

**Keringő extracelluláris vezikula-asszociált
mikroRNS-ek expressziójának vizsgálata
mellékvesekéreg-daganatban szenvedő betegekben**

Doktori tézisek

Dr. Perge Pál

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Igaz Péter, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók:

Dr. Bödör Csaba, PhD, tudományos főmunkatárs

Dr. Orbán Tamás, PhD, tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Horváth Csaba, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Mészáros Szilvia, PhD, egyetemi adjunktus

Dr. Papp Gergő, PhD, tudományos munkatárs

Budapest
2018

I. Bevezetés

A mellékvesekéreg daganatai gyakoriak, az előfordulások az életkorral párhuzamosan emelkedik. Döntő többségük- az esetek körülbelül kétharmada- hormonálisan inaktív, nem-funkcionáló adenoma (NFA), így klinikai tüneteket általában nem okoz. A ritka kortizoltermelő adrenocorticalis adenoma (CPA) a Cushing-szindróma kialakítása révén jelentős morbiditással és mortalitással jár. Az adrenocorticalis carcinoma (ACC) nagyon ritka (incidencia: 0,5-2 fő/millió ember/év), agresszív viselkedésű daganat. Az ötéves túlélés előrehaladott stádiumban alacsony, 15-30% közé tehető. A mellékvesekéreg daganatok dignitását megbízhatóan jelző preoperatív biomarker napjainkig nem került leírásra. A rosszindulatúság jelzésére jelenleg leginkább képalkotó vizsgálatokat (CT, MRI) használunk, de ezeknek is számos korlátja van. A mellékvesekéreg daganatok szövettani vizsgálata nehéz, nagy gyakorlatot igényel. A szövettani vizsgálat nehézségei, valamint a daganat tokjának esetleges sérülése nyomán jelentkező daganatterjedés veszélyére tekintettel biopsziás mintavétel nem ajánlott.

Az utóbbi évtized molekuláris biológiai kutatásainak egyik legjelentősebb eredményének a mikroRNS-ek (miRNS) felfedezése tekinthető. A miRNS-ek rövid (19-25 nukleotidból álló) nem kódoló RNS-ek, amelyek a génexpressziót főként poszttranszkripcionális szinten befolyásolják. E hatásukat jellemzően a mRNS degradációjának indukálásával vagy a translációjának gátlásán keresztül fejtik ki. A miRNS-ek nemcsak szövetekben, hanem különféle testfolyadékokban is megtalálhatóak. A vérben keringő miRNS-ek minimálisan invazív biomarkerek lehetnek a malignitás és a prognózis megállapítására. A miRNS-ek egy része aktív szekréció során

extracelluláris vezikulákba (EV) kerül, amely a vérben stabil így markerként használható. A mellékvesekéreg daganataira jellemző szöveti és keringő miRNS-eket több kutatócsoport, így munkacsoportunk is vizsgálta, azonban a keringő miRNS-ek eddigi érzékenységi-fajlagossági adatai rutinszerű klinikai alkalmazásukra még nem voltak elég jók. Az EV eredetű miRNS-ek bár mennyiségük kisebb, aktív szekréciójuk lévén specifikusabbak lehetnek, mint a teljes plazmából izolált miRNS-ek. A mellékvesekéreg daganatokban a keringő EV-asszociált miRNS-ek expressziója, továbbá az NFA, CPA és kortizoltermelő ACC (CP-ACC) miRNS mintázatát sem vizsgálták eddig.

II: Célkitűzés

Doktori munkám során az alábbi célokat állítottam fel:

1. Célom volt mellékvesekéreg adenomában (ACA) illetve mellékvesekéreg carcinomában (ACC) szenvedő betegek preoperatív vérmintáiban az extracelluláris vezikulák mikroRNS mintázatának vizsgálata a diagnosztikában alkalmazható minimálisan invazív, malignitást előrejelző biomarkerek azonosítása céljából.
2. Vérplazma eredetű EV-asszociált mikroRNS-ek expressziójának vizsgálata nem-funkcionáló ACA-ban, kortizoltermelő ACA-ban, és kortizoltermelő ACC-ben szenvedő betegek körében.
3. Keringő EV-asszociált mikroRNS-ek kifejeződésének és a kortizolszekréción paraméterek közötti kapcsolatának vizsgálata.

III. Módszerek

III.1. Betegek és plazmaminták

Munkám első részében összesen 46 preoperatív plazmamintát vizsgáltunk. A felfedező kohorsz 6 ACA-ból és 6 ACC-ből állt, míg a validációs kohorsz 18 ACA-ban és 16 ACC-ben szenvedő betegből tevődött össze. Munkám második részében 13 NFA, 13 CPA és 9 CP-ACC-ben szenvedő beteg preoperatív plazmamintáit elemeztük és vizsgáltuk a korrelációt a keringő miRNS-ek (-dCT) szintje és a kortizolszekréción paraméterek között (bazális kortizol, 24 órás gyűjtött vizelet szabad kortizol és kortizol kis dózisu dexametazon szuppressziós teszt (LDDT) után). 7 plazma párban elemeztük a miRNS-ek kifejeződésének változását LDDT előtt és után.

III.2. Extracelluláris vezikula izolálás és EV preparátumok vizsgálata

Munkám első részében két különböző EV izolálási módszert is használtunk. Második munkámban az EV izolálást precipitációs módszerrel, a Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával történt a gyártó utasításai szerint. Második módszerként az EV izolálást plazmából differenciált ultracentrifugálási módszerrel végeztük el.

Az ultracentrifugálással izolált EV-kat transzmissziós elektronmikroszkóppal elemeztük. A metszetek elemzéséhez Hitachi 7100 elektronmikroszkópot (Hitachi Ltd) használtunk.

Az EV-kat áramlási citometriával is vizsgáltuk. Az EV-kat formaldehid/szulfát Latex gyöngyök (Molecular Probes) felszínéhez kötöttük. Munkánk során a CD9, a CD63, a CD81 és az annexin V molekulákat vizsgáltuk. Az áramlási citometriát FACSCalibur (BD Biosciences) eszközön hajtottuk végre és elemzéséhez FlowJo szoftvert használtunk (Tri Star Inc).

Az EV-k méreteloszlását dinamikus fényszórás módszerrel Zetasizer Nano S eszközön (Malvern Instrument) határoztuk meg.

III.3. RNS-izolálás és mikroRNS expressziós vizsgálatok

III.3.1. Plazma EV-asszociált RNS izolálás

A teljes RNS kivonás Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával történt. A munkám során minden esetben a cel-miR-39 spike-in kontrollt használtuk referencia génként.

Az ultracentrifugálással izolált EV-kből az RNS izoláláshoz (n=4 ACA, n=4 ACC) az RNeasy Mini Kit (Qiagen) és az RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) használtunk a gyártó utasításai szerint. A vezikuláris RNS-ek elemzéséhez kapilláris

elektroforézist alkalmaztunk (Agilent Small RNA Kit) Agilent 2100 Bioanalyzer felhasználásával (Agilent Technologies).

III.3.2. Nagy áteresztőképességű miRNS expressziós mérések

Az EV-asszociált miRNS expresszió profilozást TaqMan Array Human MicroRNA A-kártyával v2.0 pool (Thermo Fisher Scientific) végeztük el. Mintánként 377 emberi miRNS expresszióját vizsgáltuk.

A nyers adatok statisztikai értelmezését az Applied Biosystems qPCR Analysis Modules on Thermo Fisher Cloud szoftverrel végeztük el.

III.3.3. Validálás egyedi kvantitatív PCR mérésekkel

Nagy áteresztőképességű TaqMan Low Density Array (TLDA) mérések alapján, kettő miRNS expresszáladását (hsa-miR-101 és hsa-miR-483-5p) vizsgáltuk 18 ACA és 16 ACC mintán RT-qPCR módszerrel. A miRNS expressziós méréseket egyedi TaqMan próbákkal végeztük el. Az adatok értékeléséhez a $-dCT$ (CT) módszert alkalmaztuk.

Az ultracentrifugálási módszerrel izolált EV-asszociált hsa-miR-483-5p miRNS-ek expresszióját a fent részletezett módon elemeztük. Munkám második részében az alábbi öt miRNS

expresszióját elemeztük: hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-3p, hsa-miR-210-3p, hsa-miR-320b és hsa-miR-375.

III.4. Statisztikai elemzés

Az adatok statisztikai elemzéséhez GraphPad Prism 7.02 (GraphPad Software) szoftvert használtunk. Az első munkámban az az ACA és az ACC között eltérő expressziót mutató miRNS-eket Student féle T-próbával vagy Mann-Whitney teszttel elemeztük a Shapiro-Wilk normalitás teszt eredménye alapján. Minden összehasonlításban a $p < 0,05$ eredményt fogadtam el statisztikailag szignifikánsnak. A miRNS-ek preoperatív diagnosztikai alkalmazhatóságát Receiver Operating Characteristics (ROC) analízissel vizsgáltuk (GraphPad).

Munkám második részében a miRNS-ek kifejeződésének különbözőségét a három csoportban Shapiro-Wilk normalitás teszt eredményétől függően ANOVA-t követő Tukey-féle poszt-hoc teszttel vagy Kruskal-Wallis tesztet követő Dunn teszttel elemeztük. Spearman korrelációt használtunk a miRNS –dCT értékei illetve a kortizolszekréciós paraméterek közötti kapcsolat megítéléséhez. A miRNS-ek LDDT követő kifejeződésbeli változásának megítélése céljából a Shapiro-Wilk normalitás teszt után Student-féle T-próbát használtunk.

IV. Eredmények

IV.1 Az extracelluláris vezikulák jellemzése

Az ultracentrifugálási módszerrel izolált EV-król transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) készített mikrofényképek megerősítették, hogy az általunk izolált EV-k az irodalomban az exoszómákra jellemző morfológiai és méretbeli tartományba esnek

Ultracentrifugálási módszerrel izolált EV-k áramlási citometriai vizsgálatával igazolni tudtuk a CD9, CD63 és CD81 membrán fehérjék és az annexin V citoszolikus fehérje jelenlétét. A Kit felhasználásával izolált EV-k esetén a CD9, CD81 és annexin V kifejeződését tudtuk azonosítani. Így a TEM és az áramlási citometria módszerével is igazoltuk az EV-k jelenlétét a mintákban.

Az extracelluláris vezikulák méreteloszlásának meghatározásához dinamikus fényszórásmérés technikát alkalmaztunk. Összesen 4 mintát elemeztünk, amelyeket Kit felhasználásával izoláltunk. A Z-átlagérték a 4 mintában $80,83 \pm 19,07$ nm adódott.

IV.2. EV-asszociált miRNS expressziós mintázat vizsgálata mellékvesekéreg daganatokban

12 preoperatív plazma EV minta miRNS expressziós profilját elemeztük (n=6 ACA, n=6 ACC), annak céljából, hogy különböző kifejeződésű keringő EV-asszociált miRNS-eket azonosítsunk ACC és ACA között. Nem találtunk olyan miRNS-t ami szignifikáns mértékben eltért volna a két csoportban. Két miRNS (hsa-miR-101 és hsa-miR-483-5p) tendenciózus mértékben eltérő kifejeződést mutatott a két

csoport között. Így ezeket választottuk ki további célzott validáció céljára.

IV.3. A miRNS expresszió vizsgálata RT-qPCR módszerrel

IV.3.1. Mellékvesekéreg-adenoma és carcinoma összehasonlítása

Két miRNS esetén szignifikánsan magasabb kifejeződési értéket találtunk preoperatív ACC (n=16) plazma EV mintákban ACA (n=18) mintákhoz viszonyítva. A szignifikancia szint hsa-miR-101 esetén $p=0,0052$ -nek, míg hsa-miR-483-5p esetén $p<0,0001$ -nek adódott.

Az ultracentrifugával izolált EV-k esetén is szignifikánsan magasabb kifejeződését találtuk a hsa-miR-483-5p-nek az ACC (n=4) betegcsoportban ACA-hoz (n=4) viszonyítva ($p=0,0221$).

IV.3.2. Hormonálisan inaktív mellékvesekéreg adenomák és kortizoltermelő jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok összehasonlítása

Munkám második részében a plazma EV-eredetű miRNS-ek kifejeződését vizsgáltam hormonálisan inaktív ACA-ban (n=13, NFA), kortizoltermelő ACA-ban (n=13, CPA) és kortizoltermelő ACC-ban (n=9, CP-ACC).

Az NFA csoportban szignifikáns mértékű alulexpresszáldást találtunk hsa-miR-22-3p esetén CPA-hoz viszonyítva (fold change (FC)=3,21; $p<0,01$), továbbá CP-ACC-hoz képest is (FC=7,34; $p<0,0001$).

A hsa-miR-27a-3p szignifikánsan kisebb mértékben fejeződött ki NFA-ban a kortizoltermelő daganatokhoz viszonyítva, mind

CPA-hoz képest (FC=3,55; $p<0,05$), mind CP-ACC-hez viszonyítva (FC=4,59; $p<0,05$).

A hsa-miR-320b szignifikánsan magasabb expresszióját igazoltuk a CP-ACC csoportban (FC=10,88 $p<0,0001$) és a CPA csoportban (FC=2,57 $p<0,05$) NFA-hoz viszonyítva. CP-ACC-ben is szignifikánsan magasabb értéket mutatott a kifejeződés CPA-hoz viszonyítva ($p<0,01$).

Hsa-miR-210-3p tekintetében csak a CP-ACC csoportban tudunk szignifikáns mértékű felülexpresszáldást kimutatni NFA-hoz viszonyítva (FC=3,1 $p<0,05$).

Nem találtunk szignifikáns kifejeződésbeli eltérést a hsa-miR-375 esetében a három tumor csoport között

IV.4. Mellékvesekéreg carcinomák azonosítására alkalmas minimálisan invazív biomarker miRNS-ek vizsgálata ROC-analízissel

Munkám első részében ROC analízissel vizsgáltuk az EV-asszociált miRNS-ek potenciális alkalmazhatóságát minimálisan invazív biomarkerként a malignitás előrejelzésére adrenocorticalis daganatokban. E célból a szignifikáns expressziós eltérést mutató miRNS-eket (hsa-miR-101 és hsa-miR-483-5p) vizsgáltuk. A $dCT_{hsa-miR-483-5p}$ mutatta a legnagyobb görbe alatti területet: 0,965. A teszt szenzitivitása 87,5%, míg a specificitása 94,44% volt ACA és ACC megkülönböztetésében. A hsa-miR-101 esetén a ROC elemzéssel nem adódott kellően magas szenzitivitási (68,75%) és specificitási (83,33%) érték.

Munkám második részében ROC analízissel vizsgáltam a hsa-miR-320b diagnosztikai hatékonyságát CPA és CP-ACC elkülönítésére. A klinikai alkalmazhatósághoz (görbe alatti

terület: 0,8632) nem találtunk kellően magas szenzitivitási (88,89%) és specificitási (76,92%) értéket.

IV.5. Keringő EV-asszociált miRNS expresszió és kortizolszokréción paraméterek közötti korreláció vizsgálata

Spearman-korrelációs vizsgálattal elemeztük a keringő miRNS (-dCT) és kortizolszokréción paraméterek közötti kapcsolatot. Ezek alapján nem találtunk kapcsolatot a bazális kortizol szint és a miRNS-ek kifejeződése között. Szignifikáns kapcsolatot tudtunk azonban igazolni a vizelet szabad kortizol szintje és a hsa-miR-22-3p ($r=0,7606$; $p<0,0001$), a hsa-miR-27a-3p ($r=0,7628$; $p<0,0001$) és a hsa-miR-320b expressziója között ($r=0,7843$; $p<0,0001$).

Ezenkívül szignifikáns korrelációt mutattunk ki LDDT utáni kortizol koncentráció és a hsa-miR-22-3p ($p=0,0237$) illetve a hsa-miR-320b ($p=0,0216$) expressziója között.

IV.6. Kis dózisu dexametazon tesztnek a miRNS-ek expresszióját befolyásoló hatásának vizsgálata

Munkacsoportunk korábbi vizsgálata során a miRNS expresszió esetleges változásait tanulmányozta kis dózisu dexametazon teszt és ACTH-stimulációs teszt során normális működésű hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengellyel rendelkező egyénekbén. E plazmamintákat újra vizsgáltuk három EV-eredetű miRNS expressziójának elemzése céljából 7 normálisan működő hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengellyel rendelkező páciensnél LDDT előtt és után. Ezek alapján az EV-eredetű hsa-miR-27a-3p kifejeződését az 1 mg dexametazon szignifikáns mértékben

serkentette. Hsa-miR-22-3p és hsa-miR-320b esetén tendenciózus, a szignifikancia határát nem elérő változást találtunk.

V. Következtetések

1.1. Egy piaci forgalomban elérhető kit vizsgálatával egy olyan EV-izolálási módszer hatékonyságát bizonyítottuk, amely a mindennapi klinikai gyakorlatban is felhasználható. A kit eredményei párhuzamosak voltak az ultracentrifugáción alapuló, arany standardnak számító protokollal, amely klinikai célokra nehezen alkalmazható. Áramlási citometriával mind a kit, mind az UC-val izolált EV-k esetén ki tudtuk mutatni az EV-ra jellemző felszíni markerek közül az annexin V, a CD9 és a CD81 jelenlétét. Dinamikus fényszórás mérésével elvégzett méreteloszlás vizsgálata is megerősítette, hogy az általunk izolált EV-k mérettartománya megegyezik a szakirodalomban leírtakkal.

1.2. A nagy átteresztőképességű TLDA A-kártyával elvégzett EV-eredetű miRNS profilozás alapján tendenciózus mértékben eltérően expresszálódó hsa-miR-101 és hsa-miR-483-5p szignifikáns mértékű felülexpresszálódását tudtuk kimutatni független és magasabb elemszámú minták esetén RT-qPCR módszerrel ACC-ben szenvedő betegek vérmintáiban ACA csoporthoz viszonyítva.

1.3. A hsa-miR-483-5p diagnosztikai hatékonyságát az ACA és ACC elkülönítésére ROC-analízissel vizsgálva a klinikai gyakorlatban is alkalmazható, kellően magas szenzitivitási (87,5 %) és specificitási (94,44 %) értéket találtunk 0,965 görbe alatti területtel.

1.4. Mind az ultracentrifuga, mind a kit alkalmazásával izolált EV-k esetén sikeresen ki tudtuk mutatni a hsa-miR-483-5p szignifikáns mértékű felülexpresszálódást az ACC betegcsoportban.

1.5. A fentiek alapján az EV-eredetű hsa-miR-483-5p minimálisan invazív biomarker lehet a mellékvesekéreg-rák preoperatív diagnosztikájában.

2.1. Korábbi saját eredményeink és irodalmi adatok alapján kiválasztott 5 miRNS közül a hsa-miR-22-3p, a hsa-miR-27a-3p és hsa-miR-320b szignifikánsan felülexpresszáldott a kortizoltermelő (CPA és CP-ACC) daganatokban NFA-hoz viszonyítva. A hsa-miR-320b CP-ACC-ben is magasabb kifejeződést mutatott CPA-hoz képest. A hsa-miR-210-3p csak CP-ACC-ben expresszáldott felül szignifikáns mértékben NFA-hoz képest. A hsa-miR-375 expressziója nem mutatott eltérést a három betegcsoportban.

2.2. Az eredményeink alapján az EV-eredetű miRNS-ek eltérő módon expresszáldódnak hormonálisan inaktív és kortizoltermelő mellékvesekéreg-daganatokban.

3.1. Szignifikáns mértékű korrelációt igazoltunk a kortizolszekréciós paraméterek közül a 24 órás gyűjtött vizelet szabad kortizolszintje és a hsa-miR-22-3p, hsa-miR-27a-3p és hsa-miR-320b expressziója között. A kis dózisú dexametazon teszt utáni másnap reggeli kortizol koncentráció és a hsa-miR-22-3p és hsa-miR-320b kifejeződése között is szignifikáns kapcsolatot mutattunk ki. A basalis reggeli kortizolszint és a miRNS-ek expressziója között kapcsolatot nem tudtunk igazolni.

3.2. A hsa-miR-27a-3p kifejeződését szignifikáns mértékben fokozta a kis dózisú dexametazon teszt fiziológiásan funkcionáló hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengellyel rendelkező egyének esetében.

VI. A disszertáció témájához kötődő saját publikációk jegyzéke

1. **Perge P**, Butz H, Pezzani R, Bancos I, Nagy Z, Pálóczi K, Nyíró G, Decmann Á, Pap E, Luconi M, Mannelli M, Buzás EI, Tóth M, Boscaro M, Patócs A, Igaz P. (2017) Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci Rep*, 7(1): 5474.
Impakt faktor 2016: 4,259

2. **Perge P**, Decmann Á, Pezzani R, Bancos I, Fassina A, Luconi M, Canu L, Tóth M, Boscaro M, Patócs A, Igaz P. (2018) Analysis of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in cortisol-producing adrenocortical tumors. *Endocrine*, 59(2): 280–287.
Impakt faktor 2016: 3,131

VII. A disszertáció témájához közvetlenül nem kapcsolódó saját publikációk jegyzéke

1. **Perge P**, Decmann A, Igaz P. (2015) A neuroendokrin daganatok kezelése szomatostatinanalógokkal. MAGYAR BELORVOSI ARCHIVUM 68(6): 317-322.
2. **Perge P**, Nagy Z, Igaz I, Igaz P. (2015) Suggested roles for microRNA in tumors. BIOMOLECULAR CONCEPTS 6(1): 149-155.
3. Nagy Z, Baghy K, Hunyadi-Gulyás E, Micsik T, Nyirő G, Rácz G, Butz H, **Perge P**, Kovalszky I, Medzihradzky KF, Rácz K, Patócs A, Igaz P. (2015) Evaluation of 9-cis retinoic acid and mitotane as antitumoral agents in an adrenocortical xenograft model. AMERICAN JOURNAL OF CANCER RESEARCH 5(12): 3645-3658.
Impakt faktor: 3,425
4. Igaz I, Nyirő G, Nagy Z, Butz H, Nagy Z, **Perge P**, Sahin P, Tóth M, Rácz K, Igaz P, Patócs A. (2015) Analysis of Circulating MicroRNAs In Vivo following Administration of Dexamethasone and Adrenocorticotropin. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 2015:589230.
Impakt faktor: 2,376
5. **Perge P**, Nagy Z, Decmann A, Igaz I, Igaz P. (2017) Potential relevance of microRNAs in inter-species epigenetic communication, and implications for

disease pathogenesis. RNA BIOLOGY 14(4): 391-401.

Impakt faktor 2016: 3,9

6. Nagy Z, Szabó PM, Grolmusz VK, **Perge P**, Igaz I, Patócs A, Igaz P. (2017) MEN1 and microRNAs: The link between sporadic pituitary, parathyroid and adrenocortical tumors? MEDICAL HYPOTHESES 99: 40-44.

Impakt faktor 2016: 1,066

7. Decmann A, **Perge P**, Nagy Z, Butz H, Patócs A, Igaz P. (2017) Keringő mikroRNS-ek az endokrin daganatok diagnosztikájában. ORVOSI HETILAP 158(13): 483-490. **Impakt faktor 2016: 0,349**

8. Decmann Á, **Perge P**, Tóth M, Igaz P. (2018) Adrenal myelolipoma: a comprehensive review. Endocrine 59(1): 7-15. **Impakt faktor 2016: 3,131**

9. Nagy Z, Decmann A, **Perge P**, Igaz P. (2018) A mikro-RNS-ek patogenetikai és diagnosztikai szerepe mellékvesekéreg-carcinomában ORVOSI HETILAP 159(7): 245-251.

Impakt faktor 2016: 0,349

VIII. Köszönetnyilvánítás

Nagyon szépen köszönöm témavezetőmnak, **Prof. Dr. Igaz Péter** egyetemi tanár úrnak, a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika jelenlegi igazgatójának, hogy PhD munkám témavezetőjeként minden nap számíthattam értékes szakmai tanácsaira, és, hogy mindvégig töretlen lelkesedéssel támogatott és formálta kutatói szemléletem. Köszönöm továbbá a szakmai és emberi példamutatását is!

Szeretném kifejezni köszönetemet **Prof. Dr. Rácz Károly** és **Prof. Dr. Tóth Miklós** tanár uraknak, a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika volt igazgatóinak, hogy kutatómunkámat mindvégig támogatták. Nagyon köszönöm értékes szakmai tanácsaikat és javasolataikat is!

Köszönöm **Dr. Tulassay Zsolt** és **Dr. Tulassay Tivadar** professzor uraknak, a Semmelweis Egyetem Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola volt és jelenlegi vezetőinek, hogy doktori munkámat mindenben támogatták és, hogy lehetőséget biztosítottak kutatásom elvégzésére.

Köszönöm TDK munkám témavezetőjének, **Dr. Patócs Attila** egyetemi docens úrnak, hogy kutatómunkám kezdetén is messzemenően támogatott és segített. Továbbá kiemelkedő szakmai tudásával PhD-kutatásom alatt mindvégig hasznos tanácsokkal látott el, melyek számottevően javították közös publikációink színvonalát!

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Buzás Edit** professzor asszonynak és **Pálóczy Krisztina** intézeti mérnöknek a Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet munkatársainak az

extracelluláris vezikula preparátumok és az áramlási citometriai vizsgálatok tekintetében. Köszönöm **Mészáros Tamás** mérnöknek, a SeroScience Kft. és Nanomedicina Kutató és Oktató Központ munkatársának a dinamikus fényszórás mérés elvégzése és értékelése miatt.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika endokrin munkacsoportja minden tagjának valamint az Endokrin Genetikai Laboratórium posztdoktor kutatóinak (**Dr. Butz Henriett, Dr. Doleschall Márton, Dr. Nyíró Gábor**), volt és jelenlegi PhD hallgatóinak (**Dr. Decmann Ábel, Fülöpné Németh Kinga, Dr. Grolmusz Vince, Dr. Kövesdi Annamária, Dr. Molnár Ágnes, Dr. Nagy Zoltán, Dr. Nagy Zsolt, Dr. Sarkadi Balázs, Dr. Stark Júlia és Dr. Sumánszki Csaba**) és asszisztensnek (**Benkő Mariann**) mindennapos szakmai segítségüket valamint a Laboratóriumra jellemző baráti légkör biztosítását. Továbbá a **Szteroid és Izotóp laboratórium és a Klinika összes dolgozójának**, hogy bármikor segítségért fordulhattam hozzájuk.

Nem utolsó sorban pedig köszönettel tartozom **páromnak, szüleimnek és testvéreimnek** a sok szeretetért, türelemért és támogatásért, amit az évek során kaptam tőlük. Nélkülük ez a munka nem születhetett volna meg. Nagyon köszönöm szüleim töretlen biztatását és önzetlen támogatását valamint példamutató emberi tartásukat!