

A szukcinát dehidrogenáz enzim szerepe phaeochromocytomák és paragangliomák kialakulásában

Doktori tézisek

Lendvai Nikoletta Katalin

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Patócs Attila, Ph.D., MSc.

Hivatalos bírálók: Dr. Bokor Attila, Ph.D.
Dr. Berenténé Bene Judit Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Búzás Edit, DSc.

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Nóra Hosszúfalusi, Ph.D.
Dr. Rónai Zsolt, Ph.D.

Budapest
2016

1. BEVEZETÉS

1.1. Szukcinát dehidrogenáz

Az 1930-as években Szent-Györgyi Albert fedezte fel a szukcinát dehidrogenáz (SDH) enzimet, amely mind a citromsav ciklusban, mind az oxidatív foszforilációban fontos szerepet tölt be. Az SDH katalizálja a mitokondriális mátrixban a szukcinát fumaráttá történő oxidálását és szerepet játszik az elektronok szállításában proton grádiens kialakítása nélkül.

1.1.1. A szukcinát dehidrogenáz működése

A Krebs-kör kémiai reakciók sorozatából épül fel, melyek a sejt energiatermelésében vesznek részt. A citromsav ciklus minden lépése a mitokondriális mátrixban játszódik le, szénhidrátokat, zsírokat, aminosavakat és fehérjéket használ, hogy az acetil koenzim A-t (acetil CoA) oxidálja. Az acetil CoA fő forrása glikolízis, de származhat zsírsavak oxidálásából is. A citromsav ciklus közti termékei más bioszintetikus utak szubsztrátjaként hasznosulnak.

A citromsav ciklus végén négy molekula ATP, tíz molekula NADH, és két molekula FADH₂ keletkezik. A NADH és FADH₂ által szállított elektronok azután átkerülnek a molekuláris oxigénre az oxidatív foszforiláció segítségével.

A szukcinát dehidrogenáz a citromsav ciklus 7. lépését katalizálja, melyben a szukcinát fumaráttá való oxidálására és egyben az ubikinon ubikinollá való redukálására kerül sor. A redukció során elektronok adódnak át a FAD-FADH₂-ra

A szukcinát dehidrogenáz vagy II-es komplex az oxidatív foszforilációban (OXPHOS) vagy elektron transzport láncban is szerepet játszik, amely a sejtek fő energiaforrásaként szolgál. A OXPHOS a mitokondriumok belső membránjában zajlik és négy komplexből épül fel; I, II, III és IV komplex. Az ötödik komplex az ATP-szintáz, mely a proton gradiens felhasználásával 32-34 ATP molekulát szintetizál. Az elektronok áramlása a NADH-ról és FADH₂-ről a fehérje komplexeken keresztül a mitokondrium intermembrán térébe történő protonpumpálással társított, amely transzmembrán potenciált hozza létre. Ezt használja fel az ATP szintáz az energia (ATP) nyeréséhez.

Ezzel ellentétben a II-es komplex protonok gradienshez való hozzájárulás nélkül adja át az elektronokat az ubikinonra.

1.1.2. A szukcinát dehidrogenáz felépítése

SDH enzim egy hidrofil feji végből (benyúlik a mátrixba) és egy hidrofób farki véből (a mitokondrium belső membránjához rögzül és egy rövid szegmenssel az intermembrán térbe nyúl be) épül fel. A hidrofil feji véget az SDHA (flavoprotein) és SDHB (vas kén fehérje) alegységek alkotják, mely így lesz a katalitikus centrum. Itt találhatóak FAD kofaktor és szukcinát kötőhelye. Három úgynevezett vas-kén klaszter található még az SDHB alegységben, melyek segítik az elektron átszállítását az ubikinonra.

A hidrofób farkot az SDHC és az SDHD alegységek alkotják. Az enzim ezen alegységekkel kapcsolódik membránhoz. Hat transzmembrán hélixből épül fel, amely egy hem b csoportot és ubikinon-kötőhelyet tartalmaz.

1.1.3. Az SDH alegységeket kódoló gének kromoszómális elhelyezkedése

Az SDH vagy II komplex négy alegységének génjei a nukleáris genomban kódoltak. *SDHA* gén az 5-ös kromoszóma p karjának 15-ös lokuszán, az *SDHB* gén az 1-es kromoszóma p karjának 36-os lokuszán található. *SDHC* gén kódolja az 1-es kromoszóma q karjának 23-as lokuszán helyezkedik el. *SDHD* és *SDHAF2* gének a 11-es kromoszóma q karjának 23.1-es illetve 13-as lokuszán vannak kódolva. Ezen gének genetikai mutációi familiáris paraganglioma szindrómával, gyermekkori T-sejt akut leukémiával és gasztrikus stromális tumorokkal társíthatók.

1.2. Phaeochromocytóma és paraganglióma

1.2.1. Definíció és anatómia elhelyezkedés

A phaeochromocytómák (PHEO) ritk katekolamin termelő daganatok, melyek a mellékvesében található kromaffin sejtekből indulnak ki. Kromaffin sejtek található még a szimpatikus ganglionokban. A szimpatikus paragangliómák (PGL) általában az alsó mediasztinumban, a hasban és a medence tájékon (például az aorta kemoreceptorai és a Zuckerkandl-szerv) helyezkednek el és hormont termelnek. Ezzel szemben, a paraszimpatikus paragangliómák jellegzetes elhelyezkedése: koponya alap, a nyak és a felső mediastinum (például carotis test).

A legtöbb esetben a daganat korai felismerése és eltávolítása jelenti az egyetlen gyógymódot. Azonban a klinikai tünetek nem jellegzetesek és más betegségeket utánozhatnak, megnehezítve ezzel a diagnózist.

1.2.2. Genetikai háttér, társult örökletes szindróma

A phaeochromocytómák és paragangliómák főként sporadikus daganatok, korábban az összes örökletes szindrómával társított tumorok körülbelül 10%-át tették ki, beleértve a multiplex endokrin neoplázia 2. típusát (MEN2), von Hippel-Lindau szindrómát (VHL) és neurofibromatózis 1-es típusát (NF1). Kis százaléka a PHEO/PGL-nak volt megfigyelhető a Carney-triászban, Carney-Stratakis szindrómában és még ritkábban MEN 1-es típusban.

Az elmúlt évtizedben számos új gén (*SDHx*, *TMEM127*, *MAX*, *KIF1B*, *FH*, *EGLN1*) került felfedezésre, melyek szerepet játszanak a phaeochromocytómák és paragangliómák kialakulásában, ezzel növelve 30-35%-ra az örökletes PHEO/PGL-ák előfordulását.

2. CÉLKITŰZÉSEK

PhD képzésem alatt célul tűztem ki, hogy összefoglaljam az *SDHx* szerepét PHEO/PGL-ák patogenezisében. Céljaim között szerepelt:

- meghatározni az *SDHx*, *SDHAF2*, *MAX* és *TMEM127* gének előfordulását a magyar látszólag sporadikus PHEO/PGL betegek körében
leírni az első magyar *SDHD* génmutációt hordozó beteg részletes fenotípus jellemzőit
- összefoglalni és leírni genotípus-fenotípus összefüggéit
- új mutációkat azonosítani a hazai PHEO/PGL betegek körében
- meghatározom az *SDHx* polimorfizmus előfordulását a sporadikus MTC, sporadikus PHEO betegek, egészségesek és a *RET* mutációt hordozók között?
- értékeljem az *SDHx* gén polimorfizmusok szerepét az klinikai tünetek alakulására *RET* mutációt hordozó betegeknél
- megmérjem Krebs ciklus két metabolitjának, a szukcinát és a fumarát, szintjeit, PHEO/PGLbetegek tumor szöveteiben és humán plazma mintákban
- meghatározni a szukcinát-fumarát arány értékét az egér *phaeochromocytoma* (MPC) és egér tumor szövet (MTT) sejtekben
- ellenőrizni, hogy ez a különbség indítványozhatja-e a szukcinát-fumarát mérésének klinikai diagnózisba való bevezetését

3. MÓDSZEREK

3.1. Csírasejtes mutációk előfordulása a magyar phaeochromocytómás és/vagy paragangliómás betegekben

3.1.1. Beteganyag

A beteganyag a Semmelweis Egyetem, Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinikáján 1998 és 2014 között diagnosztizált és nyomon követett, 129 PHEO/PGL-val diagnosztizált beteg közül került bevonásra, hogy kiválaszthassuk, mely betegek alkalmasak teljes genetikai szűrésre. Klinikai és laboratóriumi adatait adatbázisunkban megtalálhatóak. A genetikai szűrés előtt minden beteg genetikai tanácsadásban részesült, és írásos beleegyezését adta a vizsgálatokba.

92 beteg esetében a klinikai diagnózist a sebészileg eltávolított daganat szövettani vizsgálata igazolta. A *RET* és *VHL* gének mutáció analízise 4 *RET* mutációt és 4 csírasejtes *VHL* mutációt hordozó beteget azonosított. Két esetben a jellegzetes fenotípus jellemzők neurofibromatózis 1-es típusát jelezték. Ezeket a betegeket kizártuk vizsgálatunkból és az *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *MAX* és *TMEM127* gének mutáció analízise 82 esetben valósult meg.

3.1.2. Genetikai vizsgálatok

A *RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *MAX* és *TMEM127* gének genetikai vizsgálata kétirányú Sanger szekvenálás segítségével történt. A betegek perifériás véréből gyári kit segítségével DNS-t vontunk ki. Az *SDHB*, *SDHC* és *SDHD* gének nagy deléció analízisét multiplex ligációs próba amplifikációval végeztük.

3.2. Az *SDHD* gén G12S polimorfizmusának genotípust befolyásoló hatása MEN2A szindrómás betegeknel

3.2.1. Betegek

A vizsgálatban a beteg és családtagjaik, akik írásos beleegyezésüket adták a Semmelweis Egyetem, Orvostudományi Kar, II. Belgyógyászati Klinikájáról kerültek ki. A betegek teljes klinikai kivizsgálása mellett laboratóriumi vizsgálatokra, bazális

kalcitonin, parathormon, a vizelet katekolamin metabolit, és képalkotó vizsgálatokra, beleértve nyaki ultrahang, mellkasi és hasi CT (CT), és az egész test metaiodobenzylguanidin szcintigráfia (MIBG), került sor.

3.2.1.1. MEN2 szindrómás betegek

Genetikai centrumunkban a *RET* proto-onkogén csírasejtes mutációit 77 betegben azonosítottuk, akik 21 rokoni kapcsolat nélküli MEN2 szindrómás család tagjai. 55 MEN2A (átlagéletkor a diagnózis idején: $33,4 \pm 17$ év; tartomány: 7-76 év), három MEN2B (átlagéletkor a diagnózis idején: $15,6 \pm 5$ év; tartomány: 10–20 év) és 19 FMTC (átlagéletkor a diagnózis idején: $23,7 \pm 16,8$ év; tartomány: 2-57 év).

A PHEO és MTC meglétét műtéti úton eltávolított daganatok szövettani vizsgálata erősítette meg. A *RET* gén csírasejtes mutációit hordozó betegeknél a pajzsmirigy teljes eltávolítását végeztük el és a tünetmentes csoport minden tagjának fel lett ajánlva a lehetőség.

3.2.1.2. Sporadikus MTC betegek

47 rokoni kapcsolat nélküli beteget vizsgáltunk, szövettanilag igazolt MTC-vel. 15 férfi (életkor, átlag \pm SD, $44,7 \pm 13,3$; tartomány: 28-82 év) és 32 nő (életkor, átlag \pm SD, $47,7 \pm 12,3$; tartomány: 23-76 év).

3.2.1.3. Sporadikus phaeochromocytómás betegek

48 rokoni kapcsolat nélküli beteget vizsgáltunk, akiknél a szövettan igazolta a sporadikus adrenális phaeochromocytóma jelenlétét. 16 férfi beteg (életkor, átlag \pm SD, 36 ± 14 ; tartomány: 13-66 év) és 32 nő (életkor, átlag \pm S.D, 42 ± 14 ; tartomány: 19-64 év). A *RET* gén 10-14 exonjának és a teljes *VHL*, *SDHB* és *SDHD* gének mutáció analízise nem mutatott betegségkötő mutációt. 7 beteget kizártunk a vizsgálatból, mert igazolódott a *VHL* (öt beteg), *SDHB* (egy beteg), vagy *SDHD* (egy beteg) gén mutációja. Öt sporadikus phaeochromocytómás beteg esetben betegséget okozó *RET* mutáció került felismerésre és ezért a vizsgálatba a *RET* mutációt hordozó csoportba kerültek. Az összes betegeknél MTC-t diagnosztizáltak, emelkedett szérumszintű kalcitonin vagy posztoperatív szövettani vizsgálattal. Genetikai tanácsadást és a genetikai szűrést minden első fokú rokonnak felajánlották.

3.2.2. Mutáció analízis

A betegek perifériás véréből gyári kit segítségével DNS-t vontunk ki. A *RET* proto-onkogén mutációkat direkt szekvenálással mutattuk ki. A *VHL*, *SDHB*, és *SDHD* gének mutáció analízise látszólag sporadikus PHEO-ban direkt szekvenálással történt, és a *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, és *SDHD* gének nagy deléció elemzést multiplex ligációs próba amplifikációval végeztük.

3.2.3. Az *SDHD* gén *G12S* polimorfizmusának vizsgálata restriktós fragmens hossz polimorfizmussal

A guanin (G) adenin (A) nukleotid csere, amely megfelel a *G12S* polimorfizmusnak, a *BanI* restriktós enzim hasítási helyének felel meg. Ennek kimutatására restriktós fragmens hossz polimorfizmust (RFLP) alkalmaztunk. A pozitív eredményt mutató mintákat direkt DNS-szekvenálással ellenőriztük.

3.3. Az *SDHx* mutációk biokémiai következményei, a szukcinát fumarát arány *SDHB/D* mutációhoz társult paragangliómákban

3.3.1. Anyagok

PHEO/PGL szöveti mintákat a National Institutes of Health-ben (NIH) gyűjtöttünk, a *Eunice Kennedy Shriver* National Institute of Child Health and Human Development (NICHD) vizsgálóbizottsága által jóváhagyott 00-CH-0093 számú klinikai protokoll alapján. A szövetmintákat folyékony nitrogénben fagyasztottuk rövidebbel a daganat műtéti eltávolítása után. Minden betegnél megtörtént PHEO/PGL-ra hajlamosító gének genetikai vizsgálata, az *SDHAF2* és neurofibromatózis 1 (*NF1*) gének kivételével; az utóbbi diagnózisa klinikumon alapult/függvénye.

Négy csoportba soroltuk a daganatmintákat: *SDHB* (10 PGL), *SDHD* (5 PGL), látszólag sporadikus (6 PHEO, 4 PGL), és *NF1* (2 PHEO). *NF1* gén mutációhoz társult PHEO-at azért vontuk be a vizsgálatba, mert az *in vitro* kísérletekben használt egér PHEO (MPC) és egér tumor szövet (MTT) genetikai háttere. MTT sejtekről ismert, hogy sokkal

agresszívebb, mint MPC sejtek és agresszivitásuk hasonló az *SDHB*-hez társult PHEO-hoz.

3.3.2. Az *SDHB* gén csendesítése MPC és MTT sejtekben

Az MPC és MTT sejtek korai passzázsait, sejteket transzdukáltuk lentivírussal, mely vagy m*SDHB* ellen irányuló shRNS részecskéket vagy kontroll shRNS részecskéket hordoztak. MPC és MTT sejtek *SDHB* gén csendesítés mértékének becslésére Western blot analízist végeztünk.

3.3.3. Metabolikus vizsgálatok

A szukcinát és fumarát meghatározására irányuló eljárásokat röviden ismertetjük. A szerves savakat, mint a tercier butil dimetil-szilil éter származék formájában analizáltuk gázkromatográfiás-tömegspektrometriát (GC-MS) alkalmaztunk elektron impakt módban és ¹³C-vel jelölt belső standardokat használtuk az egyes minták mennyiségi meghatározásához. A mintákat perklórsavas kivonással készítettük elő. PCA-val semlegesített kivonatokhoz ¹³C-vel jelölt belső standardokat adtunk. A minták vizsgálatát Agilent 5973 quadropole GC-MS-en (Agilent) végeztük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Csírasejtes mutációk előfordulása a magyar phaeochromocytómás és/vagy paragangliómás betegekben

Tizenegy betegnél azonosítottunk mutációt a PHEO/PGL-val társult gének egyikében. Korábbi adatainkkal egybeolvasva, mely leírja a *RET* (n = 4) és *VHL* (n = 4) gének mutációját, a betegségokozó csírasejtes mutációk előfordulása magyar látszólag sporadikus, nem szindrómás PHEO/PGL betegekben 21,1% (19 / 90, 11, 82 db, 4 *RET* és 4 *VHL* mutáció hordozók) volt. Pozitív prediktív értékkel bírt a kétoldali érintettség és a többszörös daganat. A kétoldali daganatok előfordulása szignifikánsan magasabb volt a mutációt hordozóknál, mint a genetikailag negatív esetekben (8 / 11, 72,8% vs. 3 / 71, 2,1%; p <0,001).

Heterogén mutáció spektrumot figyelhetünk meg betegeink körében, a leggyakoribb mutáció az *SDHB* génben volt kimutatható (7 különböző mutáció, melyből 4 új), három betegnél *TMEM127* mutációt (két új), míg egy *SDHD* gén mutációt mutattunk ki. Minden új *SDHB* gén mutációt a TCA Mutation Database-hez és az új *TMEM127* gén mutációkat dbSNP Database-hez benyújtottuk. Az *SDHC*, *SDHAF2* és *MAX* génekben nem azonosítottunk mutációkat.

Genotípus-fenotípus

összefüggések

A genetikailag pozitív és negatív esetek főbb demográfiai és klinikai adatainak összehasonlítása jelezte, hogy a genetikailag pozitív betegek fiatalabbak, gyakrabban rosszindulatú a PHEO/PGL, és 72% - ban kétoldali vagy áttétes daganatok. A daganatok rosszindulatúsága az *SDHB* gén mutációkat hordozó betegek körében volt a legmagasabb (7-ből 3 esetben). Két beteget 35 évesen áttét képződések következtében vesztettünk el, náluk a következő *SDHB*: c758G> A -Cys253Tyr- és az új *SDHB*: c.586T> G -Cys196Gly- mutációkat igazoltuk. E betegeknél többszörös csont- és a máj áttétek figyelhetünk meg. A harmadik esetben új *SDHB*: c728G> A Cys243Tyr mutációt azonosítottuk, mely szintén rosszindulatú PGL-val társult. A betegnél hasi PGL-t és többszörös csontáttéteket diagnosztizáltak.

Egy másik fontos megfigyelés az volt, hogy a *SDHB* –hez társult tumorok főleg hasúri PGL-k voltak (7-ből 6 esetben). Az egyik új *SDHB* c607G> T Gly203Stop mutációt hordozó 19 éves betegben phaeochromocytómát és vesesejtes karcinómát diagnosztizáltak. A vesesejtes karcinóma szövettani képe jellegzetes az *SDHB* gén mutációjában ilyenkor megfigyelhető elváltozásra (szolid szerkezet, citoplazma zárványok és daganaton belüli hízósejtek).

SDHB: c286 + 1G/A mutációt, illetve *SDHD* c.147-148 insA kereteltolódásos mutációt hordozó betegekben a fej-nyak PGL volt a jellemző. Az *SDHD* mutáció esetében egy intraabdominális PGL-t is eltávolították. A betegeknél 4-8 év után sem láttunk malignitásra utaló jeleket.

Három betegnél mutattunk ki *TMEM127* mutációt. Kettőnek PHEO volt (ebből egynek bilaterális), míg a harmadik esetben PHEO és fej-nyaki PGL volt megfigyelhető, a betegnél új mutációt detektáltunk (*TMEM127*: c467T> A, - Leu155Stop). A daganatok nem mutattak malignitást. A legfiatalabb *TMEM127* gén mutációt hordozó beteg 22 éves volt.

4.2. Az *SDHD* gén G12S polimorfizmusának genotípust befolyásoló hatása MEN2A szindrómás betegeknél

SDHx gének mutációi örökletes PHEO/PGL okoznak és PHEO része a MEN2 szindrómának feltételeztük, hogy *SDHx* gének változatait genetikai módosító hatással bírnak MEN2 szindrómában. Ennek következtében az összes MEN2 betegünk mintáját teszteltük *SDHx* mutáció irányába. 55 MEN2A betegből nyolcnál (15,5%) tudtuk a G12S variánst kimutatni, míg a MEN2B és FMTC csoportok nem volt jelen. A sporadikus MTC és/vagy sporadikus PHEO betegek sem hordozták ezt a variánst. Az egészséges kontroll egyén (100 fő) körében csak egy ember hordozta a G12S variánst (prevalencia, 1%). Nem láttunk összefüggést a *SDHD* gén G12S polimorfizmusa és *RET* mutáció hordozók PHEO vagy mellékpajzsmirigy-túlműködésének előfordulása között, és a betegség korral összefüggő megjelenése hasonló volt G12S hordozók és nem-hordozóknál (43 ± 9 versus 40 ± 3 év (probandok) és $29,6 \pm 19,3$ vs. $32,5 \pm 20,5$ év nem hordozó). *RET* mutációt hordozó probandok között a *SDHD* gén G12S variánst

hordozók körében magasabb volt a szérumban a kalcitonin szintje szemben a nem hordozókkal (6864 ± 11111 vs. 1250 ± 932 pg/ml), bár ez a különbség nem volt szignifikáns. A *RET* mutációt hordozó családtagok között, G12S hordozók és nem hordozók esetében a szérumban a kalcitonin szintek hasonlóak voltak (436 ± 876 vs. 393 ± 556 pg/ml).

4.3. Az *SDHx* mutációk biokémiai következményei, a szukcinát-fumarát arány *SDHB/D* mutációhoz társult paragangliómákban

Jelen vizsgálatban 27 daganat mintát és *SDHB* gén csendesített és kontroll MPC és MTT sejteket használtunk. A daganat minták 10 *SDHB* PGL-ből, 5 *SDHD* PGL-ből, 2 *NFI* PHEO-ből és 10 látszólag sporadikus PHEO/PGL-ből tevődött össze.

4.3.1. A daganat szövet szukcinát koncentrációja

Az *SDHB*-hez társult PGL-k átlagos szukcinát koncentrációja 2,692 ± 1,979 mmol/l, a COV 0,71 volt, szemben a látszólag sporadikus PHEO/PGL csoport szukcinát koncentrációjával (0,219 ± 0,066 mmol/l; COV 0,3; P = 0,0009). Egy *SDHB*-hez társult PGL kiemelkedően magas szukcinát szintet mutatott a többi *SDHB* daganathoz képest (7,916 mmol/l). Ez a minta szignifikáns outlier (P < 0,05 a Z értéke 2,29). Az *SDHD* csoport átlagos szukcinát koncentrációja 2,078 ± 0,491 mmol/l (COV 0,24); ez az érték magasabb (P < 0,05), mint a látszólag sporadikus PHEO/PGL csoporté. Az *NFI*-hez társult PHEO hasonló átlagos szukcinát koncentráció mutatott (0,364 ± 0,165 mmol/l; COV 0,454), mint a látszólag sporadikus PHEO/PGL.

4.3.2. Fumarát koncentráció

SDHB-hez társult PGL átlagos fumarát koncentrációja 0,015 ± 0,007 mmol/l, a COV 0,46, *SDHD*-hez társult PGL-é 0,046 ± 0,029 mmol/l (COV 0,62), és a látszólag sporadikus PHEO/PGL 0,038 ± 0,016 mmol/l (COV 0,43). A fumarát koncentráció szignifikánsan alacsonyabb volt az *SDHB*-hez társult PGL-ben összehasonlítva *SDHD*-hez társult és a látszólag sporadikus PHEO/PGL-nél (P = 0,005, P = 0,0008, sorrendben). Az *NFI* PHEO csoport fumarát koncentráció átlagértéke 0,057 ± 0,018 mmol/l (COV 0,324).

4.3.3. A szukcinát-fumarát arány értéke daganat szövetben

Az átlag szukcinát-fumarát arány magas volt *SDHB*- és *SDHD*-hez társult PGL-ban, $238,6 \pm 327,2$ (COV 1,37), és $60,24 \pm 36,58$ (COV 0,60), szemben a látszólagos sporadikus PHEO/PGL $6,3 \pm 2,0$ (COV 0,31) ($p = 0,0376$, $P = 0,0003$, sorrendben). Az *NF1* PHEO átlag szukcinát-fumarát aránya $6,204 \pm 0,87$ a COV 0,14.

4.3.4 A plazmaminták szukcinát fumarát aránya

A plazma átlagos szukcinát-fumarát arányának értéke enyhe emelkedést mutatott a *SDHB* és *SDHD* csoportok ($3,15 \pm 1,63$ és $2,75 \pm 1,65$), a látszólag sporadikus csoporthoz képest ($1,61 \pm 0,61$), de ez a különbség nem volt szignifikáns.

4.3.5. Az MPC MTT sejtek szukcinát-fumarát aránya

A szukcinát-fumarát arány szignifikánsan magasabb volt az *SDHB* gén csendesített MTT sejtekben, mint a kontroll MTT sejtekben; $7,53$ vs $2,45$ ($P = 0,0115$), míg az enyhe emelkedés az *SDHB* gén csendesített és kontroll MPC sejtekben, nem volt szignifikáns ($1,62$ vs $1,16$, $P = 0,164$). A sejtenyészet-felülúszóit elemeztük az *SDHB* gén csendesített - és kontroll MPC és MTT-sejtekben, nem volt különbség a szukcinát-fumarát arányban. A mértéke *SDHB* gén csendesítése 62%-ot mutatott MPC, és 63%-ot MTT sejtekben.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

A magyar látszólag sporadikus PHEO/PGL betegek klinikai, demográfiai és genetikai adatait foglaltam össze. Egy átfogó mutáció analízis keretein belül meghatároztam betegségokozó mutáció előfordulását ebben a betegcsoportban. A leggyakoribb mutációkat a *SDHB*, *TMEM127*, *RET* és *VHL* génekben detektáltunk. A magyar betegek ezen heterogén genetikai háttere hat új mutációval hasonló más populációkéhoz, ahol nincs alapító mutáció jelen. A PHEO/PGL betegeknek felkínált genetikai szűrésnek ki kell terjednie valamennyi eddig azonosított génre, de hasúri PGL, különösen malignitás esetén, az első vizsgálandó gén az *SDHB* legyen. Az új genotípus-fenotípus összefüggések hozzájárulhatnak diagnosztikus módszerek javításához és segíthetnek a PHEO/PGL betegek klinikai követésében.

Még mindig jelentős az összes gén vizsgálati költsége és a vele járó laboratóriumi munkát, de fenotípus orientált irányzatok lehetővé teszik, hogy felállítsunk egy sorrendet a tesztelni kívánt gének között. Természetesen negatív eredmény után a többi gént is meg kell vizsgálni. A leghatékonyabb munka eléréséhez optimális lenne, hogy kizárjunk néhány szindrómához társult gént a nyilvánvaló fenotípus jellemzői alapján (például az NF1-gén ritkán vizsgált, mert tipikus megjelenése), és a többi gént egyidejűleg lehetne vizsgálni. A *KIF1B*, *EGLN1*, *FH*, *IDH2* és *MDH2* gének szűrése is kívánna az új generációs szekvenálási módszereket. Betegségokozó, csirasejtes mutációt hordozó betegek és hozzátartozóik klinikai követése nagy kihívások elé állít minket. Érintett családok első fokú tagjainál a genetikai tanácsadást és genetikai szűrést fel kell ajánlani.

SDHx gének betegséget okozó mutációi mellett találtam egy szignifikánsan magasabb előfordulású *SDHD* gén polimorfizmust (G12S) csirasejtes *RET* mutáció hordozó, MEN2A szindrómás betegekben. A G12S variáns magas prevalenciája ezekben a betegekben támogatja a genetikai módosító szerepét, azonban a G12S hordozók és nem hordozók klinikai tünetei között szignifikáns különbséget nem tudtunk kimutatni. Ez a későbbiekben még tisztázásra vár.

Első alkalommal sikerült bemutatni, hogy a szukcinát-fumarát arány, mint egy új anyagcsere marker, felhasználható lehetne *SDHB/D*-hez társult PGL jelenlétének kimutatására. A szukcinát felhalmozódása gátolja a prolil hidroxiláz enzimet és ennek következtében a hipoxia-inducible factor α (HIF1- $2-\alpha$) lebomlását. HIF1-, $2-\alpha$ stabilizációja hatással van a daganatképződést elősegítő génekre és a felgyorsult aerob glikolízisű daganat kialakulásában. A szakirodalom és részben az eredményeim alapján, egy nagy prospektív klinikai vizsgálat (több *SDHx* PHEO/PGL) segítségével lehetséges lenne meghatározni a szukcinát-fumarát arány diagnosztikus értékét. Továbbá, a kezdeti eredményeink megerősítését követően, feltételezhetjük, hogy a daganaton belüli és talán a plazma szukcinát-fumarát arány változásai a sérült SDH fehérje potenciális terápiás lehetőségek alapjául szolgálhat.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények

Lendvai N, Szabó I, Butz H, Bekő G, Horányi J, Tarjányi M, Alföldi S, Szabó I, Rác K, Patócs A. (2009) SDHD génmutációhoz társult extraadrenalis phaeochromocytoma. Orvosi Hetilap. 150:645-649.

Lendvai N, Tóth M, Valkusz Zs, Bekő G, Szücs N, Csajbók É, Igaz P, Kriszt B, Kovács B, Rác K, Patócs A. (2012) Over-representation of the G12S polymorphism of the SDHD gene in patients with MEN2A syndrome. Clinics. 67:85-89.

Lendvai NK, Pawlosky R, Bullova P, Eisenhofer G, Patocs A, Veech RL, Pacak K. (2014) Succinate-to-Fumarate Ratio as a New Metabolic Marker to Detect the Presence of *SDHB/D*-related Paraganglioma: Initial Experimental and Ex Vivo Findings. Endocrinology. 155:27-32.

Patócs A, **Lendvai NK**, Butz H, Liko I, Sapi Y, Szucs N, Toth G, Grolmusz VK, Igaz P, Toth M, Rác K. (2016) Novel SDHB and TMEM127 Mutations in Patients with Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndrome. Pathol. Oncol. Res. 22:673-679.

6.2. A disszertációtól független közlemények

Flidner SM, Kaludercic N, Jiang XS, Hansikova H, Hajkova Z, Sladkova J, Limpuangthip A, Backlund PS, Wesley R, Martiniova L, Jochmanova I, **Lendvai NK**, Breza J, Yergey AL, Paolucci N, Tischler AS, Zeman J, Porter FD, Lehnert H, Pacak K. (2012) Warburg effect's manifestation in aggressive pheochromocytomas and paragangliomas: insights from a mouse cell model applied to human tumor tissue. PLoS One. 7:e40949.

Flidner SM, Engel T, **Lendvai NK**, Shankavaram U, Nölting S, Wesley R, Elkahloun AG, Ungefroren H, Oldoerp A, Lampert G, Lehnert H, Timmers H, Pacak K. (2014) Anti-cancer potential of MAPK pathway inhibition in paragangliomas-effect of different statins on mouse pheochromocytoma cells. PLoS One. 9:e97712.

Schovanek J, Bullova P, Tayem Y, Giubellino A, Wesley R, **Lendvai N**, Nölting S, Kopacek J, Frysak Z, Pommier Y, Kummar S, Pacak K. (2014) Inhibitory Effect of the Noncamptothecin Topoisomerase I Inhibitor LMP-400 on Female Mice Models and Human Pheochromocytoma Cells. Endocrinology. 156:4094-4104.