagin szintetáz
WARS	2.6068199	triptofenil-tRNS szintetáz 1
ATF3	2.434544	aktiváló transzkripciós faktor 3
MYH7B	2.4026759	miozin, nehéz lánc 7B
CCPG1	2.3977635	sejtciklus progresszió 1
CPAMD8	2.3751953	C3 és PZP-szerű, alfa-2-makroglobulin domén 8
PSAT1	2.3594356	foszfoszerin aminotranszferáz 1
SESN2	2.353093	szesztrin 2
ANKRD2	2.3475528	ankyrin ismétlődő domén 2
SERPINB8	2.3453617	Serpin peptidáz inhibitor B8
HRK	2.3011377	harakiri
PCK2	2.2966945	foszfoenolpiruvát karboxikináz 2
IGFBP3	2.282354	inzuli-szerű növekedési faktor kötő fehérje 3
CBS	2.2556229	cisztation béta-szintetáz
TNFSF4	2.255069	tumor nekrozis faktor 4

SMOX	2.2364128	spermin oxidáz
SELENBP1	2.2204115	szelén-kötő fehérje 1
ARG2	2.2064605	argináz II
DFNB31	2.2060077	süketség autoszomális recesszív 31
GPC4	2.1936858	glypican 4
IL17D	2.169401	interleukin 17D
CXCL14	2.1516523	kemokin ligand 14
GAS5	2.138163	growth arrest-specific 5
PGM2L1	2.0840347	foszfoglukomutáz 2
LOC90499	2.0611699	LOC90499 klón
NKD1	2.0513608	kutikula homológ 1
RAI2	2.0426538	retinsav indukció 1
SLC1A5	2.0375004	oldott anyag hordozó család 1
PYCR1	2.015634	pirrolin-5-karboxilát-reduktáz 1
CA2	-2.0223575	szénsav-anhidráz II
FADS1	-2.0279121	zsírsav deszaturáz 1
APOC1	-2.0347295	apolipoprotein C-I
FGFR1	-2.0361063	fibroblaszt növekedési faktor receptor 1
CABP7	-2.0418954	kalcium kötő fehérje 7
DENND1C	-2.043041	DENN/MADD domént tartalmazó 1C
C7orf58	-2.0626624	7-es kromoszóma nyitott leolvasási keret 58
GTDC1	-2.069291	glikoziltranszferáz-szerű domén 1
ABCA1	-2.0880766	ATP-kötő kazetta G1
TCERG1L	-2.096455	transzkripció elongáció regulátor 1
GALNTL4	-2.1046	polipeptid N-acetylgalactosaminyltransferase 4
SULT2A1	-2.1174257	szulfotranszferáz család
JAKMIP1	-2.1179254	janus kináz és mikrotubulus kölcsönható protein 1
C4B	-2.1332862	komplement komponens 4B
KCNB1	-2.150338	feszültség-függő kalcium csatorna alfa(2)-delta(3)
NAV3	-2.1591074	neuron navigátor 3
ENC1	-2.166747	ektodermális-neurális kortex
TUBB4	-2.215371	tubulin, béta 4
IL22RA1	-2.222795	interleukin receptor 22, alfa 1
MMP15	-2.2248092	mátrix metallopeptidáz 15
ACVRL1	-2.2358372	aktivin A receptor II típus
GSTA5	-2.2676132	glutation-S-transzferáz A5
TMPRSS9	-2.3099651	TMPRSS9 klón
GSTA2	-2.3136551	glutation-S-transzferáz A2
FAM107A	-2.323023	család szekvencia hasonlóság A107
SREBF1	-2.3295834	szterol szabályozó elemet kötő fehérje 1
TMEM108	-2.34259	transzmembrán fehérje 108

FADS2	-2.3467379	zsírsav deszaturáz 2
BCL2	-2.3558073	B-sejtes CLL/lymphoma
MGC24125	-2.3691096	hipotetikus fehérje
GPR56	-2.3717976	G-fehérjéhez kapcsolt receptor 56
LOC389895	-2.4249325	LOC389895 klón
SCD	-2.4459105	sztearoil-CoA deszaturáz
KIAA1199	-2.5053575	KIAA1199
RBP5	-2.5126584	retinol kötő fehérje 5
TMEM105	-2.5450783	transzmembrán fehérje 105
CXCR4	-2.5968928	kemokin receptor 4
LOC728175	-2.6632924	LOC728175 klón
ASS1	-2.68052	arginin-szintetáz 1
CYP19A1	-2.690158	citokróm p540 19A1
GSTA1	-2.8338006	glutation-S-transzferáz 1 alfa
SCEL	-2.8703296	sciellin
EFNB1	-2.8836303	ephrin-B1
PLD5	-2.9365761	foszfolipáz D család
CLEC4M	-2.9849143	C-típusú lektin domén család 4
TNNC2	-3.109274	troponin C2
CDH22	-3.2127402	kadherin 22
LIFR	-3.2137709	leukémia gátló faktor receptor alfa
TXNIP	-3.248922	tioredoxin kölcsönható fehérje
CYP21A2	-3.3632183	citokróm p540 21A2
PTGS1	-3.4201837	prostaglandin-endoperoxidot szintetáz 1
GNRHR	-3.8026192	gonadotropin felszabadító hormon receptor
FOXA2	-3.8649154	forkhead box A2
ELOVL3	-3.8782437	hosszú láncú zsírsavak nyúlása
OLFML2B	-5.1897807	olfactomedin-like 2B
FATE1	-5.560288	magzati és felnőtt tesztisz expresszió 1
ACAN	-6.225452	aggrecan
CACNA2D3	-6.4313593	kalcium csatorna alfa(2)-delta(3)
LOC391081	-7.410652	LOC391081 klón
HSD3B2	-7.4435167	3 béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz/delta(5)-delta(4) izomeráz 2
HSD3B1	-7.6767287	3 béta-hidroxiszteroid-dehidrogenáz/delta(5)-delta(4) izomeráz 1

Melléklet 3. táblázat: Az alul- és felülexpresszáldó GO génkészletek a 48 órás mitotán kezelt csoportban.

ALULEXPRESSZÁLDÓ GO GÉNKÉSZLETEK A 48 ÓRÁS MITOTÁN CSOPORTBAN							
GO KATEGÓRIA	Gén készlet mérete	Dúsítási pont	Normalizált dúsítási pont	NOM p- érték	FDR q- érték	FWER p- érték	Rank max.
LIPID BIOSZINTÉZIS FOLYAMATA	79	0,562	1,994	0	0,026	0,013	1371
IZOMERÁZ AKTIVITÁS	30	0,659	1,973	0	0,027	0,041	272
MITOTIKUS SEJTCIKLUS INTERFÁZISA	54	0,459	1,936	0	0,042	0,092	2548
AUXILIARIY TRANSZPORT FEHÉRJE AKTIVITÁS	23	0,604	1,916	0	0,052	0,102	3414
RHO FEHÉRJE JELÁTVITEL	35	0,546	1,845	0	0,056	0,202	2799
OXIGÉN KÖTÉS	21	0,715	1,856	0	0,059	0,187	336
TRANSZFERÁZ AKTIVITÁS	26	0,748	1,892	0	0,063	0,162	2014
OXIDOREDUKTÁZ TEVÉKENYSÉG	34	0,516	1,785	0	0,064	0,343	1749
INTERFÁZIS	57	0,445	1,862	0	0,066	0,187	2548
JNK AKTIVITÁS REGULÁCIÓJA	18	0,593	1,768	0	0,067	0,343	1173
RAS FEHÉRJE SIGNAL TRANSZDUKCIÓ REGULÁCIÓJA	16	0,637	1,786	0	0,068	0,343	1074
GTPÁZ MEDIÁLT SIGNAL TRANSZDUKCIÓ REGULÁCIÓJA	20	0,583	1,823	0	0,07	0,25	1074
SZTEROID BIOSZINTÉZIS FOLYAMATA	22	0,613	1,792	0	0,071	0,343	1313
LIPID TRANSZPORT	26	0,623	1,798	0	0,072	0,343	3338
RAS FEHÉRJE SZIGNAL TRANSZDUKCIÓ	61	0,475	1,733	0	0,073	0,422	2980
MITOTIKUS SEJT CIKLUS M FÁZISA	66	0,486	1,731	0	0,073	0,435	3574
SZTEROID METABOLIKUS FOLYAMATA	62	0,46	1,74	0	0,074	0,408	2212
GLUTATION	15	0,805	1,734	0	0,074	0,422	2014

TRANSZFERÁZ AKTIVITÁS							
MITOTIKUS SEJT CIKLUS	122	0,396	1,743	0	0,076	0,408	3166
KROMATIN KÖTÉS	26	0,618	1,804	0	0,076	0,333	2396
CSATORNA SZABÁLYOZÓ AKTIVITÁS	21	0,651	1,823	0	0,076	0,25	3414
MITÓZIS	64	0,496	1,751	0	0,077	0,395	3574
M FÁZIS	93	0,44	1,721	0	0,079	0,482	4683
ICOSANOID METABOLIKUS FOLYAMATA	15	0,758	1,807	0	0,079	0,333	3292
NÖVEKEDÉS	64	0,462	1,704	0	0,087	0,504	1863
INTRAMOLEKULÁRIS OXIDOREDUKTÁZ AKTIVITÁS	15	0,646	1,697	0	0,092	0,504	3237
MYELOID SEJT DIFFERENCIÁLÓDÁS REGULÁCIÓJA	16	0,561	1,691	0	0,093	0,517	1136
RNS SPLICING	76	0,563	1,683	0	0,098	0,578	4393
LIPID TRANSZPORTER AKTIVITÁS	26	0,512	1,673	0	0,099	0,61	2013
SPLICEOSOMA	37	0,565	1,684	0	0,099	0,578	4393
APOPTOTIKUS NUCLEÁRIS VÁLTOZÁSOK	16	0,592	1,67	0	0,099	0,61	2806
SEJT CIKLUS FOLYAMATOK	158	0,391	1,673	0	0,102	0,61	3166
SEJT CIKLUS FÁZIS	140	0,386	1,676	0	0,103	0,61	3166
IZOM ÖSSZEHÚZÓDÁS REGULÁCIÓJA	17	0,635	1,66	0	0,105	0,626	927
OXIDOREDUKTÁZ AKTIVÍTÁSRA HATÓ CH CH DONOR CSOPORTOK	21	0,539	1,662	0	0,106	0,626	1066
KINETOCHOR	21	0,541	1,655	0	0,109	0,662	2808
FELÜLEXPRESSZÁLÓDÓ GO GÉNKÉSZLETEK A 48 ÓRÁS MITOTÁN CSOPORTBAN							
GO KATEGÓRIA	Gén készlet mérete	Dúsítási pont	Normalizált dúsítási pont	NOM p- érték	FDR q- érték	FWER p-érték	Rank max.
AMINOSAV TRANSZPORT	25	-0,597	-1,764	0	0,117	0,363	2548

Melléklet 4. táblázat: Az alul- és felülexpresszállódó GO génkészletek a 72 órás mitotán kezelt csoportban.

ALULEXPRESSZÁLÓDÓ GO GÉNKÉSZLETEK A 72 ÓRÁS MITOTÁN CSOPORTBAN							
GO KATEGÓRIA	Gén készlet mérete	Dúsítási pont	Normalizált dúsítási pont	NOM p-érték	FDR q-érték	FWER p-érték	Rank max.
ZSÍRSAV METABOLIKUS FOLYAMATA	53	0,53	2,16	0	0,02	0,015	864
LIPID BIOSZINTÉZIS FOLYAMATA	79	0,622	2,279	0	0,02	0	248
SPINDLE	33	0,762	2,141	0	0,02	0,015	1412
VEZIKULÁRIS FRAKCIO	41	0,586	2,042	0	0,02	0,027	2006
MIKROSZOMA	39	0,611	2,074	0	0,02	0,027	2006
INTRAMOLEKULÁRIS OXIDOREDUKTÁZ AKTIVITÁS	15	0,674	2,037	0	0,02	0,027	1456
SZTEROID BIOSZINTÉZIS FOLYAMATA	22	0,764	2,027	0	0,02	0,027	1830
SZTEROID METABOLIKUS FOLYAMATA	62	0,587	2,054	0	0,02	0,027	1830
KINETOCHOR	21	0,754	2,02	0	0,02	0,042	852
OXIDOREDUKTÁZ AKTIVITÁSRA HATÓ CH CH DONOR CSOPORTOK	55	0,542	1,967	0	0,02	0,07	2290
OXIDOREDUKTÁZ AKTIVITÁS	51	0,559	1,954	0	0,02	0,093	3213
NUKLEÁRIS BODY	30	0,591	1,966	0	0,02	0,07	3032
KOFAKTOR BIOSZINTETIKUS FOLYAMATA	18	0,67	1,973	0	0,02	0,07	1644
KROMOSZÓMA PERICENTRIKUS RÉGIÓ	26	0,735	1,975	0	0,02	0,07	1015
CELLULÁRIS LIPID METABOLIKUS FOLYAMATA	213	0,425	1,983	0	0,02	0,07	2330
MITOKONDRIÁLIS RÉSZ	130	0,528	1,852	0	0,03	0,191	3854
LIPID METABOLIKUS FOLYAMATA	276	0,392	1,897	0	0,03	0,15	2330
HORMONE METABOLIKUS	29	0,49	1,909	0	0,03	0,134	1756

FOLYAMATA							
MITOKONDRIÁLIS ENVELOPE	86	0,536	1,836	0	0,03	0,191	3272
MITÓZIS	64	0,598	1,854	0	0,03	0,191	1533
OXIGÉN KÖTÉS	21	0,616	1,859	0	0,03	0,191	1012
GLUTATION TRANSZFERÁZ AKTIVITÁS	15	0,821	1,857	0	0,03	0,191	2293
RAS FEHÉRJE SZIGNÁL TRANSZDUKCIÓ	61	0,494	1,859	0	0,03	0,191	2103
MITOKONDRIÁLIS MEMBRÁN	77	0,566	1,859	0	0,03	0,191	3854
TRANSZFERÁZ AKTIVITÁS	26	0,731	1,9	0	0,03	0,15	3646
ORGANIKUS ENVELOPE	151	0,496	1,862	0	0,03	0,191	3357
RHO FEHÉRJE JELÁTVITEL	35	0,55	1,883	0	0,03	0,161	2103
OXIDOREDUKTÁZ AKTIVITÁS	34	0,559	1,812	0	0,03	0,224	1112
MITOTIKUS SEJT CIKLUS M FÁZISA	66	0,582	1,81	0	0,03	0,224	1533
KARBON LIÁZ AKTIVITÁS	17	0,706	1,86	0	0,03	0,191	1964
MONOKARBONSAV ANYAGCSERE FOLYAMAT	76	0,431	1,803	0	0,03	0,259	2290
ORGANIKUS BELSŐ-MEMBRÁN	71	0,527	1,802	0	0,03	0,259	3854
MITOKONDRIÁLIS BELSŐ-MEMBRÁN	63	0,562	1,819	0	0,03	0,224	3854
ENVELOPE	151	0,496	1,862	0	0,03	0,191	3357
ISOMERÁZ AKTIVITÁS	30	0,534	1,788	0	0,03	0,286	2563
RNS SPLICING	29	0,58	1,786	0	0,03	0,286	3650
MITÓZIS REGULÁCIÓ	34	0,58	1,788	0	0,03	0,286	1447
PROTEASOMÁLIS KOMPLEX	23	0,643	1,792	0	0,03	0,274	4362
SZTEROID KÖTÉS	16	0,743	1,778	0	0,03	0,286	1047
MICROTUBULÁRIS CENTER	55	0,571	1,796	0	0,03	0,274	2685
KERATINOCYTÁK DIFFERENCIÁLÓDÁSA	15	0,596	1,774	0	0,03	0,286	1613
ORSÓ PÓLUS	16	0,714	1,76	0	0,03	0,335	1412
OXIDOREDUKTÁZ AKTIVITÁS	255	0,386	1,76	0	0,03	0,335	3213
LIPID HOMEOSZTÁZIS	15	0,659	1,76	0	0,03	0,335	1210

SZÍV FEJLŐDÉS	33	0,545	1,733	0	0,04	0,392	621
ORSÓ MIKROTUBULUS	15	0,703	1,734	0	0,04	0,392	2758
RIBONUKLEINSAV KOMPLEX	106	0,48	1,728	0	0,04	0,437	4054
IMMUN-EFFEKT FOLYAMAT	32	0,522	1,741	0	0,04	0,378	896
OXIDOREDUKTÁZ AKTIVÍTÁSRA HATÓ CH CH DONOR CSOPORTOK	21	0,533	1,742	0,03	0,04	0,378	2714
KROMATIN ÖSSZERAKÁS VAGY SZÉTSZERELÉS	25	0,577	1,729	0	0,04	0,407	3601
RIBONUKLEÁZ AKTIVITÁS	23	0,592	1,743	0	0,04	0,378	2883
GTPÁZ MEDIÁLT SIGNAL TRANSZDUKCIÓ REGULÁCIÓJA	81	0,416	1,717	0	0,04	0,463	2103
LIÁZ AKTIVITÁS	66	0,449	1,718	0	0,04	0,463	2013
CENTROSOMA	47	0,556	1,718	0	0,04	0,463	2522
KROMOSZÓMA RÉSZ	81	0,486	1,709	0	0,04	0,49	1587
EPIDERMISZ FEJLŐDÉS	64	0,402	1,705	0	0,04	0,49	850
KOENZIM METABOLIKUS FOLYAMAT	33	0,501	1,701	0	0,04	0,49	1837
NUKLEINSAV TRANSZPORT	26	0,57	1,704	0	0,04	0,49	3183
KÜLSŐ MEMBRÁN	20	0,694	1,702	0	0,04	0,49	839
KROMOSZOMA	105	0,491	1,689	0	0,05	0,547	3709
ORGANIKUS KÜLSŐ MEMBRÁN	19	0,688	1,689	0	0,05	0,517	386
NUCLEÁRIS RIBONUKLEOPROTEIN KOMPLEX	18	0,711	1,69	0	0,05	0,517	3579
RNS SPLICING	76	0,485	1,683	0	0,05	0,566	4567
MOTOROS AKTIVITÁS	25	0,574	1,684	0	0,05	0,566	2178
ANATOMIAI SZERKEZETI MORFOGENEZIS REGULÁCIÓJA	24	0,545	1,675	0	0,05	0,603	2153
KOFAKTOR METABOLIKUS FOLYAMATA	46	0,431	1,66	0	0,06	0,668	1837
CYTOKINEZIS	18	0,596	1,654	0	0,06	0,668	2596
SEJT CIKLUS FOLYAMATOK	158	0,462	1,646	0	0,06	0,668	3570
VÉRNYOMÁS REGULÁCIÓJA	20	0,495	1,656	0	0,06	0,668	619
KROMATIN ÖSSZEÁLLÍTÁS	15	0,629	1,655	0	0,06	0,668	3601

CITOKIN RECEPTOR AKTIVITÁS	31	0,49	1,643	0	0,06	0,679	2962
M FÁZIS	93	0,511	1,652	0	0,06	0,668	3316
RNS EXPORT NUKLEUSBÓL	16	0,583	1,648	0	0,06	0,668	3093
EKTODERMA FEJLŐDÉSE	72	0,367	1,627	0	0,06	0,725	850
MONOOXIGENÁZ AKTIVITÁS	28	0,497	1,632	0,02	0,06	0,725	4573
SZEREK VÁLASZREAKCIÓJA	20	0,528	1,631	0	0,06	0,725	1822
NUCLEÁRIS ENVELOPE	65	0,467	1,619	0	0,07	0,738	3357
DNS POLIMERÁZ AKTIVITÁS	15	0,609	1,621	0	0,07	0,738	4046
MITOKONDRIÁLIS MÁTRIX	45	0,508	1,614	0	0,07	0,738	3842
MITOCHONDRIÁLIS LUMEN	45	0,508	1,614	0	0,07	0,738	3842
CIKLIN FÜGGŐ PROTEIN KINÁZ REGULÁCIÓJA	41	0,425	1,606	0	0,07	0,738	1622
ALKOHOL METABOLIKUS FOLYAMATA	78	0,454	1,603	0	0,07	0,738	2028
VÁLASZREAKCIÓ UV-RA	22	0,512	1,594	0	0,08	0,757	1990
DNS JAVÍTÁS	106	0,431	1,589	0	0,08	0,775	1902
VÁLASZREAKCIÓ VÍRUSRA	41	0,463	1,586	0	0,08	0,775	4529
SPLICEOSOMA	37	0,521	1,583	0	0,08	0,775	4054
SEJTOSZTÓDÁS	20	0,541	1,582	0,043	0,08	0,775	2596
NUCLEÁRIS EXPORT	27	0,545	1,585	0	0,08	0,775	4072
MIKROTUBULÁRIS CITOSZKELETON	124	0,397	1,576	0	0,08	0,775	3012
MITOTIKUS SEJT CIKLUS	122	0,434	1,575	0,036	0,08	0,775	1735
SEJTCIKLUS FÁZIS	140	0,441	1,577	0	0,08	0,775	3570
KROMATIN ÁTALAKÍTÓ KOMPLEX	16	0,609	1,574	0	0,08	0,788	4139
SEJT-SEJT ADHÉZIÓ	72	0,366	1,571	0	0,08	0,788	2897
SEJTMAG ENDOPLAZMÁS RETIKULUM	75	0,414	1,57	0	0,08	0,788	434
BIOSZINTETIKUS FOLYAMATOK	388	0,34	1,556	0	0,09	0,788	2328
KROMATIN KÖTÉS	26	0,558	1,564	0	0,09	0,788	2054
MITOKONDRIÁLIS RIBOSZOMA	22	0,649	1,557	0	0,09	0,788	1745
ORGANIKUS RIBOSZOMA	22	0,649	1,557	0	0,09	0,788	1745

RNS KATABOLIKUS FOLYAMATA	17	0,518	1,548	0,027	0,09	0,788	2441
KROMATIN SZERKEZET LÉTREHOZÁSA, KARBANTARTÁSA	64	0,385	1,546	0,028	0,09	0,788	3601
NUKLEÁRIS PORE	27	0,505	1,545	0,028	0,09	0,788	4229
AMINOSAV KÖTÖTT GLIKOZILÁCIÓ	25	0,541	1,54	0,036	0,09	0,788	484
LIPID TRANSZPORT	26	0,606	1,544	0	0,09	0,788	1210
MEMBRÁN FRAKCIÓ	307	0,334	1,537	0	0,09	0,788	1556
SEJTCIKLUS	267	0,389	1,541	0	0,09	0,788	3570
ENDONUKLEÁZ AKTIVITÁS	22	0,562	1,542	0	0,09	0,788	2883
ICOSANOID METABOLIKUS FOLYAMATA	15	0,689	1,534	0	0,09	0,799	2290
RNS FOLYAMAT	127	0,415	1,535	0	0,09	0,799	3859
LIGAND CSATORNA AKTIVITÁS	35	0,433	1,527	0	0,1	0,799	200
SPLICEOSZOMÁLIS ÖSSZEÁLLÍTÁS	17	0,539	1,516	0	0,1	0,808	5195
VÁLASZ MÁS ORGANIZMUSOKRA	69	0,402	1,513	0,033	0,1	0,808	1595
SZEKRÉCIÓ REGULÁCIÓJA	29	0,445	1,509	0,022	0,1	0,82	1400
RITMIKUS FOLYAMATOK	20	0,421	1,506	0	0,1	0,837	2434
MEMBRÁN LIPID BIOSZINTÉZIS FOLYAMAT	39	0,382	1,5	0	0,11	0,854	190
EGY KARBONBÓL ÁLLÓ ANYAGCSERE FOLYAMATOK	19	0,476	1,501	0	0,11	0,854	1201
KETTŐS SZÁLÚ DNS KÖTÉS	30	0,421	1,496	0	0,11	0,854	2100
VÁLASZ A VÁDEKEZÉSI FOLYAMATOKRA	17	0,502	1,494	0,03	0,11	0,854	4978
NUCLEÁRIS RÉSZ	449	0,328	1,48	0	0,12	0,875	4332
IZOM ÖSSZEHÚZÓDÁS REGULÁCIÓJA	17	0,52	1,478	0	0,12	0,875	2276
SŰRITETT KROMOSZÓMÁK	24	0,576	1,475	0,047	0,12	0,875	3601
NUKLEOPLASMA RÉSZ	165	0,327	1,476	0	0,12	0,875	3957
VÁLASZ A DNS-KÁROSODÁSRA	134	0,376	1,47	0	0,12	0,875	1902
SZERVETLEN KATION TRANSZMEMBRÁN	53	0,377	1,473	0	0,12	0,875	417

TEVÉKENYSÉG							
METILTRANSZFERÁZ AKTIVITÁS	31	0,429	1,469	0,029	0,12	0,875	2660
FELÜL- EXPRESSZÁLÓDÓ GO GÉNKÉSZLETEK A 72 ÓRÁS MITOTÁN CSOPORTBAN							
GO KATEGÓRIA	Gén készlet mérete	Dúsítási pont	Normalizált dúsítási pont	NOM p- érték	FDR q- érték	FWER p- érték	Rank max.
AMINOSAV TRANZMEMBRÁN TRANZPORTER AKTIVITÁS	28	-0,657	-2,038	0	0,07	0,027	2410
SZULFOTRANSZFERÁZ AKTIVITÁS	22	-0,596	-1,791	0	0,08	0,27	1416
ENDOSZÓMA	58	-0,564	-1,818	0	0,08	0,244	2558
SZKELETÁLIS IZOM FEJLŐDÉSE	30	-0,474	-1,786	0	0,08	0,287	789
IZOM SEJTEK DIFFERENCIÁLÓDÁSA	20	-0,545	-1,828	0	0,09	0,235	789
AMIN TRANZMEMBRÁN TRANZPORTER AKTIVITÁS	39	-0,549	-1,791	0	0,09	0,27	2585
SEJTDIFFERENCIÁLÓDÁS REGULÁCIÓJA	51	-0,489	-1,858	0	0,09	0,202	2285
SEJTDIFFERENCIÁLÓDÁS POZITÍV REGULÁCIÓJA	21	-0,728	-1,905	0	0,09	0,134	789
KÖTÉS NEGATÍV REGULÁCIÓJA	16	-0,594	-1,833	0	0,09	0,222	1148
SEJT HOMEOSZTÁZIS	18	-0,569	-1,749	0	0,1	0,325	1356
DNS KÖTÉS NEGATÍV REGULÁCIÓJA	15	-0,641	-1,87	0	0,1	0,187	1148
SEJTKOMPONENS SZÉTSZERELÉSE	28	-0,436	-1,703	0	0,1	0,512	779
CELLULÁRIS FEHÉRJE METABOLIKUS FOLYAMATÁNAK NEGATÍV REGULÁCIÓJA	39	-0,455	-1,704	0,042	0,11	0,499	726
VÉRKÉPZÉS	70	-0,445	-1,69	0	0,11	0,558	597
CELLULÁRIS LIPID KATABOLIKUS FOLYAMATA	28	-0,445	-1,693	0	0,11	0,543	1342
MIOBLASZT	17	-0,588	-1,912	0	0,11	0,107	789

DIFFERENCIÁLÓDÁS							
HEMOPOETIKUS VAGY LYMPHOID SZERVEK FEJLŐDÉSE	72	-0,441	-1,706	0	0,11	0,499	597
FESZÜLTSEGFÜGGŐ KALCIUM CSATORNA AKTIVITÁS	18	-0,5	-1,708	0,021	0,11	0,481	484
LIZOSZOMA	54	-0,399	-1,709	0	0,12	0,47	1287
TRANSZKRIPCIÓ SZABÁLYOZÁSA, FAKTOR AKTIVITÁS	33	-0,408	-1,713	0	0,12	0,451	837
LITIKUS VAKUOLIZÁCIÓ	54	-0,399	-1,709	0	0,12	0,47	1287

Melléklet 5. táblázat: ACA és ACC összehasonlításból adódó 85 szignifikáns útvonal listája (p -érték <0.05).

Kanonikus útvonalak (ACA-ACC)	Tanulmányok	-log(p-érték)
Glükokortikoid receptor jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	7,8200
Sejtciklus: DNS károsodás-G2/M ellenőrzési pont szabályozás	Giordano ACA-vs-ACC	7,3500
Butanoát metabolizmus	Reynies ACA-vs-ACC	7,2600
Daganat molekuláris mechanizmusa	Tömböl ACA-vs-ACC	7,1500
Alanin metabolizmus	Reynies ACA-vs-ACC	6,4400
Valin, Leucin és Izoleucin lebomlás	Reynies ACA-vs-ACC	6,4100
Lizin lebomlás	Reynies ACA-vs-ACC	6,4000
Sejtciklus: DNS károsodás-G2/M ellenőrzési pont szabályozás	Reynies ACA-vs-ACC	6,1500
Ciklin és sejtciklus szabályozás	Giordano ACA-vs-ACC	6,1200
NRF2-közvetített oxidatív stresszválasz	Reynies ACA-vs-ACC	6,0500
Hasnyálmirigy adenocarcinoma jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	5,8600
Protein ubiquitináció útvonal	Reynies ACA-vs-ACC	5,7700
IL-8 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	5,4200
B sejt receptor jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	5,4000
Protein ubiquitináció útvonal	Giordano ACA-vs-ACC	5,3400
Ephrin receptor jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	5,2000
Máj fibrózis / Máj stellát sejt aktiváció	Tömböl ACA-vs-ACC	5,1300
Aril hidrokarbon receptor jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	5,1200
NRF2-közvetített oxidatív stresszválasz	Giordano ACA-vs-ACC	5,0400
Alanin metabolizmus	Giordano ACA-vs-ACC	4,9700
Daganat molekuláris mechanizmusa	Giordano ACA-vs-ACC	4,9200
Ephrin receptor jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	4,8600
Szöveti faktorok szerepe daganatban	Tömböl ACA-vs-ACC	4,6600
Glioma jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	4,6500
Rho GTPáz jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	4,5800
Krónikus myeloid leukémia jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	4,5300
Csírsejt-Sertoli sejt csomópont jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	4,3200
B sejt receptor jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	4,3000
Glikolízis/Glükoneogenezis	Tömböl ACA-vs-ACC	4,2700
Lizin lebomlás	Tömböl ACA-vs-ACC	4,2200
Propanoát metabolizmus	Reynies ACA-vs-ACC	4,2200
Sejtciklus: Kromoszóma replikációs kontroll	Tömböl ACA-vs-ACC	4,1900
Sejtciklus: Kromoszóma replikációs	Giordano ACA-vs-ACC	4,1500

kontroll		
Semaphorin jelátvitel neuronokban	Giordano ACA-vs-ACC	4,1200
Ephrin B jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	4,0800
JAK/Stat jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	4,0700
PI3K jelátvitel B limfocitákban	Tömböl ACA-vs-ACC	4,0300
PI3K/AKT jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	4,0100
Ephrin B jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,9800
PTEN jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	3,9500
IL-2 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	3,9300
Butanoát metabolizmus	Tömböl ACA-vs-ACC	3,9100
Glükokortikoid receptor jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	3,8800
PTEN jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,8400
Butanoát metabolizmus	Giordano ACA-vs-ACC	3,8200
Aril Hidrokarbon receptor jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,7700
IGF-1 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,7400
Valin, Leucin és Izoleucin lebomlás	Giordano ACA-vs-ACC	3,7400
IGF-1 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	3,7100
LPS/IL-1 közvetített RXR Funkció gátlás	Giordano ACA-vs-ACC	3,6800
Lizin lebomlás	Giordano ACA-vs-ACC	3,6600
HGF jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,6200
Sejtciklus: Kromoszóma replikációs kontroll	Reynies ACA-vs-ACC	3,6100
Glükokortikoid receptor jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,5700
RNS polimeráz II komplex	Giordano ACA-vs-ACC	3,5200
Hasnyálmirigy adenocarcinoma jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,5100
Axonális irányított jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	3,4700
Sertoli sejt-Sertoli sejt csomópont jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,4700
p53 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	3,4300
ProlAktin jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	3,4000
Protein ubiquitináció útvonal	Tömböl ACA-vs-ACC	3,3600
Glioma jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	3,3400
Pirimidin metabolizmus	Giordano ACA-vs-ACC	3,3400
Angiopietin jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	3,3300
PTEN jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	3,3000
Szöveti faktorok szerepe daganatban	Giordano ACA-vs-ACC	3,3000
LPS/IL-1 közvetített RXR Funkció gátlás	Reynies ACA-vs-ACC	3,2900
Renin-Angiotenzin jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	3,2600
Purin metabolizmus	Tömböl ACA-vs-ACC	3,2500
Csírsejt-Sertoli sejt csomópont jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	3,2100
HMGB1 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,1800

PI3K jelátvitel B limfocitákban	Reynies ACA-vs-ACC	3,1700
RANK jelátvitel oszteoklasztokban	Tömböl ACA-vs-ACC	3,1500
Myc közvetített apoptózis jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,1300
HMGB1 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	3,1100
Integrin jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,1100
HGF jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	3,0900
PDGF jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	3,0800
TREM1 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	3,0500
Inozitol foszfát metabolizmus	Giordano ACA-vs-ACC	3,0400
Integrin jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	3,0300
Sertoli sejt-Sertoli sejt csomópont jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,9700
ERK5 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,9600
HGF jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,9500
Ephrin receptor jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,9400
Paxillin jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,8900
Szívhipertrófia jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,8900
Inozitol foszfát metabolizmus	Tömböl ACA-vs-ACC	2,8800
Krónikus myeloid leukémia jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,8800
Nukleotid excíziós javítási útvonal	Giordano ACA-vs-ACC	2,8600
Eritropoietin jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,8500
Integrin jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,8500
ERK/MAPK jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,8400
IL-6 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,8300
Polo-like kináz mitotikus szerepe	Giordano ACA-vs-ACC	2,8200
PPARalfa/RXRalfa aktiváció	Tömböl ACA-vs-ACC	2,8200
RNS polimeráz II komplex	Giordano ACA-vs-ACC	2,8200
Aldoszteron jelátvitel epitéliális sejtekben	Tömböl ACA-vs-ACC	2,8100
NGF jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,8000
NGF jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,7900
Glikolízis/Glükoneogenezis	Giordano ACA-vs-ACC	2,7800
Zsírsvav elongáció mitokondriumban	Reynies ACA-vs-ACC	2,7800
Daganat molekuláris mechanizmusa	Reynies ACA-vs-ACC	2,7600
PDGF jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,7600
Aktin nukleáció ARP-WASP komplex által	Reynies ACA-vs-ACC	2,7500
Propanoát metabolizmus	Giordano ACA-vs-ACC	2,7500
Növekedési hormon jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,7400
PI3K/AKT jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,7400
Hasnyálmirigy adenocarcinoma jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,7100
Akut fázis reakció	Reynies ACA-vs-ACC	2,6800

Myc közvetített apoptózis jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,6600
Glikolízis/Glükoneogenezis	Reynies ACA-vs-ACC	2,6400
PPARalfa/RXRalfa aktiváció	Reynies ACA-vs-ACC	2,6300
PAK jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,6200
Myc közvetített apoptózis jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,6100
IGF-1 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,5900
TGF- β_1 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,5700
TSP1 általi angiogenezis gátlás	Giordano ACA-vs-ACC	2,5600
ProlAktin jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,5500
T limfocitákban IL-2 expresszió szabályozása	Reynies ACA-vs-ACC	2,5100
Zsírsvav elongáció mitokondriumban	Tömböl ACA-vs-ACC	2,5000
NRF2-közvetített oxidatív stresszválasz	Tömböl ACA-vs-ACC	2,4800
Huntington kór jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,4600
PAK jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,4400
IL-15 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,4300
IL-8 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,4300
IL-22 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,4100
HMGB1 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,3900
IL-2 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,3900
Pentóz foszfát útvonal	Tömböl ACA-vs-ACC	2,3800
Propanoát metabolizmus	Tömböl ACA-vs-ACC	2,3800
Purin metabolizmus	Reynies ACA-vs-ACC	2,3800
ERK/MAPK jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,3600
Valin, Leucin és Izoleucin lebomlás	Tömböl ACA-vs-ACC	2,3600
ERK/MAPK jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,3500
Axonális irányított jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,3400
NGF jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,3400
RANK jelátvitel oszteoklasztokban	Reynies ACA-vs-ACC	2,3400
JAK1 és JAK3 szerepe citokin jelátvitelben	Tömböl ACA-vs-ACC	2,3300
Pentóz foszfát útvonal	Giordano ACA-vs-ACC	2,3200
PAK jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,2900
p53 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,2800
IL-2 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,2700
Aktin nukleáció ARP-WASP komplex által	Giordano ACA-vs-ACC	2,2600
Paxillin jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,2200
Huntington kór jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,2100
PPARalfa/RXRalfa aktiváció	Giordano ACA-vs-ACC	2,2000
DNS károsodásban a BRCA1 szerepe	Tömböl ACA-vs-ACC	2,1900
Glioma jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,1900

ProlAktin jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,1900
RANK jelátvitel oszteoklasztokban	Giordano ACA-vs-ACC	2,1900
JAK/Stat jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,1700
DNS károsodásban a BRCA1 szerepe	Giordano ACA-vs-ACC	2,1400
IL-6 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,1400
IL-6 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,1300
Csírasejt-Sertoli sejt csomópont jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,1200
Purin metabolizmus	Giordano ACA-vs-ACC	2,1200
Renin-Angiotenzin jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,1000
Zsírsvav elongáció mitokondriumban	Giordano ACA-vs-ACC	2,0900
Aszkorbát és Aldarát metabolizmus	Reynies ACA-vs-ACC	2,0800
CXCR4 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,0800
Huntington kór jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,0800
RAR aktivitás	Reynies ACA-vs-ACC	2,0800
Angiopietin jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,0600
ERK5 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	2,0500
Vese sejt carcinoma jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,0500
Androgén jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	2,0300
Angiopietin jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	2,0300
T limfocitákban IL-2 expresszió szabályozása	Tömböl ACA-vs-ACC	2,0100
Máj fibrózis / Máj stellát sejt aktiváció	Reynies ACA-vs-ACC	2,0000
14-3-3-közvetített jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,9900
Szívhipertrófia jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,9700
Pentóz foszfát útvonal	Reynies ACA-vs-ACC	1,9500
Paxillin jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,9400
Polo-like kináz mitotikus szerepe	Tömböl ACA-vs-ACC	1,9400
Renin-Angiotenzin jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,9400
14-3-3-közvetített jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,9200
Aktin nukleáció ARP-WASP komplex által	Tömböl ACA-vs-ACC	1,9200
PI3K/AKT jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,9200
Sertoli sejt-Sertoli sejt csomópont jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,9200
Aszkorbát és Aldarát metabolizmus	Tömböl ACA-vs-ACC	1,9000
LPS/IL-1 közvetített RXR Funkció gátlás	Tömböl ACA-vs-ACC	1,9000
Rho GTPáz jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,9000
Alanin metabolizmus	Tömböl ACA-vs-ACC	1,8900
Vese sejt carcinoma jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,8800
HIF1 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,8700
TGF- β_1 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,8600
RAR aktivitás	Tömböl ACA-vs-ACC	1,8500

p53 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,8400
Pirimidin metabolizmus	Tömböl ACA-vs-ACC	1,8300
Rac jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,8200
Semaphorin jelátvitel neuronokban	Reynies ACA-vs-ACC	1,8100
TSP1 általi angiogenezis gátlás	Tömböl ACA-vs-ACC	1,8100
Akut fázis reakció	Tömböl ACA-vs-ACC	1,7800
Ephrin B jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,7800
14-3-3-közvetített jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,7700
Eritropoietin jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,7600
JAK/Stat jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,7600
IL-15 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,7400
CXCR4 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,7300
Axonális irányított jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,7200
RAR aktivitás	Giordano ACA-vs-ACC	1,7100
RNS polimeráz II komplex	Reynies ACA-vs-ACC	1,7000
TGF- β_1 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,7000
ERK5 jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,6900
PDGF jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,6800
Aldoszteron jelátvitel epitéliális sejtekben	Giordano ACA-vs-ACC	1,6700
Nukleotid excíziós javítási útvonal	Reynies ACA-vs-ACC	1,6700
Pirimidin metabolizmus	Reynies ACA-vs-ACC	1,6600
Semaphorin jelátvitel neuronokban	Tömböl ACA-vs-ACC	1,6600
Aldoszteron jelátvitel epitéliális sejtekben	Reynies ACA-vs-ACC	1,6500
JAK1 és JAK3 szerepe citokin jelátvitelben	Giordano ACA-vs-ACC	1,6400
Szöveti faktorok szerepe daganatban	Reynies ACA-vs-ACC	1,6400
Aktin citoskeleton jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,5900
Eritropoietin jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,5900
PI3K jelátvitel B limfocitákban	Giordano ACA-vs-ACC	1,5800
Rac jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,5800
IL-22 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,5700
IL-15 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,5600
Ciklin és sejtciklus szabályozás	Tömböl ACA-vs-ACC	1,5500
T limfocitákban IL-2 expresszió szabályozása	Giordano ACA-vs-ACC	1,5500
Androgén jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,5400
Aszkorbát és Aldarát metabolizmus	Giordano ACA-vs-ACC	1,5300
CXCR4 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,5300
HIF1 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,5300
Inozitol foszfát metabolizmus	Reynies ACA-vs-ACC	1,5300

Trombopoietin jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,5300
Androgén jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,5200
Növekedési hormon jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,5100
Ciklin és sejtciklus szabályozás	Reynies ACA-vs-ACC	1,5000
IL-22 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,5000
IL-8 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,5000
JAK1 és JAK3 szerepe citokin jelátvitelben	Reynies ACA-vs-ACC	1,4800
Rac jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,4700
Sejtciklus: DNS károsodás-G2/M ellenőrzési pont szabályozás	Tömböl ACA-vs-ACC	1,4600
TREM1 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,4600
HIF1 jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,4500
Máj fibrózis / Máj stellát sejt aktiváció	Giordano ACA-vs-ACC	1,4500
Trombopoietin jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,4300
TSP1 általi angiogenezis gátlás	Reynies ACA-vs-ACC	1,4300
Aktin citoszkeleton jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,4200
B sejt receptor jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,4200
Polo-like kináz mitotikus szerepe	Reynies ACA-vs-ACC	1,4200
Aktin citoszkeleton jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,4100
Növekedési hormon jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,4100
Trombopoietin jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,4100
Rho GTPáz jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,4000
DNS károsodásban a BRCA1 szerepe	Reynies ACA-vs-ACC	1,3800
Krónikus myeloid leukémia jelátvitel	Reynies ACA-vs-ACC	1,3800
Aريل hidrokarbon receptor jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,3600
TREM1 jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,3600
Vese sejt carcinoma jelátvitel	Tömböl ACA-vs-ACC	1,3600
Akut fázis reakció	Giordano ACA-vs-ACC	1,3400
Nukleotid excíziós javítási útvonal	Tömböl ACA-vs-ACC	1,3400
Szívhipertrofia jelátvitel	Giordano ACA-vs-ACC	1,3100

Melléklet 6. táblázat: N és ACC összehasonlításból adódó 93 szignifikáns útvonal listája (p-érték<0.05).

Kanonikus útvonalak (N-ACC)	Tanulmányok	-log(p-érték)
Daganat molekuláris mechanizmusa	Giordano N-vs-ACC	6,3100
Integrin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	4,8300
Kemokin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	4,8100
Glioma jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	4,4300
Máj fibrózis / Máj stellát sejt aktiváció	Tömböl N-vs-ACC	4,4200
Glioblastoma jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	4,2100
cAMP-közvetített jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	4,1100
Axonális irányított jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	4,0800
Akut myeloid leukémia jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	4,0500
Wnt/béta katenin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	4,0400
Glükokortikoid Receptor jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	4,0300
Daganat molekuláris mechanizmusa	Tömböl N-vs-ACC	3,9900
Adrenerg jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,9400
GM-CSF jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,9100
PPARalfa/RXRalfa aktiváció	Giordano N-vs-ACC	3,9000
Protein Kináz A jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	3,8900
Trombin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	3,8800
Hasnyálmirigy adenocarcinoma jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,8200
Netrin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,6800
Embriónális csírasejt pluripotencia	Giordano N-vs-ACC	3,6100
PI3K/AKT jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,5900
Renin-Angiotenzin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,5800
Nem-kissejtes tüdő daganat jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,5700
Csírasejt-Sertoli sejt csomópont jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	3,5100
TGF jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,5000
G Béta Gamma jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,4500
Sertoli sejt-Sertoli sejt csomópont jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	3,4500
Kalcium indukálta T limfocita apoptózis	Giordano N-vs-ACC	3,4400
Krónikus myeloid leukémia jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,4000
IL-3 jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,3900
PDGF jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,3900
VEGF jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	3,2900
Aril hidrokarbon receptor jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,2500
Leukocita extravazáció jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	3,2300
Axonális irányított jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,2000

IL-8 jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,1300
IL-2 jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	3,0900
Nem -kissejtes tüdő daganat jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	3,0800
FGF jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	3,0600
Tight junction jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	3,0300
PTEN jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,9600
JAK/Stat jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,9400
IL-8 jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,9200
IL-4 jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,8600
PPARalfa/RXRalfa aktiváció	Tömböl N-vs-ACC	2,8600
Sertoli sejt-Sertoli sejt csomópont jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,8600
IL-4 jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,8500
GM-CSF jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,8400
Nur77 jelátvitel T limfocitákban	Giordano N-vs-ACC	2,8400
PKC ζ jelátvitel T limfocitákban	Tömböl N-vs-ACC	2,8000
Glioma jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,7800
Ephrin receptor jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,7700
Glioblastoma jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,7500
B sejt receptor jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,7400
Gap Junction jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,7000
Csírsejt-Sertoli sejt csomópont jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,7000
Kolorektális daganat metasztázis jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,6900
GNRH jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,6900
IGF-1 jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,6600
Kalcium jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,6500
PDGF jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,6500
IGF-1 jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,6100
HGF jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,5600
GNRH jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,5400
Krónikus myeloid leukémia jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,5100
Humán embrionális csírsejt pluripotencia	Tömböl N-vs-ACC	2,5000
Akut myeloid leukémia jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,4800
COS-COSL jelátvitel T Helper sejtekben	Giordano N-vs-ACC	2,4500
Paxillin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,4500
Kardiogenezis faktorok gerincesekben	Giordano N-vs-ACC	2,4400
FAK jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,4400
Nur77 jelátvitel T limfocitákban	Tömböl N-vs-ACC	2,4400
Inzulin receptor jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,4300
GDNF Ligand-receptor interakció	Tömböl N-vs-ACC	2,4200
Embrionális csírsejt pluripotencia	Tömböl N-vs-ACC	2,4100

T sejt receptor jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,4100
Trombopoietin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,4100
Ephrin receptor jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,4000
Aktin nukleáció ARP-WASP komplex által	Tömböl N-vs-ACC	2,3700
Kortikotropint felszabadító hormon jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,3500
Wnt/béta katenin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,3500
fMLP jelátvitel neutrofilokban	Giordano N-vs-ACC	2,3300
IL-2 expresszio regulációja T limfocitákban	Giordano N-vs-ACC	2,3300
Protein Kináz A jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,3100
Neuropatikus fájdalom jelátvitel dorzális neuronokban	Tömböl N-vs-ACC	2,3000
Rho GTPáz jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,3000
HMGB1 jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,2900
IL-15 jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,2900
GADD45 jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,2400
COS-COSL jelátvitel T Helper sejtekben	Tömböl N-vs-ACC	2,2100
Hasnyálmirigy Adenocarcinoma jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,2100
IL-2 jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,1900
Angiogenezis gátlás TSP1 által	Tömböl N-vs-ACC	2,1700
Netrin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,1700
Onkosztatin M jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,1700
IL-2 expresszio regulációja T limfocitákban	Tömböl N-vs-ACC	2,1700
FLT3 jelátvitel hematopoietikus sejtekben	Giordano N-vs-ACC	2,1600
Paxillin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,1600
Kolecisztokinin/Gasztrin-közvetített jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,1100
Adrenerg jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,1100
Eritropoietin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,0800
Prolaktin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,0800
Renin-Angiotenzin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,0700
Trombin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,0700
G béta gamma jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,0600
Neuregulin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,0600
Neuregulin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,0500
IL-15 jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,0400
B sejt receptor jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,0200
Makropinocitózis jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,0200
EGF jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,0100

cAMP-közvetített jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,0000
FGF jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	2,0000
Trombopoietin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	2,0000
SAPK/JNK jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,9900
Kalcium indukálta T limfocita apoptózis	Tömböl N-vs-ACC	1,9800
CREB jelátvitel neuronokban	Giordano N-vs-ACC	1,9800
Máj fibrózis / Máj stellát sejt aktiváció	Giordano N-vs-ACC	1,9700
T sejt receptor jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,9700
Aktin nukleáció ARP-WASP komplex által	Giordano N-vs-ACC	1,9500
Kortikotropint felszabadító hormon jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,9300
Integrin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,9200
Reaktív oxigénformák makrofágokban	Giordano N-vs-ACC	1,9100
Angiogenesis gátlás TSP1 által	Giordano N-vs-ACC	1,8900
Onkosztatin M jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,8900
RhoGDI jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,8800
IL-3 jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,8600
Leukocita extravazáció jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,8600
Kolorektális daganat metasztázis jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,8400
FLT3 jelátvitel hematopoietikus sejtekben	Tömböl N-vs-ACC	1,8100
fMLP jelátvitel neutrofilokban	Tömböl N-vs-ACC	1,8100
Gap junction jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,8000
Humán embrionális csírasejt pluripotencia	Giordano N-vs-ACC	1,8000
Kalcium jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,7800
HMGB1 jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,7800
SAPK/JNK jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,7800
Kardiogenesis faktorok gerincesekben	Tömböl N-vs-ACC	1,7700
ErbB4 jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,7600
Prolaktin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,7600
EGF jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,7400
PPAR jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,7400
Tight junction jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,7400
Neuropatikus fájdalom jelátvitel dorzális neuronokban	Giordano N-vs-ACC	1,7200
NRF2- közvetített oxidatív stressz	Tömböl N-vs-ACC	1,7200
Kemokin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,7100
PAK jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,7000
Inzulin receptor jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,6900
PAK jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,6800
PKC ζ jelátvitel T limfocitákban	Giordano N-vs-ACC	1,6800

PPAR jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,6600
ErbB jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,6500
TGF jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,6300
PTEN jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,5800
p70S6K jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,5600
ErbB jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,5400
Glioma invazív jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,5400
VEGF jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,5400
Eritropoietin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,5300
p70S6K jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,5300
CREB jelátvitel neuronokban	Tömböl N-vs-ACC	1,5000
Glioma invazív jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,5000
Glükokortikoid receptor jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,4800
NRF2- közvetített oxidatív stressz	Giordano N-vs-ACC	1,4800
Szöveti faktorok szerepe daganatban	Giordano N-vs-ACC	1,4800
Szöveti faktorok szerepe daganatban	Tömböl N-vs-ACC	1,4800
GDNF Ligand-receptor interakció	Giordano N-vs-ACC	1,4700
LPS-stimulált MAPK jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,4700
Makropinocitózis jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,4700
JAK kinázok szerepe IL-6 citokin jelátvitelben	Giordano N-vs-ACC	1,4700
Angiopietin jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,4600
FAK jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,4600
HGF jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,4600
RhoGDI jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,4600
PI3K/AKT jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,4400
LPS-stimulált MAPK jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,4300
Rho GTPáz jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,4300
ErbB4 jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,4100
JAK kinázok szerepe IL-6 citokin jelátvitelben	Tömböl N-vs-ACC	1,4000
GADD45 jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,3900
T sejtekben a TOB antiproliferatív szerepe jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,3700
Kolecisztokinin/Gasztrin-közvetített jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,3700
JAK/Stat jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,3700
Angiopietin jelátvitel	Giordano N-vs-ACC	1,3600
Aril hidrokarbon receptor jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,3400
T sejtekben a TOB antiproliferatív szerepe jelátvitel	Tömböl N-vs-ACC	1,3200
Reaktív oxigénformák makrofágokban	Tömböl N-vs-ACC	1,3100

