

A 9-cisz retinsav és a mitotán tumorellenes hatásainak
és a mikroRNS kifejeződés mintázatának vizsgálata
mellékvesekéreg-rák xenograft modelljein

Doktori értekezés

Nagy Zoltán

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Igaz Péter, D.Sc., egyetemi docens
Hivatalos bírálók: Dr. Nagy Bálint, D.Sc., egyetemi docens
Dr. Garami Miklós, Ph.D., egyetemi docens
Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sági Zoltán, D.Sc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Hubina Erika, Ph.D., főorvos
Dr. Borka Katalin, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2016

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
I. BEVEZETÉS.....	8
II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	10
II.1. Mellékvesekéreg-carcinoma.....	10
<i>II.1.1. Epidemiológia.....</i>	<i>10</i>
<i>II.1.2. Patogenezis</i>	<i>10</i>
II.1.2.1. Örökletes daganatszindrómákban érintett genetikai eltérések és patogenetikai tényezők	11
II.1.2.2. Modern kutatási módszerekkel megismert patogenetikai tényezők	13
II.1.2.2.1. Kromoszómavizsgálatok	14
II.1.2.2.2. Teljes exom szekvenálás	14
II.1.2.2.3. Génexpressziós vizsgálatok	16
II.1.2.2.4. DNS metilációs vizsgálatok	16
II.1.2.2.5. MikroRNS vizsgálatok	17
II.1.2.3. Munkacsoportunk funkcionális genomikai vizsgálatainak eredményei	19
<i>II.1.3. Diagnózis</i>	<i>22</i>
II.1.3.1. Jelentkezési formák, klinikai kép.....	22
II.1.3.1.1. Hormontúltermelés jelei	22
II.1.3.1.2. Hasi, lokális panaszok	22
II.1.3.1.3. Véletlenszerű felfedezés - Incidentaloma	22
II.1.3.2. Hormonális kivizsgálás.....	22
II.1.3.3. Képkeltető módszerek.....	23
II.1.3.4. Szövettan, immunhisztokémia	24
<i>II.1.4. Stádiumbeosztás - Progresszió.....</i>	<i>25</i>
<i>II.1.5. Terápia.....</i>	<i>26</i>
II.1.5.1. Eltávolítható, lokális tumorok.....	27
II.1.5.1.1. Sebészet	27
II.1.5.1.2. Adjuváns terápia	27
II.1.5.2. Kiterjedt, metasztatikus tumorok	28
II.1.5.2.1. Sebészet	28
II.1.5.2.2. Szisztémás tumorelles terápia	29
II.1.5.2.3. Célzott terápia	29

II.1.5.2.4. Egyéb terápiás lehetőségek	30
II.2. Xenograft tumor modellek	30
<i>II.2.1. Kivitelezés</i>	<i>31</i>
II.2.1.1. Beültetés helye	31
II.2.1.2. Sejtvonala vagy szövettani típus	32
<i>II.2.2. Mellékvesekéreg-rák preklinikai modelljei</i>	<i>32</i>
II.2.2.1. SW-13	32
II.2.2.2. NCI-H295R	32
II.2.2.3. SJ-ACC3	33
II.2.2.4. MUC-1	33
<i>II.2.3. ACC xenograft modellek</i>	<i>33</i>
II.3. MikroRNS-ek	36
<i>II.3.1. A szöveti mikroRNS-ek diagnosztikai szerepe</i>	<i>36</i>
<i>II.3.2. A keringő mikroRNS-ek jelentősége, diagnosztikai szerepe</i>	<i>36</i>
III. CÉLKITŰZÉSEK	40
IV. MÓDSZEREK	41
IV.1. Sejttenyésztés	41
IV.2. Xenograft modell	41
IV.3. Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálat	42
IV.4. RNS-izolálás tumor szövetből	43
IV.5. Hírvivő RNS (mRNS) expressziós profil meghatározása	43
IV.6. mRNS profil eredményeinek validálása reverz transzkripció kvantitatív polimeráz láncreakció (RT-qPCR) módszerrel	44
IV.7. Fehérjeizolálás	44
IV.8. Proteomikai elemzés	45
IV.9. Western blot analízis	46
IV.10. Útvonalelemzés	47
IV.11. Plazma RNS-izolálás	47
IV.12. Plazma exoszóma RNS-izolálás	47
IV.13. Keringő mikroRNS-ek mérése RT-qPCR módszerrel	48

IV.14. Szöveti mikroRNS mérés RT-qPCR módszerrel.....	49
IV.15. Statisztikai analízis	49
V. EREDMÉNYEINK.....	50
V.1. A tumor növekedésének elemzése.....	50
V.2. Szövettan és Ki-67 értékelés	52
V.3. Microarray elemzés.....	54
V.4. RT-qPCR validáció	56
V.5. Proteomikai elemzés	58
V.6. Western blot vizsgálat.....	59
V.7. Funkcionális útvonalelemzés.....	61
V.8. MikroRNS kifejeződés	62
VI. MEGBESZÉLÉS.....	66
VII. KÖVETKEZTETÉSEK.....	72
VIII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	74
IX. SUMMARY	75
X. IRODALOMJEGYZÉK	76
XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	92
XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	94

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

¹¹C-MTO	¹¹ C-metomidát
11β-HSD	11-béta hidroxiszteroid dehidrogenáz
¹⁸FDG PET	Fluordezoxiglükóz pozitronemissziós tomográfia
ACA	Mellékvesekéreg-adenoma
ACC	Mellékvesekéreg-rák/mellékvesekéreg-carcinoma
ACTH	Adrenokortikotróp hormon
Akt	Fehérjekináz B
ALDH1A1	Aldehid dehidrogenáz 1A1
ALDH1A3	Aldehid dehidrogenáz 1A3
APC	Adenomatózus polipózis coli
APOA4	Apolipoprotein A-IV
ATRX	X-kapcsolt helikáz II
BAALC	Brain and Acute Leukemia, Citoplazmatikus
BCL2	B-cell lymphoma 2
CCNB1	Ciklin B1
CCNE1	Ciklin E1
CCNE2	Ciklin E2
CDK4	Ciklin-dependens kináz 4
CDK7	Ciklin-dependens kináz 7
CDKN1C	Ciklin-dependens kináz inhibitor 1C
CDKN2A	Ciklin-dependens kináz inhibitor 2A
cDNA	Komplementer DNS
CID	Ütközésindukált bomlás
CIMP	Cpg sziget metilátor fenotípus
CpG	Citozin-guanin
CT	Komputertomográfia
CTNNB1	β -katenin

CXCR3	Kemokin receptor 3
CYP11A1	Citokróm P450 11A1
CYP11B1	Citokróm P450 11B1/Szteroid 11-béta-hidroxiáz B1
CYP11B2	Citokróm P450 11B2/Aldoszteron szintáz
CYP3A4	Citokróm P450 3A4
DAXX	Death-associated protein 6/Halál-asszociált fehérje 6
ΔCT	Küszöb ciklus szám változás
DDT	Diklór-difenil-triklóretán
DGCR8	DiGeorge-szindróma kromoszóma/kritikus régió 8
DHEA-S	Dehidroepiandrosteron-szulfát
Dicer	Helikáz RNáz mintával
DLK1	Delta-szerű nem kanonikus Notch ligand 1
EDP/M	Etopozid doxorubicin ciszplatin/mitotán
EGFR	Epidermális növekedési faktor receptor
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumors
ERK1/2	Extracelluláris jel regulált kináz 1/2
ERα	Ösztrogén receptor alfa
FIRM-ACT	First International Randomized trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Carcinoma Treatment
GPER	G-fehérje kapcsolt ösztrogén receptor 1
HIF-1α	Hipoxia indukált faktor-1alfa
HPF	High-powered field
HRP	Horseradish peroxidase/tormaperoxidáz
HU	Hounsfield egység
IGF-1R	Inzulinszerű növekedési faktor 1-es receptor
IGF2	Inzulinszerű növekedési faktor 2
IGF-2	Inzulinszerű növekedési faktor 2
IGFBP-2	Inzulinszerű növekedési faktorkötő fehérje 2
IL-13	Interleukin-13
IL13Rα2	Interleukin-13 receptor alfa 2

LC-MSMS	Folyadék kromatográfia-tömegspektrometria
LXR	Liver X receptor
LXRA	Liver X receptor A
MAP4K	Mitogén-aktivált fehérjekináz kináz kináz kináz
MAP4K3	Mitogén-aktivált fehérjekináz kináz kináz kináz 3
MAPK	Mitogén-aktivált fehérjekináz
MATE2	Solute carrier family 47 A2
MDM2	Mouse double minute 2 homolog
MEG3	Maternally expressed 3/Anyaian kifejeződő 3
MEK	Mitogén-aktivált fehérje kináz kináz
MEN1	Multiplex endokrin neoplázia 1-es típus
MHCII	Major hisztokompatibilitás komplex II
MRI	Mágnesesrezonancia-képalkotás
mRNS	Hírvivő RNS
MSH2	Muts fehérje homológ 2
mTOR	Mammalian target of rapamycin
o,p-DDD	Mitotán/2,4'-diklórdifenil-diklóretán
PACT	Interferon-indukált fehérje kináz fehérje aktivátora
PAGE	Poliakrilamid gél elektroforézis
Pasha	Partner of Droscha/Droscha partnere
PDE4A	Camp-specifikus 3',5' foszfodiészteráz 4A
PI3K	Foszfatidilinozitol-4,5-bifoszfát 3-kináz
PRDM1	PR domain zinc finger protein 1/PR domén cink ujjú fehérje 1
PTEN	Phosphatase and tensin homolog/Foszfataz és tenzin homológ
PVDF	Polivinilidénfluorid
RAR	Retinoic acid receptor/Retinsav receptor
RB1	Retinoblasztoma fehérje
RIN	RNS integritási érték
RISC	RNA induced silencing complex/RNS-indukált csendesítő komplex
RLC	RISC loading complex/RISC töltő komplex

RNS	Ribonukleinsav
ROC	Receiver operating characteristic
ROI	Region of interest
RPM	Revolutions per minute/Fordulat percenként
RT-qPCR	Reverz transzkripció kvantitatív polimeráz lánreakció
RXR	Retinoid X receptor
RXRA	Retinoid X receptor A
RXRB	Retinoid X receptor B
SCID	Súlyos kombinált immunhiány
SDS	Nátrium dodecil-szulfát
SET	SET fehérje
STAR	Steroidogenic acute regulatory protein /szteroidogenezis akut reguláló fehérje
SUV	Standardized uptake value/Standardizált felvételi érték
T1	T1-súlyozás
T2	T2-súlyozás
TBS	Tris-buffered saline/Tris pufferolt sóoldat
TERF2	Telomeric repeat-binding factor 2/Telomer ismétlődés kötő faktor 2
TERT	Telomeráz reverz transzkriptáz
TGFBI	Transzformáló növekedési hormon béta 1
TLDA	Taqman Low Density Arraysy
TNM	Classification of Malignant Tumours/Rosszindulatú Tumorok osztályozási rendszere
TP53	Tumorsuppresszor p53
UH	Ultrahang
UICC	Union for International Cancer Control
VEGF	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VEGFR	Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor receptor
ZNF625	Zinc finger protein 625/Cink ujjú fehérje 625
ZNRF3	Zinc and ring finger 3/Cink és gyűrű ujj 3

I. BEVEZETÉS

A mellékvesekéreg-rák (adrenocorticalis carcinoma, ACC) egy ritka, de rossz prognózisú daganat. Diagnózisában és kezelésében számos probléma ismert. Ezek közé tartoznak a képalkotó diagnosztika nehézségei, illetve az, hogy nincs olyan preoperatív laboratóriumi marker, ami a rosszindulatúságot egyértelműen jelezné. Az eltávolított daganat szövettani vizsgálata nehéz, és nagy gyakorlatot igényel. Terápiájában a sebészi kezeléson kívül kevés hatékony módszer ismert. Jelenleg egyetlen mellékvesekéreg specifikus szer ismert, a DDT származék, adrenolitikus hatású és számos mellékhatással bíró mitotán (o,p-DDD), melyet már több mint 60 éve alkalmazunk a klinikai gyakorlatban annak ellenére, hogy hatásmechanizmusát a mai napig sem ismerjük pontosan [1]. Az áttétes formák szisztémás kemoterápiás kezelésében a legjobb eredményt az etopozid, doxorubicin, ciszplatin és mitotán kombinációval érték el, amivel így is csak 14,8 hónap az átlagos túlélés [2, 3]. Mindezen okok miatt intenzív kutatások folynak új, kedvezőbb mellékhatásprofilú, jobb hatásfokú szerek azonosítása céljából.

Korábbi *in silico* tanulmányunkban mellékvese-daganatok funkcionális genomikai útvonalelemzése során megállapítottuk, hogy a mellékvesekéreg-rák patomechanizmusában fontos szerepet tölt be a retinsav-jelátvitel retinoid X receptoron keresztüli csökkenése [4]. Ezen eredmények alapján munkacsoportunk a receptor specifikus ligandjával, a 9-cisz retinsavval végzett *in vitro* kísérleteket, melyekben a 9-cisz retinsav idő és dózis függvényében csökkentette az NCI-H295R humán mellékvesekéreg-rák sejtvonal hormonszekrécióját és életképességét, valamint jelentős génexpressziós változásokat is kiváltott. *In vivo* pedig egy kis elemszámú, összesen 6 egeret tartalmazó előkísérletben, a 9-cisz retinsav csökkentette a NCI-H295R xenograft tumorok növekedését, és tumorellenes hatást fejtett ki [5].

Az értekezésem alapjául szolgáló munkában a 9-cisz retinsav mellékvesekéreg-rákra gyakorolt hatásának *in vivo* vizsgálatát tűztük ki célul egy nagy elemszámú NCI-H295R mellékvesekéreg-rák egér xenograft modellen. Az egereket mitotánnal, 9-cisz retinsavval, valamint a két szer kombinációjával kezeltük, majd a kezelés végén patológiai,

génexpressziós és fehérje elemzést végeztünk a lehetséges hatás mechanizmusának felderítése érdekében. A mikroRNS-ek expressziós mintázatát is vizsgáltuk, melyhez más xenograft modelleket is felhasználtunk egy nemzetközi kollaboráció keretében.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II.1. Mellékvesekéreg-carcinoma

II.1.1. Epidemiológia

A mellékvesekéreg-rák egy agresszív és ritka daganat. Incidenciája évente 0,5-2 eset/millió fő [6–10], mely egyes területeken genetikai, epigenetikai okok miatt eltérhet. Erre egy jó példa Brazília, ahol a gyermekkori ACC magasabb esetszáma a populációt a világlátnál gyakrabban érintő TP53 gén csírasejtes mutációjának köszönhető [11, 12]. A mellékvesekéreg-rák előfordulása az életkort tekintve bimodális, az egyik csúcs az első évtized előtt, gyermekkori ACC formájában, míg a második a negyedik, ötödik évtizedben, átlagosan 46-55 év között jelentkezik. Megfigyelhető továbbá, hogy a női nem gyakrabban érintett. Kockázati tényezőként férfiaknál a dohányzást, nőknél a 25 éves kor előtt történő orális fogamzásgátló szerek szedését írták le [6, 8, 9, 13–16]. Ötéves túlélése változó, 16-40%-os, mely erősen függ a felfedezés pillanatában leírt tumor stádiumától.

II.1.2. Patogenezis

Az ACC patogenezisét az utóbbi évek kutatásainak köszönhetően egyre részletesebben ismerjük, de továbbra is messze állunk attól, hogy átfogó képünk legyen a tumor kialakulásának mechanizmusáról. Ebben korábban elsősorban azon ritka daganatszindrómák hátterében álló genetikai eltérések azonosítása játszotta a főszerepet, melyekben a mellékvesekéreg-rák is előfordulhat [8, 9, 17–19].

Az utóbbi években a bioinformatika, a nagy áteresztőképességű vizsgálati módszerek, mint pl. mRNS, mikroRNS microarray, proteomikai módszerek, teljes genom szekvenálás stb. térnyerése által teljesen új dimenziók nyíltak a kutatásban.

II.1.2.1. Örökletes daganatszindrómákban érintett genetikai eltérések és patogenetikai tényezők

A modern, nagy átteresztőképességű vizsgálati módszerek elterjedése előtt az ACC kialakulásában szerepet játszó folyamatokat olyan örökletes daganatszindrómák genetikai hátterének felderítésével vizsgálták, melyekben mellékvesetumor is megjelenhet. Ezen daganatszindrómákat, ill. genetikai hátterüket, klinikai megjelenésüket összegzem a következő táblázatban [1. Táblázat].

1. Táblázat: Örökletes daganatszindrómák mellékvesekéreg-érintettséggel

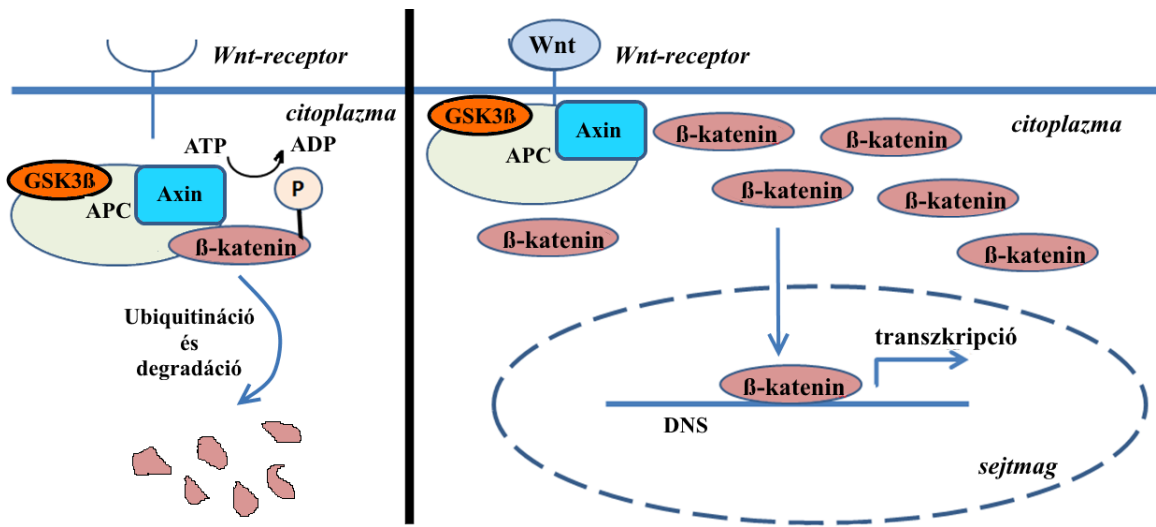
Örökletes daganatszindróma	Gén	Klinikai kép
Li-Fraumeni-szindróma	TP53	szarkóma, plexus choroideus tumor, emlődaganat, agydaganat, leukémia, mellékvesekéreg-rák
Beckwith-Wiedemann-szindróma	IGF2, CDKN1C, H19	prae-, postnatalis túlnövés, macroglossia, facialis naevus flammeus, visceromegalia, hasfali malformációk, vese- és szívfejlődési rendellenességek, mellékvesekéreg-rák
Familiáris adenomatózus polipózis	APC	vastagbél-polipózis, desmoidtumor, pajzsmirigy-tumor, mellékvesekéreg-daganat
Multiplex endokrin neoplázia 1	MEN1	primer hyperparathyrosis, neuroendokrin daganat elsősorban a hasnyálmirigyben, hypophysis-adenoma, mellékvesekéreg-adenoma
Lynch-szindróma	MHL1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM	vastagbél, endometrium, mellékvesekéreg-carcinoma
Carney-komplex	PRKAR1A, PRKACA, PRKACB	bőr- és nyálkahártya-pigmentáció, myxoma, hypophysis, pajzsmirigy, petefészek, here, primer pigmentált noduláris mellékvesekéreg hyperplasia

Ezen mutációk közül többet sikerült sporadikus mellékvesekéreg-rákban is azonosítani.

A Li-Fraumeni szindrómában mutálódott TP53 gén az egyik leggyakrabban érintett rákos megbetegedésekben, terméke, a p53 fehérje pedig az egyik legfontosabb tumorszuppresszor a szervezetben. Mutációját a sporadikus mellékvesekéreg-rákok 25-30%-ában azonosították, valamint az érintett esetek rövidebb túlélését is leírták [20].

A Beckwith-Wiedemann-szindróma kialakulásában szerepet játszó gének eltérései szintén nagy százalékban kimutathatóak mellékvesekéreg-rákban. Az IGF-2, mint növekedési faktor szabályozza a sejtnövekedést, halálát, valamint receptorán keresztül kettő, karcinogenezisben jelentős jelátviteli útvonalat (PI3K/Akt/mTOR és Raf/MEK/MAPK) is aktivál [21]. Kifejeződésének megnövekedése a mellékvesekéreg-rák egyik legalapvetőbb jellemzője [17]. Ezentúl több tanulmány megfigyelte a sejtciklus szabályozásában érintett CDKN1C, illetve egy hosszú nem kódoló RNS, a H19 csökkent kifejeződését, kromoszomális régiójukban a heterozigótaság elvesztését [18].

A familiaris adenomatosus polyposis háttérében az APC gén megváltozása áll, mely által kódolt fehérje kulcsszereplője a Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonalnak [1. Ábra]. Ugyan az APC gén mutációját nem találták meg mellékvesekéreg-rákban, de az általa befolyásolt Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonal fontos szerepet tölt be az ACC kialakulásában [18].



1. Ábra: A Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonal: Wnt hiányában a β -katenin foszforilálódik és lebomlik. A Wnt bekötődésekor a β -katenin defoszforilálódik, szabaddá válik fehérje komplexétől. Ennek eredményeként mennyisége megnő a citoplazmán belül, a sejtmagba bejutva pedig specifikus gének transzkripcióját indukálja

A MEN1-szindrómát okozó MEN1 gén mutációját 7%-ban [22], míg kromoszómaeltérését az esetek 90%-ban [17] írták le rosszindulatú mellékvesekéreg-carcinómában.

A Carney-komplexben és Lynch-szindrómában érintett gének mutációit ugyan mellékvesekéreg-rákban nem azonosították, de például a PRKACA és PRKAR1A gén aktiváló elváltozásait Cushing-szindrómát okozó jóindulatú adenomákban több vizsgálat is jelentős fontosságúnak találta [20, 23].

II.1.2.2. Modern kutatási módszerekkel megismert patogenetikai tényezők

Egy évtizeddel ezelőtt az öröklődő daganatszindrómákban megismert genetikai eltéréseken kívül csupán néhány jelátviteli útvonalról volt ismert, hogy érintett lehet a sporadikus mellékvesekéreg-daganatok patomechanizmusában. Ilyen jelátviteli útvonal például az előbbieken már említett Wnt/ β -catenin útvonal, melyet sikerült azonosítani az ACC kialakulásának hátterében [20]. Az új módszerek elterjedésével teljesen új útvonalak és

genetikai eltérések váltak ismertté, melyek segítségével a daganat diagnosztizálása, kezelése is hatékonyabbá válhat.

II.1.2.2.1. Kromoszómavizsgálatok

A kromoszómák, és azok régióinak számbeli változásai megváltoztatják a sejt genetikai összességét, így befolyásolva annak működését. Általánosságban megállapítható, hogy a rosszindulatú daganatokra kromoszómális szinten nagy instabilitás jellemző. Ezen eltérések vizsgálatára a legmegfelelőbb vizsgálati módszer a komparatív genom hibridizációs technika (CGH), melynek alkalmazásával számos gyakori kromoszómaeltérést sikerült azonosítani mellékvesekéreg-rákban is [24, 25].

Több tanulmány közölte az 1-es, 2-es, 4-es, 5-ös, 11-es, 12-es, 17-es, 19-es, 22-es kromoszómák különböző régióin belüli allélok elvesztését, illetve megsokszorozódását [22, 24–26]. Ezek közül kiemelendő Barreau és mtsainak munkája, akik olyan mintázatot határoztak meg, aminek a segítségével a mellékvesekéreg-daganatokat három nagy csoportba tudták osztani: az első csoportot a jóindulatú daganatok, a másodikat a jó prognózisú, a harmadikat pedig a rossz prognózisú mellékvesekéreg-rákos esetek adták [27].

A tanulmányok alapján összességében két dolog vonható le következtetésképpen:

- a) a kromoszóma mutációk helye és száma rendkívül eltérő lehet, viszont minél nagyobb számban fordulnak elő, a tumor annál nagyobb méretű, agresszívabb viselkedésű és rosszabb túléléssel jellemezhető,
- b) a kromoszómaeltérések szoros összefüggésben vannak a mellékvesekéreg-rákra jellemző genetikai eltérésekkel, például a MEN1 gén a 11-es, míg a TP53 génje a 17-es kromoszómán található.

II.1.2.2.2. Teljes exom szekvenálás

A mellékvesekéreg-rák kialakulásában szerepet játszó főbb, ún. driver génekről teljes exom szekvenálással pontosabb és megbízhatóbb képet sikerült kapnunk [22, 28, 29]. Ezen

vizsgálatok több, eddig a mellékvesekéreg-rák patogenezisében ismeretlen szereplőt azonosítottak [2. Táblázat].

A leggyakrabban, az esetek több mint 20 %-ában előforduló mutáció a *ZNRF3* gént érintette, melynek inaktíváló mutációi a már korábban leírt Wnt/ β -katenin jelátvitel aktiválását eredményezik. Ehhez a jelátviteli útvonalhoz kapcsolhatóak még a *CTNNB1* aktiváló mutációi is, melyeket az esetek 15 %-ában írtak le. Szintén ilyen gyakorisággal azonosították a sejtciklus szabályozásában alapvető, és számos egyéb rákos megbetegedésben érintett *TP53* mutációit is. Ezen génváltozásokon túl több, szintén a sejt normális proliferációjáért felelős gén, mint például a tumorszuppresszor *CDKN2A* és *RBI*, az onkogén hatású *MDM2*, *CDK4*, a kromatin remodellingben szerepet vállaló *MEN1*, *DAXX*, *ATRX*, valamint a kromoszóma szerkezetének megtartásában közre játszó *TERT* és *TERF2* mutációit is sikerült meghatározni [22, 23].

2. Táblázat: Teljesgenom-szekvenálással megismert ACC patomechanizmusában jelentős szerepet betöltő, úgy nevezett „driver gének”

Gének	Befolyásolt útvonalak
<i>ZNRF3</i> <i>CTNNB1</i>	Wnt/β-katenin
<i>TP53</i> <i>CDKN2A</i> <i>RBI</i> <i>MDM2</i> <i>CDK4</i>	Sejtciklus
<i>MEN1</i> <i>DAXX</i> <i>ATRX</i>	Kromatin remodelling
<i>TERT</i> <i>TERF2</i>	Kromoszóma szerkezetének megtartása

II.1.2.2.3. Génexpressziós vizsgálatok

A gének átíródásában, más néven génexpresszióban lévő különbséget a génekről átíródó hírvivő RNS-ek (mRNS) nagy áteresztő képességű profilozásával lehet azonosítani. Ilyen vizsgálatot több munkacsoport is végzett a mellékvesekéreg-daganatok kialakulásában résztvevő genetikai eltérések, megváltozott jelátviteli útvonalak azonosítása, a daganat dignitásának megbízhatóbb diagnosztizálása érdekében [30–38].

Tanulmányaikkal megerősítették a korábban mellékvesekéreg-rákban leírt patogenetikai változásokat, az *IGF2* jelentősen fokozott kifejeződését, valamint a *TP53* és Wnt/ β -katenin útvonal szerepét.

Eredményeik alapján megállapítható, hogy a génexpressziós mintázat alapján egyértelműen elkülöníthető a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganat. Két kutatócsoportnak nagyobb elemszámú vizsgálataik során három csoportot sikerült elkülöníteni, mely csoportokba tartozó esetek klinikai képe és prognózisa között szignifikáns különbség volt [30, 32]. De Reynies és mtsai ezeket C1A, C1B és C2 csoportnak nevezte el. A C1A csoportba a rosszindulatú és rossz prognózisú, a C1B csoportba a rosszindulatú, de C1A csoportnál jobb prognózisú, míg a C2 csoportba a jóindulatú daganatok tartoztak [30]. A C1A, tehát rossz prognózisú ACC-k csoportját később a daganatban előforduló génmutációk alapján további három alcsoportra bontották: az elsőre a TP53 inaktivációja, a másodikra a β -katenin aktivációja, a harmadik csoportra pedig se a TP53 inaktivációja, se a β -katenin aktivációja nem volt jellemző [39].

II.1.2.2.4. DNS metilációs vizsgálatok

Mellékvesekéreg-rák patomechanizmusával kapcsolatban végzett genommetilációt, az úgy nevezett metilomot elemző tanulmányok is fontos megállapításokat tettek [22, 40–42].

Ezen eredmények alapján következtetésként levonható, hogy a mellékvesekéreg-rák genomja általánosan hipometilált állapotban van, ezzel kromoszomális instabilitást, a genomikus imprinting zavarait okozva. Ezzel ellentétben jellemzően a tumorszuppresszorok promoter régióiban található CpG-szigetek hipermetiláltak, azok csökkent kifejeződését eredményezve.

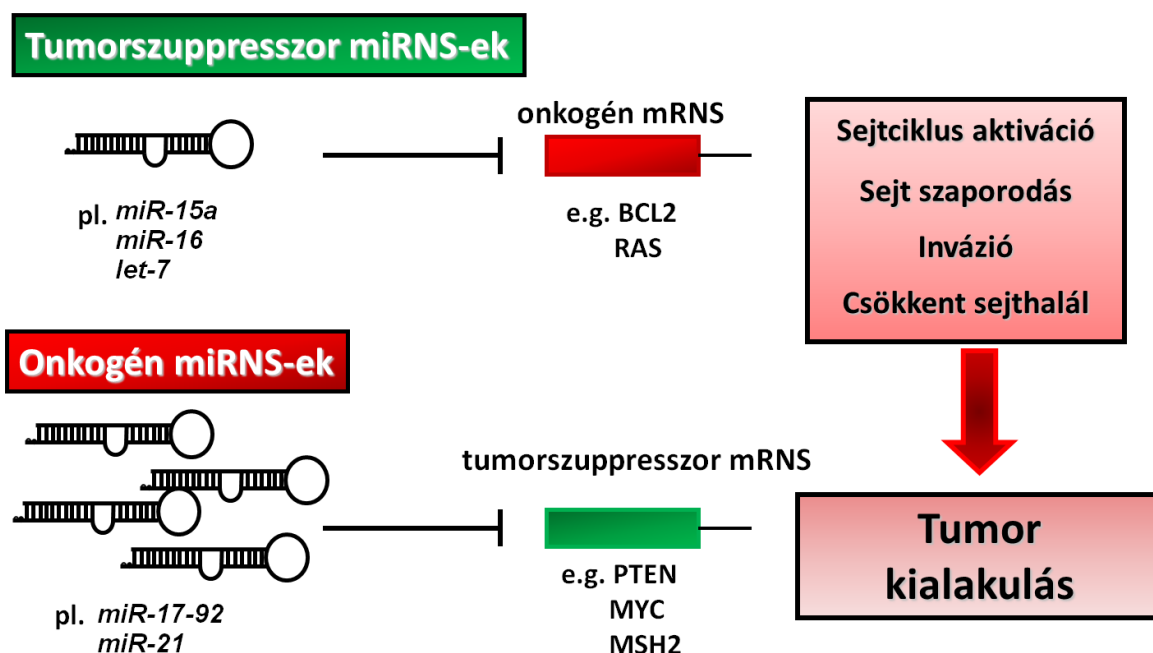
Barreau munkacsoportja metiláltsági szint alapján három csoportot különített el a rosszindulatú daganatok között: az első csoportot adenomákhoz képest kis mértékben, de jobban metilált ACC-k, a második csoportot adenomákhoz, valamint az első csoportba tartozó carcinomákhoz képest is hipermetilált, míg a harmadik csoportot a leginkább metilált ACC-k alkották. Ezek alapján a mellékvesekéreg-daganatokat egy korábban közölt csoportosítási rendszer alapján adenoma, non-CIMP, CIMP-low, és CIMP-high carcinoma csoportokra osztotta, melyek prognózisa között is különbséget fedezett fel: minél metiláltabb a tumor, annál rövidebb a beteg túlélése [40, 41].

Legendre és mtsai a tumorok hipermetiláltsága, valamint a transzkriptom analízisekkel korábban leírt fontos patogenetikai útvonalak kapcsolatát vizsgálva megállapította a korrelációt a TP53, WNT/ β -katenin jelátvitelben szereplő gének és azok metiláltsági szintje között, mint egy újabb összefüggés az ACC komplex és heterogén patomechanizmusában [42].

II.1.2.2.5. MikroRNS vizsgálatok

A mikroRNS-ek kis nem kódoló RNS molekulák, melyek kulcsszereplői a génexpresszió poszttranszkripció szabályozásának. Számos fiziológiai folyamat irányításában vesznek részt, mint pl. szöveti differenciáció és fejlődés, immunrendszer irányítása, szabályozása. Központi szerepet töltenek be olyan alapvető sejtbiológiai folyamatokban, mint például a sejtszaporodás, -differenciáció és apoptózis. Ezeket a fontos reguláló funkciójukat ismerve nem meglepő, hogy a tumorok kialakulásában is érintettek, megváltozott kifejeződésüket számos daganatban leírták [43].

Hatásukat tekintve azokat a mikroRNS-eket, melyek serkentik a sejtproliferációt, angiogenezist, illetve csökkentik a tumorszuppresszor mRNS-ek szintjét onkogén mikroRNS-eknek (oncomiR), míg azokat, melyek előremozdítják az apoptózis folyamatát, ill. az azt elősegítő gének, tumorszuppresszorok expresszióját, valamint csökkentik az onkogén aktivitást, tumorszuppresszor mikroRNS-eknek nevezzük [2. Ábra]. Általánosságban megfigyelhető, hogy az onkogén mikroRNS-ek kifejeződése fokozott, míg a tumorszuppresszor mikroRNS-eké csökkent rákos szövetekben [44].



2. Ábra: Tumorszuppresszor és onkogén miRNS-ek tumorigenezisben betöltött szerepe.

Ezenkívül fontos jellemzőjük a szövet- és tumorspecifikus hatás, a rendkívül stabil kifejeződés, melyeknek köszönhetően felhasználhatóak lehetnek a tumorok diagnosztizálására, prognózisuk megállapítására, a tumorelles kezelés hatásosságának monitorozására is (lásd később) [34].

A mellékvesekéregre specifikus mikroRNS-ek expresszióját több tanulmány [34, 45–56] is elemezte, melyek normális, jóindulatú és rosszindulatú mellékvesekéreg-tumorokat hasonlítottak össze mikroRNS-kifejeződés szempontjából. Ezek közül kiemelném a munkacsoportunk által közölt eredményeket.

Munkacsoportunk korábbi vizsgálatait során három felül- (*hsa-miR-503*, *hsa-miR-210* és *hsa-miR-184*), valamint három alulexpresszált (*hsa-miR-511*, *hsa-miR-214*, *hsa-miR-375*) mikroRNS-t validáltunk, valamint útvonalelemzés alapján a sejtciklus G2/M ellenőrzőpont károsodását azonosítottuk, mint fő érintett útvonalat mellékvesekéreg-rákban. Ezen kívül a magas *hsa-miR-503*, és alacsony *hsa-miR-511* kifejeződést, mint lehetséges diagnosztikus markert írtuk le mellékvesekéreg-rákban: ROC analízis segítségével a két mikroRNS kifejeződésének különbségével ($\Delta\text{CT}_{hsa-miR-511} - \Delta\text{CT}_{hsa-miR-}$

503) a ACC-t magas szenzitivitással és specificitással lehetett elkülöníteni [34]. Más munkacsoportok tanulmányai alapján a magas szöveti *hsa-miR-483-5p* és alacsony *hsa-miR-195* kifejeződés jellemző a rosszabb prognózisú, hamarabb kiújuló mellékvesekéreg-rákos esetekre, valamint egyedül a *hsa-miR-483-5p* is elégséges lehet a jó és rosszindulatú mellékvesekéreg-tumorerkülönítéséhez [45, 47, 48].

Assié és mtsai szekvenálással a mellékvesekéreg-tumorer teljes mikroRNS kifejeződését elemezte, és a kapott mikroRNS profil alapján a mellékvesekéreg-rákot a génexpressziós és metilációs eredményekhez hasonlóan három csoportra osztotta: Mi1, Mi2, Mi3 [22]. A Mi1-es csoportba tartozó tumorokra a miR-506-514-es klaszterbe tartozó miRNS-ek fokozott, míg a DLK1-MEG3 klaszterbe tartozó mikroRNS-ek csökkent kifejeződése jellemző. Fontos megjegyezni, hogy a DLK1-MEG3 klaszter mikroRNS-ei endokrin tumorokban jelentős szerepet tölthetnek be, megváltozott kifejeződésüket agyalapi mirigy, mellékpajzsmirigy, endokrin hasnyálmirigy tumorok esetén is leírták (Nagy Z, Igaz P közlésre benyújtva).

II.1.2.3. Munkacsoportunk funkcionális genomikai vizsgálatainak eredményei

Munkacsoportunk az elmúlt évek folyamán több megközelítésben is vizsgálta a mellékvesekéreg-rákban lezajló alapvető biológiai folyamatokat. A patogenezis jobb megértésével új, mind diagnosztikában, mind terápiában felhasználható eredményeinket, következtetéseinket több közleményben is publikáltuk.

A mellékvesekéreg-tumorer szöveti mikroRNS profilozásán alapuló vizsgálatunkat már dolgozatomban korábbi részében említettem (II.1.2.2.5.).

Bioinformatikai módszerekkel 2010-ben a világon elsőként integratív funkcionális genomikai metaanalízist hajtottunk végre az addig leírt komparatív genom hibridizációs és transzkriptom elemzések adataival [4].

A létező adatok felhasználásával végzett útvonalelemzés során három útvonalat, a sejtciklus, az antigénprezentáció és komplementrendszer érintő jelátvitel károsodását, valamint a RXR receptoron keresztüli csökkent retinsav-jelátvitelt sikerült azonosítanunk, mint fontos patogenetikai utakat mellékvesekéreg-rákban:

a) A sejtciklus jelátviteli útvonalainak károsodása

A sejtciklus károsodása általános elváltozás szinte minden daganatos betegségben. Metaanalízisünk alapján több általunk vizsgált közleményben leírták a G1/S és G2/M fázisban kulcsfontosságú gének megváltozott kifejeződését. A G1/S fázisban szereplő CCNE1 és CCNE2 például 4 vizsgált tanulmányban is megnövekedett expressziót mutatott. Ezzel párhuzamosan kromoszómarégiójuk (19q12) számbeli növekedését is leírták. [35].

b) Az antigénprezentáció és a komplementrendszer jelátviteli útvonalai

Az antigénprezentációban szervesen résztvevő MHCII molekulák, valamint a komplementrendszer több elemének csökkent kifejeződését több általunk vizsgált tanulmány közölte. Sajnos mivel további adatok nem állnak rendelkezésre ezen útvonalak mellékvesekéregben betöltött élettani és patológiai szerepéről, ezért ezen útvonalak tényleges jelentőségét jelenleg nem tudjuk megítélni.

c) A retinsav jelátviteli útvonalai

A retinsav jelátviteli alapvető fontosságú két magi receptora, a RAR (retinoic acid receptor) és az RXR (retinoid X receptor). Ezen receptorok specifikus ligandjai a retinoidok, melyek közül a RAR receptorhoz minden all-transz retinsav és 9-cisz retinsav, az RXR-hez viszont csak a 9-cisz retinsav kötődik. Ezen receptorok magi receptorok lévén a ligand kötése után egymással homo-, vagy más családba tartozó magi receptorral heterodimert képezve fejtik ki hatásukat [5].

A retinoidok jelentős szerepet játszanak mind az alapvető sejtbiológiai folyamatokban, mint például a sejt-differenciációban, -szaporodásban és -halálban, mind az egész organizmus fejlődésében, szabályozásában. Alapvető szerepüknek köszönhetően számos daganat patogenezisében is szerepet játszanak, valamint különböző daganatok kezelésére, megelőzésére is használhatóak [57, 58].

A munkánkban vizsgált tanulmányok között a retinsavsztézist meghatározó enzimek (ALDH1A1, ALDH1A3), valamint az útvonalban szereplő receptorok

(RXRA, RXRB) szintjén is csökkent kifejeződést találtunk, ami csökkent retinsavtermelést, illetve hatást eredményez mellékvesekéreg-rákban. Ezen túl az RXR más magi receptor családokkal, köztük a liver x receptorokkal (LXR) is heterodimert képez. A két receptor kapcsolódásával kialakuló RXR/LXR heterodimer a mellékvesében meghatározó szerepet tölt be a koleszterinmetabolizmusban és befolyásolja a szteroidhormonok bioszintézisét. Ezen LXR receptor család egyik tagjának, az LXRA-nak is szignifikánsan csökkent kifejeződését azonosítottuk az általunk vizsgált tanulmányokban.

Ezen eredményeink alapján a mellékvesekéreg-rákra csökkent retinsavtermelés, illetve RXR receptoron keresztüli jelátvitel jellemző. E megfigyelések adták az ötletet ahhoz, hogy az RXR specifikus ligandjának, a 9-cisz retinsavnak a hatásait elemezzük *in vitro* humán NCI-H295R mellékvesekéreg-carcinoma sejtvonalon [59].

Az elvégzett vizsgálatunk eredményei azt mutatták, hogy a 9-cisz retinsav a kezelési idő és dózis függvényében csökkentette a sejtek életképességét, a szteroidhormon szekrécióját, valamint jelentősen befolyásolta a gének kifejeződését is. Ezen kifejeződésbeli elváltozások útvonalelemzés alapján 4 fő irányba voltak besorolhatóak: a szteroidhormon-metabolizmus, a sejtciklus szabályozása, az immunfolyamatok, illetve a retinsav-jelátvitel irányába [59].

Ezután egy kis elemszámú, összességében 6 thymushiányos (nude egér) egeret tartalmazó *in vivo* pilóta kísérletben a 9-cisz retinsav tumorelles hatását vizsgáltuk, mely során a 9-cisz retinsav kezelés ígéretesen csökkentette a tumorok térfogatát, valamint a szövettani diagnosztikában fontos Ki-67 proliferációs indexet [59].

Eredményeink alapján elmondható, hogy a retinsav-jelátvitel mellékvesekéreg-rák patogenezisében betöltött jelentőségét munkacsoportunk írta le először. Ezen túl a jelátviteli útvonalat célzó 9-cisz retinsav lehetséges citotoxikus és tumorelles hatását is sikerült azonosítanunk *in vitro* NCI-H295R mellékvesekéreg-carcinoma sejtvonalon, valamint egy kis elemszámú *in vivo* xenograft modellen.

II.1.3. Diagnózis

II.1.3.1. Jelentkezési formák, klinikai kép

A mellékvesekéreg-carcinoma felismerése klinikailag három formában történhet.

II.1.3.1.1. Hormontúltermelés jelei

Az első és leggyakoribb forma, mely az esetek 40-60%-át teszi ki, hogy az ACC hormontúltermeléssel kapcsolatos panasszal, tünettel jelentkezik. Az esetek 50-80%-ában a daganat kortizolt termel, így a hiperkortizolizmus, Cushing-szindróma klinikai jeleit tapasztalhatjuk. Az aldosterontermelés rendkívül ritka ACC-k esetében, leginkább a magas szteroidhormonprekursor- és kortizolkoncentrációt elérő daganatokban tapasztaltak aldosteronszerű hatást [6, 8, 9, 60–65].

II.1.3.1.2. Hasi, lokális panaszok

A mellékvesekéreg-rák az esetek kb. 30%-ában nem specifikus tünetekkel jelentkezik. A tumor növekedésének köszönhetően a betegek deréktáji, háti, hasi fájdalomra, teltségérzetre, hányingerre panaszkodnak [66].

II.1.3.1.3. Véletlenszerű felfedezés - Incidentaloma

Az ACC-k 10-20%-a egyéb okból végzett vizsgálat, mint például mellkas CT, vagy rutin hasi UH során véletlenszerűen kerül felfedezésre, tulajdonképpen melléklelet. Ezen esetek az ún. incidentalomák (nem mellékvese-betegség gyanúja miatt végzett képalkotó vizsgálat során felfedezett mellékvese-daganat) mindössze 1,2-2%-át adják [8, 9].

II.1.3.2. Hormonális kivizsgálás

A hormonális kivizsgálás több szempontból is fontos. Az első és legfontosabb, hogy a tumor hormonaktív, illetve nem aktív tulajdonságát megállapítsuk. Ha a tumor hormontermelő, akkor az esetleges műtéti a túltermelt hormon által okozott tünetek enyhítése és kezelése, valamint a megfelelő pre- és postoperatív betegellátás rendkívül fontos, pl. egy kortizoltermelő tumor eltávolítása után posztoperatív kortizolszubsztitúció esszenciális a beteg túlélése érdekében.

A glükokortikoid-túltermelés a vér bazális ACTH, kortizol, éjszakai kortizol, 24 óras gyűjtött vizelet kortizolkoncentráció, valamint dexamethason szuppressziós teszt, az androgén-túltermelés a DHEA-S-, az androszténdion-, a tesztoszteronszint, míg esetleges mineralokortikoid-túltermelés az aldosteron-renin kvóciens számolásával határozható meg.

II.1.3.3. Képképző módszerek

A modern képképző eljárásokkal pontos információkat kaphatunk az mellékvesekéreg-rák felépítéséről, morfológiájáról. Segítségükkel meghatározható több olyan paraméter, melyek különböznek a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok között, így lehetővé téve azok biztosabb felismerését.

Első fontos különbség, ami leginkább CT-vel határozható meg pontosan, a zsírtartalom: míg adenómára magas, addig carcinómára alacsony lipidarány jellemző. Másik objektíven és viszonylag pontosan megállapítható tulajdonság az átmérő, míg 6 cm-nél nagyobb daganatok esetén a rosszindulatúság valószínűsége több mint 25%, addig 4 cm alatt ennek esélye 1 %-nál kevesebb. Ezen a két sajátságon túl az ACC képére, mint a malignus daganatokra általában, inhomogén szerkezet, szabálytalan határok, lokális szövetekbe, erekbe, gyakran vena cava inferiorba terjedés, kalcifikáció, bevézés, centrális nekrozis jellemző [9].

CT-vizsgálat esetén, kontrasztanyag nélküli felvételen, a denzitás (Hounsfield Unit=HU) mérése adja a legtöbb információt. A zsírban gazdag jóindulatú daganatokra homogén szerkezet, és így alacsony, 10 HU alatti érték jellemző. Abban az esetben viszont, ha a denzitás 10 HU felett van, a malignitás nem kizárható (ez a határ 71%-os szenzitivitással és 98%-os specifitással különíti el a jó- és rosszindulatú eltéréseket) [67]. Kontrasztanyag adásakor az inhomogenitás, bevézések, nekrozisok szembevetőbbé válnak a felvételen, így megkönnyítve a diagnózist. Ezt kiegészíthetjük ún. késleltetett kontrasztanyag-kimosódási vizsgálattal, amikor a kontrasztanyag adása után 1, 10, 15 perccel készített felvételeket hasonlítjuk össze. A rosszindulatúság egyik jelzője a fokozott kontraszthalmozás és a kontrasztanyag lassabb leadása: abban az esetben, ha a

kontrasztanyag kimosódása 50% alatti, valamint a 10-15. percben készült felvételeken a tumor denzitása 35 HU felett van, a daganat rosszindulatúsága erősen valószínű [66, 68].

MRI-felvételen a mellékvesekéreg-daganatok hasonló képet mutatnak, mint CT-képalkotással. A mellékvesekéreg-rák általában T1-felvételhez képest, ahol intenzitása a májéval nagyjából megegyező, T2-ben intenzitásbeli növekedést mutat. Előnye a CT-vizsgálathoz képest az, hogy a tumor erekbe történő betörése, inváziója jobban megállapítható, valamint nem elhanyagolható az sem, hogy a vizsgálat nem jár sugárterheléssel [66, 68].

A jó- és rosszindulatúság eldöntésében a ^{18}F FDG PET/CT vizsgálat nyújthat még kiegészítő információkat. A felvételeken az ACC a májnál intenzívebb FDG-felvételt mutat, így a májhoz viszonyított standardizált felvételi érték (standardized uptake value – SUV), valamint a CT-n is megfigyelhető malignitásra utaló jelek, mint méret, szabálytalan határok, stb. segítségével tudjuk meghozni a diagnózist. A képalkotó módszer nagy segítség a mellékvesekéreg-rák stádiumának meghatározásában is, hiszen jól használható áttétek és helyi recidívák felismerésére [69].

Az MR-spektroszkópia és ^{11}C -MTO (11-es szénizotóppal jelölt metomidát) PET/CT létjogosultsága az ACC és mellékvese-tumorer diagnosztikájában vizsgálatok tárgyát képezi [68, 70].

II.1.3.4. Szövettan, immunhisztokémia

A patológiai vizsgálat alapvető célja, hogy megállapítsa az operáció során eltávolított tumor eredetét, jó- vagy rosszindulatúságát. Ez a mellékvesekéreg-daganatok esetében még gyakorlott patológus számára is nagy kihívást jelent.

A jó- és rosszindulatúság eldöntése napjainkban még mindig a Weiss által 1984-ben leírt, majd továbbfejlesztett Weiss-score alapján történik [71, 72]. A vizsgálat során a következő kilenc szövettani kritériumot vizsgálják: 1. A sejtmag megjelenése Fuhrman kritériumai [73] alapján a 3-4-es osztályba tartozik, 2. A mitotikus ráta nagyobb, mint 5/50 HPF (HPF = látott terület mikroszkóp legnagyobb közelítésével, high power field), 3. A tiszta sejtek százalékos aránya kisebb, mint 25% 4. Atipikus mitózisok, 5. Diffúz szerkezet,

6. Mikroszkopikus nekrozis, 7. Vénába történő invázió, 8. Szinuszos invázió, 9. Kapszuláris invázió figyelhető meg. A kilenc kritériumnak megfelelően minden megfigyelt eltérés egy pontot ér. Abban az esetben, ha a vizsgálat végén az összpontszám 3, vagy több, akkor a rosszindulatúság, a mellékvesekéreg-rák diagnózisa kimondható. Ha ez az érték 0-2 közötti, az elváltozást jóindulatúnak lehet nyilvánítani, néhány eset kivételével. Például egy 2 pontos daganat esetében, amelyben a mitotikus ráta kiugró, a jóindulatúság korántsem biztos. Ezentúl több tanulmány is bizonyította, hogy az eredmény nagyban szubjektív, függ a vizsgáló személy képzettségétől, tapasztalatától, a különböző vizsgálok, sőt még ugyanazon vizsgálok különböző időpontokban végzett vizsgálati eredményei között is nagyok lehetnek a különbségek [74, 75].

A Weiss-score mellett az immunhisztokémiai Ki-67 festésből számolt Ki-67 proliferációs index nyújt segítséget a leletezésben. Ez mellékvesekéreg-rákban jellemzően magasabb, mint 4%. Ezentúl értéke fontos prognosztikai marker, mind a kiújulás, mind az átlagos túlélés szempontjából [74, 76, 77].

II.1.4. Stádiumbeosztás - Progresszió

A mellékvesekéreg-rákra különösen jellemző, hogy progresszióját, a betegek kilátásait meghatározza a tumor felfedezéskori stádiuma, előrehaladottsága. Az ACC-k többsége a felfedezés pillanatában már relatíve nagyméretű, mindösszesen 3%-uk kisebb, mint 4 cm (átlagos átmérő: 10-13 cm) [9].

Beosztásukat először 2003-ban az UICC határozta meg a klasszikus 4 fokozatú TNM rendszernek megfelelően. Az ACC esetében viszont az így 2-es és 3-as stádiumba kerülő betegek túlélése között nem volt szignifikáns különbség, ezért egy új rendszer megalkotása vált szükségessé. 2009-ben az ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors) által meghatározott beosztás alapján: 1-es stádiumba sorolandóak az 5 cm-nél kisebb (14%), 2-es stádiumba az 5 cm-nél nagyobb (45%), 3-as stádiumba a lokálisan elterjedt pl. a paraadrenális zsírszövetbe, szomszédos szervekbe, vagy intravascularisan vena cava inferiorba betörő (27%), 4-es stádiumba pedig a távoli áttétet

adó mellékvesekéreg-tumороk (24%) [3. Táblázat]. Az áttétek az esetek többségében tüdőben, csontban, májban jelennek meg elsőként. Az 5 éves túlélés a jelenleg is használatos rendszer szerint: I. stádiumban 95%, II. stádiumban 61%, III. stádiumban 50%, IV. stádiumban 13% [9, 78, 79].

A legtöbb ACC-t jelenleg csak előrehaladott állapotban sikerül diagnosztizálni, de az elvégzett képalkotó vizsgálatok nagyobb számának, valamint a jövőben megjelenő új biomarkereknek köszönhetően ez remélhetően változni fog.

3. Táblázat: A mellékvesekéreg-rák beosztása az UICC és ENSAT által meghatározott kritériumok alapján. T1: tumorátmérő ≤ 5 cm, T2: tumorátmérő > 5 cm, T3: tumorinvázió szomszédos szövetekbe, T4: tumorinvázió távoli szervekbe, N0: nincs nyirokcsomóáttét, N1: van nyirokcsomóáttét, M0: nincs távoli áttét, M1: van távoli áttét

	UICC	ENSAT
1-es stádium	T1, N0, M0	T1, N0, M0
2-es stádium	T2, N0, M0	T2, N0, M0
3-as stádium	T1-2, N1, M0	T1-2, N1, M0
	T3, N0, M0	T3-4, N0, M0
4-es stádium	T1-4, N0-1, M1	T1-4, N0-1, M1
	T3-4, N1, M0,	
	T4, N0, M0	

II.1.5. Terápia

Jelenleg az elsődleges és máig egyetlen kuratív módszer az ACC gyógyítására a tumor sebészeti eltávolítása. Rendkívül fontos ezért a pontos, alapos preoperatív tervezés és az operatív beavatkozás magas fokú kivitelezése. Prognosztikai szempontból rendkívül fontos, hogy a tumor rezekciója teljes, komplett (R0) legyen. Amennyiben a tumorból mikroszkópikus (R1) vagy makroszkópikus (Rx) szövetdarab marad a műtéti területen, tehát az eltávolítás inkomplett, az ACC prognózisa, és így a beteg kilátásai nagyban

romlanak. Éppen ezért az ideális az lenne, ha ezeket az operációkat kiemelt, ACC eltávolítást legalább évente 10-20-szor végző centrumokban mellékvesekéreg-rák eltávolításában gyakorlott sebész végezné [7].

A sebészi kezelést adjuváns terápia követi, melynek célja, hogy csökkentse a kiújulás esélyét. Azon esetekben, ahol a tumort nem lehet eltávolítani, vagy áttétet adott, mindig külön kell mérlegelni az esetleges palliatív terápia lehetőségét, mellyel a beteg életminőségét, kilátásait javítani lehet.

II.1.5.1. Eltávolítható, lokális tumorok

II.1.5.1.1. Sebészet

A legfontosabb prognosztikai tényező tehát, hogy a tumor sebészi eltávolítása hogyan sikerül. Az elsődleges cél a komplett R0 rezekció, ezért a műtétet alaposan meg kell tervezni a tumor adott stádiuma alapján. Napjainkban nagy kérdés, hogy a műtét laparoszópos (LA) vagy nyitott (OA) műtéti technikával történjen-e. Konszenzus és elfogadott ajánlás nem létezik, de több tanulmány alapján kijelenthető, hogy a legfontosabb tényező itt is a tumor előrehaladottsága, tehát a mérete, lokális kiterjedése: 1-es és 2-es stádiumú betegeknél nincs különbség a különböző technikák között, viszont előrehaladottabb állapotokban laparoszópos megközelítéssel nagyobb százalékban tapasztalható kiújulás, akár még a peritoneumon is (carcinomatosis peritonei). A laparoszópia előnyei ugyanakkor nem elhanyagolhatóak: gyorsabb gyógyulás, esztétikusabb hegek, kisebb stressz a beteg részéről, valamint pénzügyi szempontból a rövidebb kórházi tartózkodással elérhető költségmegtakarítás [80].

II.1.5.1.2. Adjuváns terápia

Adjuváns terápia a tumor eltávolítása után annak érdekében kezdünk, hogy minimalizáljuk a tumor lokális kiújulásának esélyét. Sajnos ez mellékvesekéreg-carcinoma esetében a kezelés ellenére is magas, 19-34% [8]. A terápia mitotánkezelésből, valamint a tumorágy esetleges besugárzásából áll.

A mitotán (o p'-DDD) egy DDT származék, az egyetlen mellékvesekéreg-specifikus szer az ACC terápiájában. Már több mint 60 éve alkalmazzuk anélkül, hogy pontos hatásmechanizmusával tisztában lennénk. Elsődleges célpontjának a mitokondriumot tartják, ahol elsősorban a szteroidogenezis enzimeit, a STAR-t, CYP11A1-t, CYP11B1-t, CYP11B2-t, 11 β -HSD-t befolyásolva gátolja a szteroidtermelést. Ezentúl akadályozza a légzési láncot, membránkárosodást, szabadgyök-felszabadulást okoz, így kaszpáz-3 és kaszpáz-7 felszabadításával aktiválja a programozott sejthalált. Fokozza a több gyógyszer kiválasztásában szereplő CYP3A4 aktivitását, így egyes gyógyszerek fokozott lebontásán túl (pl. makrolid antibiotikumok) ezen az úton is befolyásolja a lipid és szteroidhormon homeosztázist, magyarázva a mitotánnal kezelt betegek nagyobb hidrokortizon igényét. Leírták még endoplazmás retikulum stresszt okozó, toxikus lipidek felszaporodását elősegítő hatását is, ami fokozza az elért citotoxikus hatást. Természetesen ezen folyamatok nem magyarázzák a mitotán összes hatását, más, ismeretlen mechanizmusok is szerepet játszanak hatásprofiljának kialakításában [1, 81, 82].

A mitotán terápiás ablaka szűk, 14-20 mg/l-es vérszint mellett hatékony. Ennek eléréséhez a kezelést napi 2-3 g dózisban kell elkezdni, fokozatosan emelve 0,5-1g-mal egészen a maximális 6g/nap dóziséig. Sajnos ezt nem minden beteg tolerálja számos mellékhatása, mint pl. hányinger, hányás, hasmenés, szédülés, vertigo, memóriazavarok, ataxia, egyéb központi idegrendszeri zavarok miatt [81].

Az adjuváns terápia másik része, a tumorágy besugárzása, ami elsősorban csak inkomplett eltávolítás után ajánlott. Ennek ellenére vannak megfigyelések, miszerint a mitotánkezelés és a tumorágy besugárzása pozitív szinergista hatást fejt ki egymásra, így növelve a kiújulásig eltelt időt [81].

II.1.5.2. Kiterjedt, metasztatikus tumorok

II.1.5.2.1. Sebészet

Sebészeti beavatkozás még metasztatikus formában is szóba jöhet tumortömeg-csökkentő, úgynevezett debulking műtét lehetősége révén. Itt a tumor méretén, lokális elterjedtségén, hormontermelésén, áttétek számán és helyén kívül a beteg általános állapotát is figyelembe

kell venni. Csak abban az esetben érdemes ilyen műtéteket végrehajtani, ha a beteg hosszabb túlélésére, illetve jobb életminőség elérésére reális esély van. Egyéb esetben az operációtól el kell tekinteni, és a szisztémás tumorelleses terápiát mielőbb el kell kezdeni [8].

II.1.5.2.2. Szisztémás tumorelleses terápia

A szisztémás kezelés területén az egyetlen, mellékvesekéreg-specifikus kezelési mód az orálisan adott mitotán. Az elmúlt években számos vizsgálat zajlott különböző kemoterápiás szerek legoptimálisabb kombinációjának megtalálására, de áttörést a mai napig nem sikerült elérni.

Az eddigi legjobb eredményt elérő, és jelenleg irányadó FIRM-ACT tanulmányban a mitotán, etopozid, doxorubicin, ciszplatin együttesének alkalmazásával 5 hónapos átlagos progressziómentes túlélést és 14,8 hónapos átlagos túlélést regisztráltak [2].

Másodvonalbeli kezelésként említést érdemel még a gemcitabine és metronómikus 5-fluorouracil/capecitabine kombináció, de sajnos a kezeléssel elért eredmény (progressziómentes túlélés mediánja 5,3, átlagos túlélés mediánja 9,8 hónap) szerénynek mondható [83].

II.1.5.2.3. Célzott terápia

Az ACC patomechanizmusában szerepet kapó jelátviteli útvonalak és molekulák megismerésével számos új résztvevő vált ismertté, amelyek új terápiás szerek célpontjaivá váltak, válhatnak. Az elmúlt évtizedben a tumorelleses terápia egyik nagy áttörését a molekulárisan célzott biológiai terápiás szerek, köztük a tirozin-kináz inhibitorok jelentették. Ezen gyógyszerek jelentősen javították bizonyos tumoros betegségek lefolyását, de sajnos mellékvesekéreg-rák esetén nem váltották be a hozzájuk fűzött nagy reményeket [84–87].

Az EGFR, VEGF útvonal expressziója a malignus elváltozások többségében, így ACC-ben is fokozott. Ennek ellenére célzott terápiákkal, más tumorokkal ellentétben, nem értek el érdemi eredményeket [84, 88, 89].

Az IGF-1R fokozott kifejeződése is jellemző mellékvesekéreg-carcinomára, mely két főbb, a PI3K/Akt/mTOR és a RAS/MAPK jelátviteli útvonalra is serkentő hatással bír. Azon antitestekkel történő kezeléssel, melyek csak az IGF-1R-t célozták (cixutumumab, figitumumab), csekély eredményeket értek el [86]. A szereket viszont PI3K/Akt/mTOR inhibitorokkal kombinált formában adva terápia rezisztens ACC-s betegekben néhány esetben a tumor stabilizálódását, illetve méretének csökkenését tapasztalták [90]. A kezelésben egy új IGF-1R gátló vegyületet, a linsitinibet is kipróbálták, de az teljesen hatástalannak bizonyult [87].

Érintett fontos patomechanikai útvonal még a Wnt/ β -katenin jelátvitel, de egyelőre ACC kezelésében ezt az útvonalat célzó szerrel végzett vizsgálatot még nem közöltek az irodalomban.

II.1.5.2.4. Egyéb terápiás lehetőségek

Előrehaladott állapotokban palliációs célból, az életminőség javítása érdekében szóba jöhet az áttétek sugárterápiával, radiofrekvenciás ablációval, illetve kemoembolizációval történő kezelése, bár ezen módszerek hatékonysága erősen megkérdőjelezhető [10].

Összességében tehát megállapítható, hogy a mellékvesekéreg-rák egy ritka, de nagyon agresszív daganat. Legtöbbször előrehaladott állapotban kerül felfedezésre, amikor terápiás lehetőségeink már messze nem ideálisak. Kezelésében és prognózisában döntő jelentőségű a sebészi rezekció minél körültekintőbb és pontosabb kivitelezése, de még teljes eltávolítás esetén is nagy a kiújulás, vagy távoli áttét megjelenésének esélye. Gyógyszeres kezelése nem megoldott, ezért folyamatos kutatások zajlanak, hogy új, speciális, magasabb hatásfokú és előnyösebb mellékhatás-profilú szert/szereket lehessen bevetni a terápiában, így elérve egy kedvezőbb túlélést a páciensek körében.

II.2. Xenograft tumor modellek

A mellékvesekéreg-rák gyógyszeres kezelésében az egyetlen mellékvesekéreg-specifikus szer a számos mellékhatással bíró mitotán. Intenzív kutatások folynak új hatóanyagok

feltárására, melyeket *in vitro* sejtvonalakon tesztelés után *in vivo* állatmodelleken szükséges továbbvizsgálni, hatásait, mellékhatásait megfigyelni. Tekintettel arra, hogy nem érhető el olyan állatmodell, amelyben spontán kialakulású mellékvesekéreg-daganat előfordulna, az *in vivo* vizsgálatokhoz ún. xenograft modelleket használnak.

A xenograft elnevezés arra utal, hogy a daganatszövetet egy másik faj egyedébe oltjuk be. Ehhez immunhiányos állatmodell szükséges a kilökődés elkerülése céljából, melyet elsőként 1969-ben egerekben sikerült létrehozni [91]. Azóta szinte minden humán daganatból sikerült immunrendszer hiányos athymiás, ill. súlyos kombinált immunhiányos (SCID) egérben *in vivo* tumor modellt megvalósítani, melyek új, lehetséges gyógyszerek fejlesztésében szinte elengedhetetlenek, hiszen lehetővé teszik azok hatásának preklinikai vizsgálatát.

Természetesen ezek a preklinikai xenograft modellek nem tökéletesek, gyakran fordul elő, hogy a klinikai megfigyelések nem tükrözik a preklinikai vizsgálatokban tapasztalt sikereket [92].

II.2.1. Kivitelezés

II.2.1.1. Beültetés helye

A tumor xenograftba történő ültetésének helyétől függően kétféle modell lehetséges: Bőr alatti, subcutan beültetés, valamint a tumornak a természetes helyére történő, úgynevezett orthotopikus beültetése. Mindegyik megközelítésnek megvan a saját előnye. A bőr alá történő beültetés a tumornak egy nem fiziológiás környezetet ad, viszont megvalósítása egy viszonylag könnyen kivitelezhető módszerrel, a sejtek/szövet bőr alá injektálásával történik, míg az orthotopikus modellnél a sejt célszervbe juttatása gyakran bonyolult sebészeti eljárással valósítható meg. Ezenkívül a tumor megjelenése, növekedése is optimálisan, a bőrön keresztül követhető, akár egy egyszerű tolmérő segítségével. Az orthotopikus beültetés a bőr alatti nem fiziológiás környezettel szemben az eredeti miliójét nyújtja a beültetett sejteknek/szövetnek. Ezáltal a tumor mikrokönyezete sokkal jobban megfelel az optimális kötőszöveti, érellátási, stromális viszonyoknak, melyek befolyásolják

viselkedését, pl. a metasztatikus hajlamát is. Mindezen okok miatt előfordulhat, hogy a bőr alatti és orthotopikus xenograft modellek kezelésre adott reakciója is különböző lesz [93].

II.2.1.2. Sejtvonal vagy szövettényészet

A beültetésre kerülő sejtek származhatnak immortalizált sejtvonalakból, illetve betegek tumoraiból készített szövettényészetekből.

A sejtvonalak nagy előnye, hogy könnyen leszámítható, és meghatározható a beültetésre kerülő sejtek száma, mennyisége. Ezen túl tulajdonságaik módosítása is lehetséges, melyre több technika is, pl. transzfekciós módszer létezik. Ezzel szemben a szövettényészetek nagy előnye a tumorokra jellemző heterogenitáson túl az, hogy a sejtvonalakhoz képest genomjuk stabilabb. Ezáltal kisebb valószínűséggel vesznek el az eredeti tumorra jellemző biológiai tulajdonságok, így a kezelésre adott válasz is közelebb áll majd a klinikumban tapasztalathoz [94].

II.2.2. Mellékvesekéreg-rák preklinikai modelljei

A humán tumorok nagyrészt ellentétben mellékvesekéreg-rák eredetű sejtvonalat, szövettényészetet rendkívül nehéz előállítani. Mindezek eredménye, hogy a mai napig mindössze három sejtvonal: az NCI-H295/H295R, SW-13 és SJ-ACC3 létezik.

II.2.2.1. SW-13

Az SW-13 egy hormonálisan inaktív sejtvonal, melyet egy 55 éves kaukázusi populációból származó nő kissejtes mellékvesekéreg-rákjából 1971-ben hoztak létre [95]. Hormonálisan inaktív tulajdonsága miatt kevésbé népszerű sejtvonal.

II.2.2.2. NCI-H295R

A legelterjedtebben használt hormontermelő sejtvonal az NCI-H295R. Az eredeti tumor, ami egy 48 éves afroamerikai nő mellékvesekéreg-rákja volt, súlyvesztést, aknét, hirsutizust, ödémát, hasmenést, szekunder amenorrhéát okozott. A tumor aktívan kortizolt,

aldoszteront és androgéneket is termelt. A sejtvonal hormontermelő képessége (aldoszteron, kortizol, C19 szteroid) megmaradt, melyből $5-10 \cdot 10^6$ db sejt képes tumort kialakítani immunszupprimált egerekben [96].

II.2.2.3. SJ-ACC3

Az SJ-ACC3 az egyetlen gyermekkori ACC xenograft modell, amit Pinto és mtsai hoztak létre 2013-ban. Az eredeti tumor egy 11 éves fiú jobb oldali mellékvese incidentalomája volt, amiről későbbi laborvizsgálatok alapján derült ki hormontermelő malignus jellege. Az eltávolított tumorból sebészileg előkészített szövetdarabokat aprítás nélkül ültettek be immunhiányos egerekbe, melyek a vizsgálatok alapján rendkívül hasonlóak voltak az eredeti tumorhoz [97].

II.2.2.4. MUC-1

A MUC-1 az első szövetből létrehozott felnőtt mellékvesekéreg-rák xenograft modell [94], melyet az SJ-ACC3-hoz hasonlóan szövetdarabok beültetésével alakítottak ki.

II.2.3. ACC xenograft modellek

Az irodalomban szereplő mellékvesekéreg-rák xenograft modellt alkalmazó tanulmányokat és a felhasználásukkal elért fő eredményeket a következő táblázatban foglalom össze [4. Táblázat].

4. Táblázat: Az eddig közölt mellékvesekéreg-rák xenograft vizsgálatok. A '↓' szimbólum gátlást, csökkenést jelent.

Szerző	Sejtvonal	Kísérleti szer	Eredmény
Barlaskar[98]	NCI-H295R	IGF-1R+mitotán	tumornövekedés ↓
Lindhe[99]	NCI-H295R	mitotán	az adjuváns terápia hatásosabb
Luconi[100]	NCI-H295R	glitazonok	ACC proliferációja kontroll alá került
Demeure[101]	NCI-H295R, SW-13	paclitaxel/nab-paclitaxel	nab-paclitaxel jobb hatásfokú
Doghman[102]	NCI-H295R	NVP-BEZ235	tumortérfogat ↓

Jain[103]	NCI-H295R	Il-13 immunotoxin	tumortérfogat ↓
Mariniello[104]	NCI-H295R, SW-13	sorafenib, everolimus	kombinált formában a tumortérfogat ↓
Gaujoux[105]	NCI-H295R	Wnt/β-katenin csendesítés	tumornövekedés ↓
Doghman[106]	NCI-H295R	mitotán	hosszútávú mitotán kezelés hatástalan
Chimento[107]	NCI-H295R	tamoxifen, G-1	tumornövekedés ↓
Satoh[108]	NCI-H295R	niclosamid	tumornövekedés ↓
Hantel[109]	NCI-H295R	LEDP-M/EDP-M LPDP-M/PDP-M	liposzomális kemoterápiás szerek hatékonyabbak
Hantel[110]	NCI-H295R, SW-13, SJ-ACC3, MUC-1	doxorubicin+IGF-1R antitest	NCI-H295R a tumortérfogat ↓ SJ-ACC3 erős tendencia a tumortérfogat ↓

A xenograft modellek közül kiemelném müncheni partnerünk, Constanze Hantel kutatócsoportjának vizsgálatait, mivel e modellek és a mikroRNS-ek vizsgálatát nemzetközi együttműködés keretében hajtottuk végre.

2014-es projektjünkben új kemoterápiás szer kombinációkat, és azok liposzomális változatait vizsgálták. A nemzetközileg elfogadott, etopozid, doxorubicin, ciszplatin és mitotán (EDP-M) kombinációját hasonlították össze egy paclitaxellel kiegészített doxorubicin, ciszplatin és mitotán (PDP-M) kombinációval, valamint mindkét kombináció liposzómába csomagolt változataival (etopozid, liposzomális doxorubicin, liposzomális cisplatin+mitotán (LEDP-M) és nab-paclitaxel, liposzomális doxorubicin, liposzomális cisplatin+mitotán (LPDP-M)). NCI-H295R xenograft modelleken mindkét liposzómába csomagolt kemoterápiás szer kombináció szingifikánsan hatékonyabb tumorelles hatását figyelték meg a liposzóma nélküli szerekhez képest, azonban hosszú távon csak a LEDP-M bizonyult hatásosnak [109].

2016-ban megjelent tanulmányukban liposzomális doxorubicin és egy IGF-1R antitest hatását elemezték, melyben mind a 4 létező xenograft modellt felhasználták a preklinikai modellek által biztosítható legnagyobb heterogenitás elérése céljából. A hosszú távú antitestkezelést kapó NCI-H295R xenograft modellben a tumor méretek szignifikáns csökkenését, az egyszeri kezelést kapó SJ-ACC3-ban erős tendenciát, MUC-1 tumorokban

pedig nem tapasztaltak változást. Ezt a különbséget a sejtvonalak eltérő IGF-1R expressziójával, valamint a rövidtávú kezelésben alkalmazott szerek mindössze egyszeri dóziséval magyarázták. Fő következtetések az alábbiak voltak: az IGF-1R és liposzomális doxorubicin hatásos lehet az ACC kezelésében, valamint hogy az IGF-1R inhibitor hatása az IGF-1R kifejeződésével korrelál [110].

A xenograft modellekkel végzett tanulmányok esetén gyakran látunk eltérő eredményeket. Ez számos tényezővel magyarázható, például a kezelés megtervezésének különbségei, ideje, beadási forma, oldószer, kontroll eltérése, stb. mind eltérő eredmény okozói lehetnek. Erre nagyon jó példa a mitotánt különböző aspektusokból vizsgáló három tanulmány különböző következtetése [98, 106, 111]. Ezekből a tapasztalatokból és eredményekből arra következtethetünk, hogy az *in vivo* xenograft modell kísérletek végrehajtási stratégiáit egységesíteni, standardizálni kellene.

II.3. MikroRNS-ek

II.3.1. A szöveti mikroRNS-ek diagnosztikai szerepe

A mikroRNS-ek fontos tulajdonsága a dolgozatomban korábbi részében (II.1.2.2.5.) már említett szövetspecifikus kifejeződés, mely eltérő betegségekre, állapotokra is jellemző lehet. Ezeknek a specifikus kifejeződési mintázatoknak a meghatározásával tumorerősítés diagnosztikájára is felhasználhatóak lehetnek. Ennek megállapításához nagy segítséget nyújt, hogy rendkívül stabilak, és szintjük akár még évekkel ezelőtt, paraffinban fixált szövetmintákból is megbízhatóan azonosítható, így a vizsgálható minták számával nem lehet probléma [112].

Az utóbbi időben számos tanulmány közölt specifikus szöveti mikroRNS mintázatokat, melyek megkönnyítik a különböző rákos megbetegedések diagnózisát, pl. a mellékvese [44], hasnyálmirigy [113], prosztatata [114], tüdő [115] esetében. Diagnosztikai jelentőségük azon betegségekből, tumorokból a legnagyobb, amelyek szövettani vizsgálata nehézkes, a biztos diagnózis egyáltalán nem lehetséges. Ilyen daganatra példa a mellékvesekéreg-rák, melyre jellemző mikroRNS-eltéréseket dolgozatomban korábbi részében már részleteztem (II.1.2.2.5.).

Sajnos a xenograft modelleknél korábban már említett nem meghatározott sémák, protokollok hiánya miatt a különböző tanulmányok eredményei között gyakran nagy ellentmondásokat találunk, melyek a minták számának, különböző platformok, vizsgálati protokollok egységesítésével kiküszöbölhetőek lennének.

II.3.2. A keringő mikroRNS-ek jelentősége, diagnosztikai szerepe

Az utóbbi időben derült fény arra, hogy a mikroRNS-ek nemcsak szövetben fordulnak elő, megfigyelhetőek különböző testfolyadékokban is, mint például vér, vizelet, széklet, nyál,

anyatej, sperma, vaginális szekréta stb. [116]. A vérben kimutatható mikroRNS-eket keringő mikroRNS-eknek nevezzük.

Kiválasztásuk a keringésbe három fő úton történhet: i. passzív úton, kiáramlással pl. sejtszétválás esetén ii. aktív kiválasztással, extracelluláris vezikulákban (exoszómák, microvesiculák), ill. makromolekuláris komplexekhez pl. lipoproteinekhez (leggyakrabban HDL) és fehérjékhez (Ago2) kötve [117].

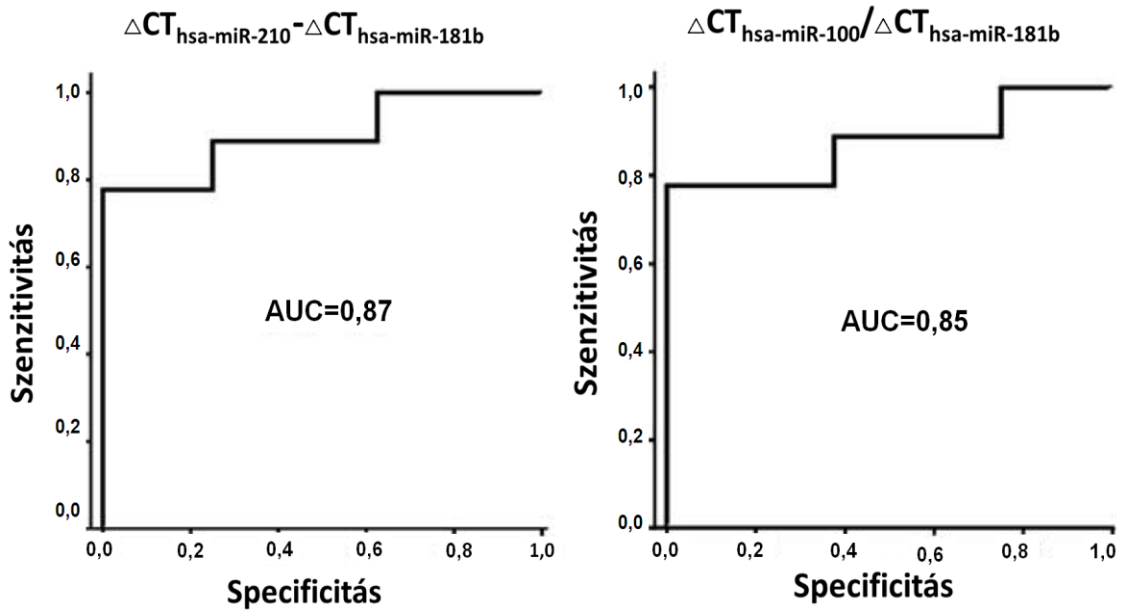
A keringő mikroRNS-ek karakterére jellemző a rendkívüli stabilitás, ellenállóak több extrém tényezővel szemben is, pl. többszöri forralás, fagyasztás, alacsony, magas pH, hosszú tárolás stb. Ezt a védettséget valószínűleg membráncsomagolásuk és különböző fehérjék megkötése biztosítja ezt. Funkcióikról csak találgatások vannak, feltételezik, hogy hormonszerű hatásokat közvetítenek sejtek, szövetek, akár fajok között is [118].

Klinikailag a keringő mikroRNS-ekben rejlő egyik legfontosabb felhasználási lehetőség a különböző betegségek diagnosztizálásában van. A szöveti mikroRNS-ekhez hasonlóan a keringő mikroRNS-ekről is elmondható, hogy mintázatukat meghatározva alkalmassá válhatnak különböző kórok felismerésére. Ehhez egy minimálisan invazív módszerrel, egyszerű vérvétellel nyerhetünk mintát, mely a szöveti biopsziával szemben számos előnnyel jár. A keringő mikroRNS-ek szintjei ezentúl korrelálhatnak a betegség lefolyásával is, így felhasználhatóak lehetnek a betegség állapotának, esetleges kezelésének követésére, monitorizálására is [119].

Diagnosztikában való felhasználásukhoz vérszintjeik megbízható, pontos meghatározására van szükség. Sajnos ma még az azonos tumortípusból más-más kutatócsoport által közölt eredmények között nagy a diszkrépancia. Ez azzal magyarázható, hogy a vizsgálati módszereket még nem egységesítették, így a vizsgálatok számos ponton például a mintavételi eljárás, a minta, az RNS-izolálási eljárás, a mérései módszer, a normalizáció stb. eltérőek lehetnek. Ezek közül a leginkább kérdéses a mérési normalizáció, amihez egy állandóan, stabil szinten a vérben kifejeződő mikroRNS-re lenne szükség. A célra több, kis magi RNS molekulát (például *RNU6B*, *RNU44*, *RNU48*), valamint a vérben viszonylag magas és stabil kifejeződést mutató mikroRNS-eket, így a *hsa-miR-16*-ot, és a *let-7a*-t is vizsgálták, melyek közül a *hsa-miR-16* használata terjedt el

leginkább annak ellenére, hogy több közlemény is megkérdőjelezte alkalmazhatóságát. Egy másik módszer, hogy a mintához még a mikroRNS-izoláció előtt egy mesterséges, úgynevezett „spike-in” kontrollt tesznek (leggyakrabban a *cel-mir-39*), mellyel a mérési technikák, mint például az RNS-izolációs módszerek közötti különbséget ki lehet küszöbölni [120].

Mellékvesekéreg-daganatokra jellemző keringő mikroRNS-profilt rajtunk kívül kettő másik munkacsoport vizsgálta. Tanulmányunkban összesen 12 jó- és 13 rosszindulatú mellékvesekéreg-tumoros beteg plazmamintájából miRNS microarray, valamint irodalmi adatok áttekintésével több mikroRNS kifejeződését különbözőnek azonosítottunk. *Cel-miR-39*-et, mint referenciagént használva egy, a *hsa-miR-181b*, míg a *hsa-miR-16*-ot, mint referenciagént használva a *hsa-miR-100*, *hsa-miR-181b*, *hsa-miR-184*, *hsa-miR-210* és a *hsa-miR-483-5p* szignifikánsan fokozott kifejeződését találtuk rosszindulatú mellékvesekéreg-tumorban jóindulatú tumorhoz képest. Ha a két referenciagént kombinálva alkalmaztuk a *hsa-miR-181b* és *hsa-miR-483-5p* kifejeződése tért el szignifikánsan. A diagnosztikai felhasználhatóságukat vizsgálva ROC elemzéssel megállapítottuk, hogy a $\Delta CT_{hsa-miR-100}$ és $\Delta CT_{hsa-miR-181b}$ arányát felhasználva 77,8 %-os szenzitivitással és 100%-os specificitással, míg a $\Delta CT_{hsa-miR-210}$ és $\Delta CT_{hsa-miR-181b}$ különbségét alkalmazva 88,9 %-os szenzitivitással és 75 %-os specificitással különíthető el a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganat [3. Ábra] [121].



3. Ábra: Munkacsoportunk korábbi vizsgálatában a keringő mikroRNS-ek diagnosztikában való alkalmazhatóságát ROC elemzéssel vizsgáltuk: a $\Delta CT_{hsa-miR-210}$ és $\Delta CT_{hsa-miR-181b}$ különbségét alkalmazva 88,9 %-os szenzitivitással és 75 %-os specifitással, míg a $\Delta CT_{hsa-miR-100}$ és $\Delta CT_{hsa-miR-181b}$ arányát felhasználva 77,8 %-os szenzitivitással és 100%-os specifitással megmondható, hogy az adott elváltozás mellékvesekéreg-rák [121].

Eredményeinken túl mindhárom tanulmány [54, 108, 109], az előbbieken tárgyalt vizsgálati egységesítés hiányától függetlenül, a *hsa-miR-483-5p* fokozott expresszióját azonosította, mint leginkább mellékvesekéreg-carcinomára specifikus keringő mikroRNS.

A keringő mikroRNS-ek vizsgálata nagy lehetőséget rejt, de a vizsgált mintaszámok növelése, és egységes vizsgálati kritériumok kialakítása szükséges ahhoz, hogy klinikai alkalmazhatóságukat egyértelműen megállapíthassuk.

III. CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám során több szempontból is elemeztem a mellékvesekéreg-carcinoma, a tumorelles kezelések, és a keringő mikroRNS-ek kapcsolatát, melynek során több *in vivo* xenograft modellt használtam. Célul tűztem ki annak vizsgálatát, hogy:

1. A 9-cisz retinsav mint az RXR receptor specifikus ligandja és potenciális új szereplő a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében, a mitotán, mint a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében elérhető egyetlen mellékvesekéreg-specifikus készítmény, valamint a két szer kombinációja hogyan befolyásolja az NCI-H295R xenograft egérmódelben a daganatok növekedését?
2. Az alkalmazott kezelések milyen génexpressziós és fehérjeszintű változásokat indukálnak?
3. A keringő mikroRNS-ek használhatók-e a daganatok monitorizálására, a tumorelles kezelések követésére?

IV. MÓDSZEREK

IV.1. Sejttenyésztés

A sejttenyésztéshez NCI-H295R humán mellékvesekéreg-rák sejtvonalat használtunk fel melyet az American Type Culture Collection-tól (USA, VA, Manassas) szereztünk be. A sejteket 37 °C-on, párasított, 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban DMEM:F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium : Nutrient Mixture F-12 Ham) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) egy az egyhez arányú alaplátmédiában szaporítottuk kiegészítve 0,00625 mg/ml inzulin (Sigma Aldrich), 10,00625 mg/ml transferrin (Sigma Aldrich), 6,25 ng/ml szódium-szelenit (Sigma Aldrich), 1,25 mg/ml bovin szérum albumin (Sigma Aldrich), 0,00535 mg/ml linolénsav (Sigma Aldrich), 2,5% Nu-szérum (BD biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), 1% HEPES (Sigma Aldrich), 1% Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich), 2,5 % glutamin (Sigma Aldrich) hozzáadásával. A médiomot kétszer- háromszor cseréltük egy héten, a sejtek passzálására hetente egyszer került sor.

IV.2. Xenograft modell

A xenograft modellhez 43 hím, 6-8 hetes, 21-23 gramm átlagos tömegű kombinált immunhiányos (SCID) BALB/c törzsű egeret használtunk fel. A kísérlet elején az állatok bőre alá jobb csípő tájékon 200 µl PBS-ben 10⁷ db, felszuszpendált, korábban tenyésztett NCI-H295R sejtet oltottunk. Miután a megtapadó és növekvő tumorok elérték a mérhető 3 mm-es átmérőt a 28 napos folyamatos per os kezeléseket megkezdtük. A 43 egeret a kezeléseknél megfelelően négy csoportra osztottuk: 11 egér kontroll kezelést kapott 200 µl/nap kukoricaolaj formájában; 10 egér 200 mg/kg/nap mitotán 200 µl kukoricaolajban oldva, 11 egér 5 mg/kg/nap 9-cisz retinsavat szintén 200 µl kukoricaolajban oldva, illetve 11 egér a mitotán és 9-cisz retinsav kezelést kombinálva kapta 200 mg/kg/nap mitotán illetve 5 mg/kg/nap 9-cisz retinsavat külön-külön 100-100 µl kukoricaolajban oldott

formában. A tumorok méretét hetente kétszer követtük, ugyanazon állatházi gondozó által. A tumorok méretét két átmérő ismeretében a következő formula segítségével számoltuk ki: $(a \cdot a \cdot b \cdot \pi) / 6$, ahol 'a' és 'b' a tumor két lement átmérője. A kezeléseket alatt 1 egér pusztult el technikai okokból kifolyólag.

Az állatok éter anesztéziában, cervikális diszlokációval történő leölése után a tumorokat eltávolítottuk, súlyukat lementük. A tumorok felét formalinban fixáltuk, a másik felét pedig folyékony nitrogénben fagyasztottuk, és felhasználásukig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A formalinban fixált tumorból szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. A tumorokon kívül a tüdők, szív, vesék, máj és lép is el lett távolítva toxicitási vizsgálat céljából. Az egerekből ezen kívül teljes vért nyertünk, melyből plazmát izoláltunk és $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásáig. Az állatkísérletes vizsgálatokhoz etikai engedéllyel rendelkezünk (TUKEB engedélyszám: XVI/03047-2/2008).

IV.3. Szövettani és immunhisztokémiai vizsgálat

Paraffinba ágyazott formalinban fixált szövetekből xilén és etanol segítségével $4\text{ }\mu\text{m}$ -es szeleteket paraffinmentesítettünk, majd ezután hematoxin-eosinnal és Ki-67 immunhisztokémiai festékekkel megfestettük a mintákat. A Ki-67 immunhisztokémiai festést az antitest 1:400 hígításával (Kat.sz. M7240, Dakocytomation, Glostrup, Denmark) Leica BOND-MAX automata rendszer végezte. A metszeteket Panoramic Flash II szkennelvel olvastattuk be, melyeket Pannoramic Viewer (3DHistech, Budapest, Hungary) szoftver segítségével elemeztünk. A metszeten a tumor azon részeit jelöltük ki, ahol a Ki-67 pozitív és negatív sejtek egyenként jól elkülönültek (ROI). Mind a 4 csoportból 4-8 jó minőségű metszeten 3-5 ilyen régiót (ROI) számoltunk le átlagosan 4498-6237 sejtrel. Az elemzést 3 független patológus is elvégezte vak módon. A proliferációs indexet a pozitív sejtek százalékos arányában határoztuk meg. A három patológus által meghatározott értékeket átlagoltuk.

IV.4. RNS-izolálás tumor szövetből

A nitrogénben fagyasztott mellékvesekéreg-carcinoma szövetekből a tervezett vizsgálatok, mint például microarray módszerrel történő mRNS-expressziós profilozás miatt Rns-izolálást hajtottunk végre.

Ehhez a folyamathoz a fagyasztott tumorszöveteket először folyékony nitrogénben történő porítással homogenizáltuk, majd az RNS-izolálást a porított tumorból Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) felhasználásával, oszlopos technikával a gyártó utasításai szerint végeztük el. Az RNS koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg. Az RNS-izolálás minőségének ellenőrzése céljából pedig az RNS integritását Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segítségével mértük. További vizsgálatra csak azon minták kerültek, melyeknek RNS integritás száma (RIN) nyolcas érték fölött volt. Az izolált RNS-eket felhasználásukig -80 °C-on tároltuk.

IV.5. Hírvivő RNS (mRNS) expressziós profil meghatározása

A gének kifejeződését a róluk átíródó hírvivő RNS-ek profilozásával, összesen 16 mintán vizsgáltuk (4-4 mintán csoportonként) 4x44K-s Agilent Whole Genome Single-Color Microarray (Agilent Technologies) lemezek segítségével.

A vizsgálathoz 200 ng teljes, korábban izolált RNS-t használtunk fel, melyet Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) segítségével jelöltünk és amplifikáltunk. Az így kapott jelzett RNS-t tisztítása után Agilent Human Gene Expression Microarray 4x44K lemezekre (Agilent Technologies) hibridizáltuk a gyártó utasításai szerint. A mosás után a lemezek szkennelése Agilent DNA Microarray Scannerrel (Agilent Technologies) történt. A jeleket adó pontok, úgynevezett spotok fluoreszcens értékeinek kvantifikálását, a háttér levonását és a festék normalizálását a Feature Extraction szoftver 11.0.1 verziójával (Agilent Technologies) végeztük el. A nyers adatokat GeneSpring 12.6 szoftverrel (Agilent Technologies) elemeztük.

IV.6. mRNS profil eredményeinek validálása reverz transzkripció kvantitatív polimeráz lánreakció (RT-qPCR) módszerrel

A génexpressziós vizsgálat eredményei közül a kifejeződésbeli változás, illetve irodalmi adatok alapján 7 gént választottunk ki validálásra: azon géneket vizsgáltuk tovább, melyeknek mérésünk alapján a legnagyobb kifejeződésbeli különbséget mutatták a kontroll és kezelt csoportok között, mind negatív, mind pozitív irányban, valamint irodalmi adatok igazolták rosszindulatú folyamatokban betöltött szerepüket. A mérést csoportonként 8 mintán végeztünk el. A vizsgálatot a következő Taqman Gene Expression Assay-ekkel hajtottuk végre (Thermo Fisher Scientific): *MYC* (Hs00153408_m1), *APOA4* (Hs00166636_m1), *CXCR3* (Hs01847760_s1), *BAALC* (Hs00227249_m1), *PDE4A* (Hs00183479_m1), *PRDMI* (Hs00153357_m1) és *TGFBI* (Hs00932747_m1). Referenciagénként korábbi tanulmányaink [123], valamint Cheng és mtsai által javasolt kritériumok alapján [124] a *ZNF625*-t (Hs00377010_m1) választottuk.

A validálás során első lépésként 10 ng teljes RNS-t írtunk át High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével. A kvantitatív RT-PCR-t a gyártó ajánlásai szerint Taqman Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Thermo Fisher Scientific) enzimmel, 7500 Fast Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) rendszer felhasználásával hajtottuk végre. Minden minta mérése három technikai párhuzamossal történt. A negatív párhuzamos minták nem tartalmazták a reverz transzkripció által kapott cDNS templátokat. Az adatok elemzéséhez és eredmények kiértékeléséhez a $\Delta\Delta CT$ módszert [125] használtuk. A számolást Microsoft Excel 2010 szoftverrel (Microsoft Corporation) végeztük.

IV.7. Fehérjeizolálás

A fehérjeizolálás első lépéseként a tumorszöveteket folyékony nitrogénben való porítás és ultrahangos szonikálás segítségével homogenizáltuk, majd 30 percen keresztül 1 ml lízis bufferben (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,5% Triton X-100, 0,5 Protease

Inhibitor Cocktail, 10 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄)(Sigma Aldrich) jégen lizáltuk. Ezt követően a mintákat 13000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk, majd centrifugálás után a felülúszót leszívtuk. A felülúszókból a Bradford által közölt [215] eljárás alapján fehérjekoncentráció-mérést hajtottunk végre.

IV.8. Proteomikai elemzés

A proteomikai elemzésünkhöz az azonos mennyiségű, korábban fehérjeizoláláskor nyert fehérjelizátumokat (csoportonként 3 minta, mintánként 20-20 µg) SDS-PAGE módszerrel 10 %-os gélen szeparáltuk, majd kolloidikus Coomassie Brilliant Blue-val festettük. Az így kapott géleket mintánként felvágtuk, majd a gélsíkok fehérjetartalmát 4 órán keresztül tripszin (Promega, Fitchburg, WI, USA) segítségével digesztáltuk. Ezután az emésztési folyamatot hangyasavval leállítottuk, a peptideket pedig a gélből először kinyertük, majd szárítottuk.

Az így nyert mintákat 30 µl 0,1 %-os hangyasavban feloldottuk, majd nano-LC-MSMS elemzést hajtottunk végre. A mérés gradiens elúciós módszerrel történt a következő paraméterekkel: 5 µl injektált térfogat; álló fázis: BEH300 C18 (1.7 µm, 075µm x 250mm) nanoAcquity UPLC (Waters 186003815); mozgó fázis: A és B oldat meghatározott keveréke ('A oldat': 0,1% hangyasav vízben oldva, 'B oldat': 0,1% hangyasav acetonitril és DMSO 95:5 arányú keverékében oldva). A méréshez LTQ-Orbitrap Elite nagyfelbontású tömegspektrométert használtunk, ami 380-1600 tömegtartományban végzett mérést, és a 10 legintenzívebb jelet adó iont ioncsapdás ütköztetéssel fragmentálta (CID). A mérés az egyszerű töltéssel rendelkező ionokat kizárta a fragmentációból.

A tömegspektrometriai nyers adatokat PAVA script segítségével MSMS peak list fájlokba konvertáltuk [126], majd ezen fájlok alapján kerestünk humán és egér fehérjéket az UniProtKB (utolsó módosítás dátuma 2014. április 10.) megfelelő adatbázisában, mely 136244 humán és 74540 egér fehérjét és ezek randomizált szekvenciáit tartalmazza. Minden adatbázis keresés a saját ProteinProspector (ver. 5.14 1) (Baker, P.R and Clauser, K.R. <http://prospector.ucsf.edu>) kereső motorral zajlott.

IV.9. Western blot analízis

A proteomikai eredmények és irodalmi adatok alapján a SET fehérjét választottuk ki Western blot módszerrel történő validálásra, mely során csoportonként 3-3 mintát elemeztünk. Ezután a xenograft modellen kívül humán normál és tumoros szövetekben is vizsgáltuk a SET fehérje kifejeződését. Ehhez 2-2 mintát használtunk fel minden csoportból. Az egészséges szöveteket korábban hypernephromával műtött betegektől nyertük [34]. A szövetek felhasználása minden esetben a betegek tájékozott beleegyezésével történt. (ETT engedély száma: 230-1 5/2006-1018EKU)

A Western blot során először mintánként 20 µg teljes fehérjét adtunk az úgynevezett Loading Bufferhez (Laemmli+1,5 % mercaptoethanol), majd 99 °C-on inkubáltuk 5 percen keresztül. Az inkubálás után a denaturált mintákat 10 %-os poliakrilamid gélen Mini Protean vertikális elektroforézis (Bio-Rad, Hercules, CA) eszközzel 200 V feszültség alatt 30 percig futtattuk. Ezt követően a fehérjéket átvittük egy PVDF membránra (Millipore, Billerica, MA) egy egész estés 75 mA erős áramú blottolás segítségével. Ezek után Ponceau-festéssel ellenőriztük a betöltés és a blottolás eredményességét. Következő lépésben a membránokat TBS-ben (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH=7,5) oldott 5 w/v %-os száraz tej (Bio-Rad) oldattal 1 órán keresztül blokkoltuk, majd anti-SET (ab1183, Abcam, Cambridge, MA, 1:1000 hígítás) vagy anti-β-actin (A2228, Sigma Aldrich) antitesttel inkubáltuk 4 °C-on 16 órán keresztül. A membránokat 5-ször mostuk át TBST (TBS + 0,05 % Tween-20) oldattal, majd másodlagos HRP-konjugált anti-nyúl (P0448, DakoCytomation) vagy anti-egér (P0447, DakoCytomation) antitestekkel inkubáltuk 1 órán keresztül. A jeleket Supersignal West Pico Chemoluminescent Substrate Kit (Thermo Fisher Scientific) és Kodak Image Station 4000MM Digital Imaging System (Kodak, Rochester, NY, USA) segítségével vizualizáltuk. Töltési kontrollnak a β-actin-t használtuk. A jelek denzitását ImageJ szoftverrel (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) határoztuk meg.

IV.10. Útvonalelemzés

A proteomikai elemzés után a szignifikáns fehérjék listáját DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov/>) (NIH, Bethesda, WA, USA) online elérhető szoftver adatbázisába feltöltöttük, majd segítségével funkcionális útvonalelemzést hajtottunk végre.

IV.11. Plazma RNS-izolálás

A keringő mikroRNS-ek vizsgálata céljából szükséges volt az egerek leölése során nyert vérből izolált plazmában található Rns-izolálása. Ehhez az általunk létrehozott NCI-H295R xenograft egerekből nyert vért használtuk fel.

100 µl egerekből nyert plazmából oszlopos módszerrel teljes RNS-t izoláltunk Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) felhasználásával, a gyártó utasításai szerint kiegészítve egy mesterséges spike-in kontroll *cel-miR-39* (2594091) (Qiagen) hozzáadásával. A leizolált RNS koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) mértük meg. Az izolált RNS-eket felhasználásukig -80 °C-on tároltuk.

IV.12. Plazma exoszóma RNS-izolálás

A plazma exoszóma mikroRNS-ek vizsgálata céljából szükséges volt az egerek leölése során nyert vérből izolált plazmában található exoszómákból történő Rns-izolálása. Ehhez a nemzetközi kutatópartnerünk (Constanze Hantel, München, Germany) által létrehozott SW-13 és SJ-ACC3 xenograft egerekből nyert vért használtuk fel.

Elsőként 130 µl egerekből nyert plazmából exoszóma izolálást hajtottunk végre precipitációs módszerrel Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával a gyártó utasításai szerint. Ezután az izolált exoszómákból oszlopos

módszerrel teljes RNS-t izoláltunk Total Exosome RNA & Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével, a gyártó utasításai szerint kiegészítve mesterséges spike-in kontroll *cel-miR-39* (2591091) (Qiagen) hozzáadásával. Az izolált RNS-eket felhasználásukig -80 °C-on tároltuk.

IV.13. Keringő mikroRNS-ek mérése RT-qPCR módszerrel

Korábbi tanulmányaink és irodalmi adatok alapján az NCI-H295R xenograft plazmájából izolált keringő mikroRNS-ek esetén négy mikroRNS-t, a *hsa-miR-181b* (001098), *hsa-miR-184* (000485), *hsa-miR-210* (000512) és *hsa-miR-483-5p* (002338), míg az SW-13 és SJ-ACC3 modellek plazmájából izolált exoszóma mikroRNS-ek esetén kettő mikroRNS-t, a *hsa-miR-210* (000512) és *hsa-miR-483-5p* (002338) választottunk ki qRT-PCR módszerrel történő validálásra Taqman miRNA Assay-ek (Thermo Fisher Scientific) segítségével. Referencia mikroRNS-ként az izoláláskor a mintákhoz adott, mesterséges *cel-miR-39-et* (000200) használtuk.

1 μ l teljes RNS-t írtunk át a specifikus Taqman miRNA Assay-ek és Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával Proflex Base PCR System (Thermo Fisher Scientific) polimeráz láncreakciós rendszeren. A kvantitatív RT-PCR Taqman Fast Universal PCR Master Mix (2x) és Taqman miRNA Assay-ek segítségével hajtottuk végre 7500 Fast Real-Time PCR System rendszeren. A PCR reakciókat három technikai párhuzamos méréssel végeztük. A negatív párhuzamos minták nem tartalmazták a reverz transzkripció által kapott cDNS templátokat. Az adatok elemzéséhez és eredmények kiértékeléséhez a $\Delta\Delta$ CT módszert [125] használtuk. A számolást Microsoft Excel 2010 szoftverrel (Microsoft Corporation) végeztük.

IV.14. Szöveti mikroRNS mérés RT-qPCR módszerrel

Figyelembe véve az NCI-H295R xenograft modellben mért keringő mikroRNS eredményeinket csak a szöveti *hsa-miR-483-5p* (002338) mikroRNS-t vizsgáltuk RT-qPCR módszerrel Taqman miRNA Assay-t használva, a gyártó utasításai alapján. Normalizáláshoz referenciaként az irodalomban gyakran használt, és leírt *U6* (001973), *RNU6B* (001093), *RNU44* (001094) és *RNU48* (001006) géneket választottuk.

IV.15. Statisztikai analízis

A daganat növekedésének statisztikai analíziséhez Mann-Whitney U tesztet alkalmaztunk (SPSS Statistics 20, IBM). A Ki-67 index kiértékeléséhez egy utas ANOVA és Tukey-féle post Hoc teszt kombinációját vagy Kruskal-Wallis ANOVA & Median Test-et (STATISTICA 7.0) használtunk a Saphiro-Wilks normalitás teszt eredményének függvényében.

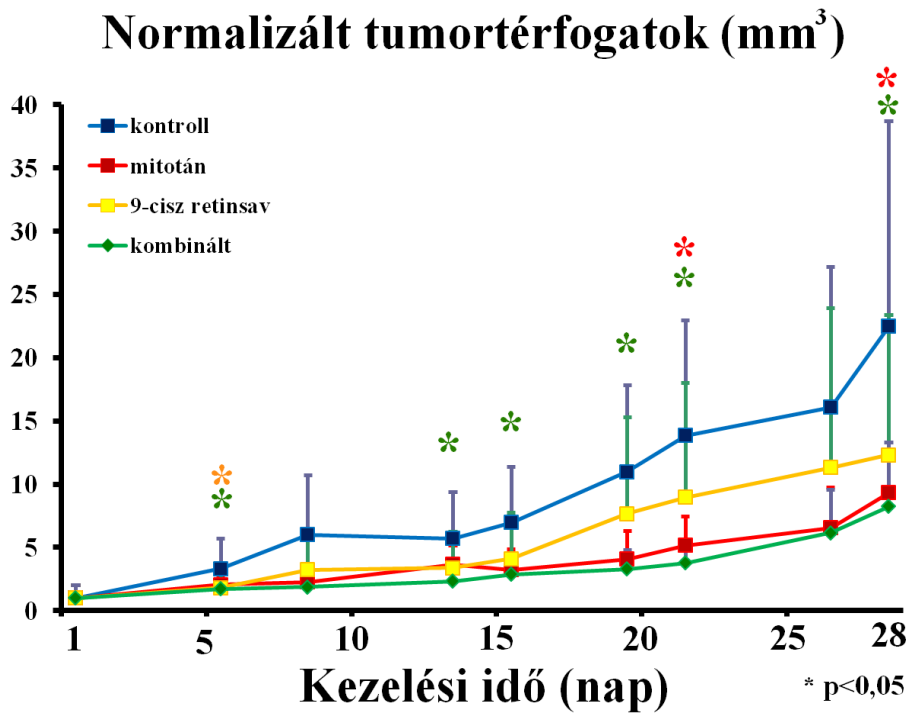
A microarray eredményeit Genespring 12.6 szoftverrel (Agilent Technologies) elemeztük. A nyers expressziós szignálértékek 20 percentilisére tettünk filtert, majd 2-szeres fold change filter és Benjamini-Hochberg False Discovery Rate-tel kiegészített egy utas ANOVA teszttel számoltunk. Az RT-qPCR és a proteomika adatai egy utas ANOVA és Tukey-féle post Hoc teszttel lettek kiértékelve (STATISTICA 7.0).

A Western blot eredményeit Kruskal-Wallis Anova & Median Test-el számoltuk (STATISTICA 7.0).

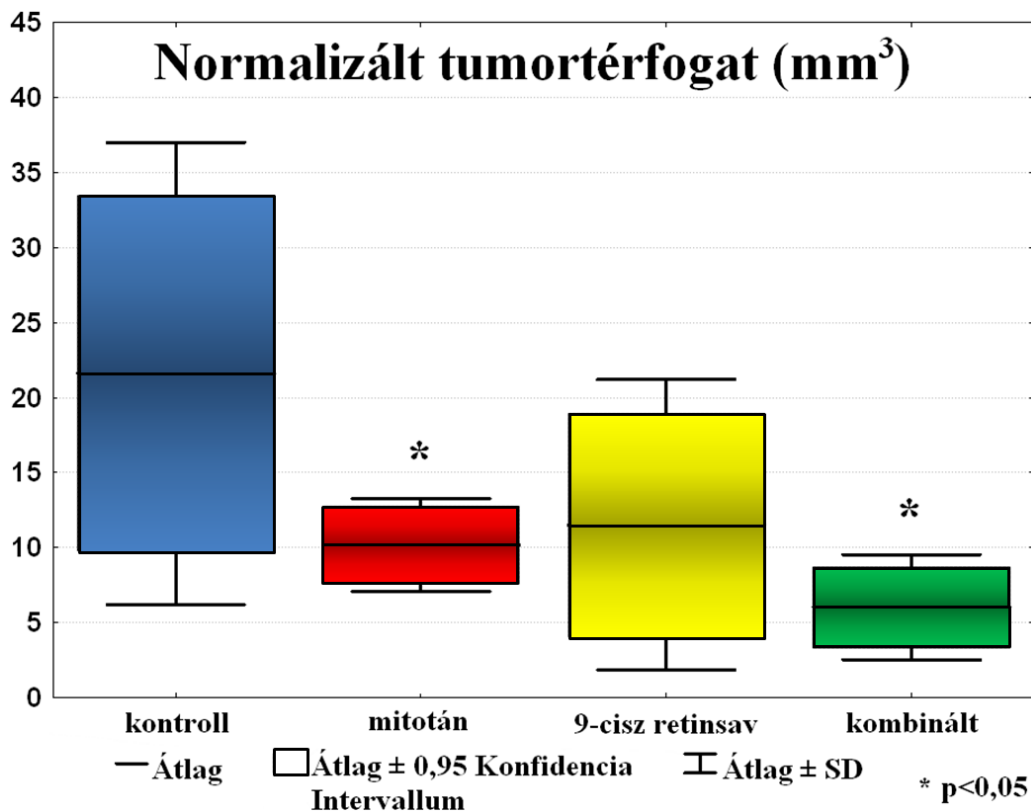
V. EREDMÉNYEINK

V.1. A tumor növekedésének elemzése

A kezelés alatti, illetve a kezelés végén mért tumortérfogatokat az egyes tumorok első lemért térfogatához normalizáltuk, hogy az adatok összehasonlíthatóak legyenek. Az így kapott értékek mindhárom kezelt csoportban kisebbek voltak a kontroll csoporthoz képest a kísérlet mind a 28 napja alatt [4. Ábra]. A kezelés végén a kontroll csoportban 22,48-szoros, a mitotán kezeltben 9,3-szeres, a 9-cisz retinsav kezeltben 12,3-szeres, valamint a mitotán és 9-cisz retinsav kezelést együtt kapó csoportban 8,22-szoros növekedést mértünk a normalizált térfogatok szintjén [5. Ábra]. A tumorok méretét elemezve ez az érték csak a mitotán, illetve az együttesen 9-cisz retinsav és mitotán kezelést kapó csoportban érte el a szignifikancia szintjét. A 9-cisz retinsav önmagában is ígéretes tendenciát mutatott, de a tumorokban mért nagy szórásnak köszönhetően a különbség nem lett szignifikáns.



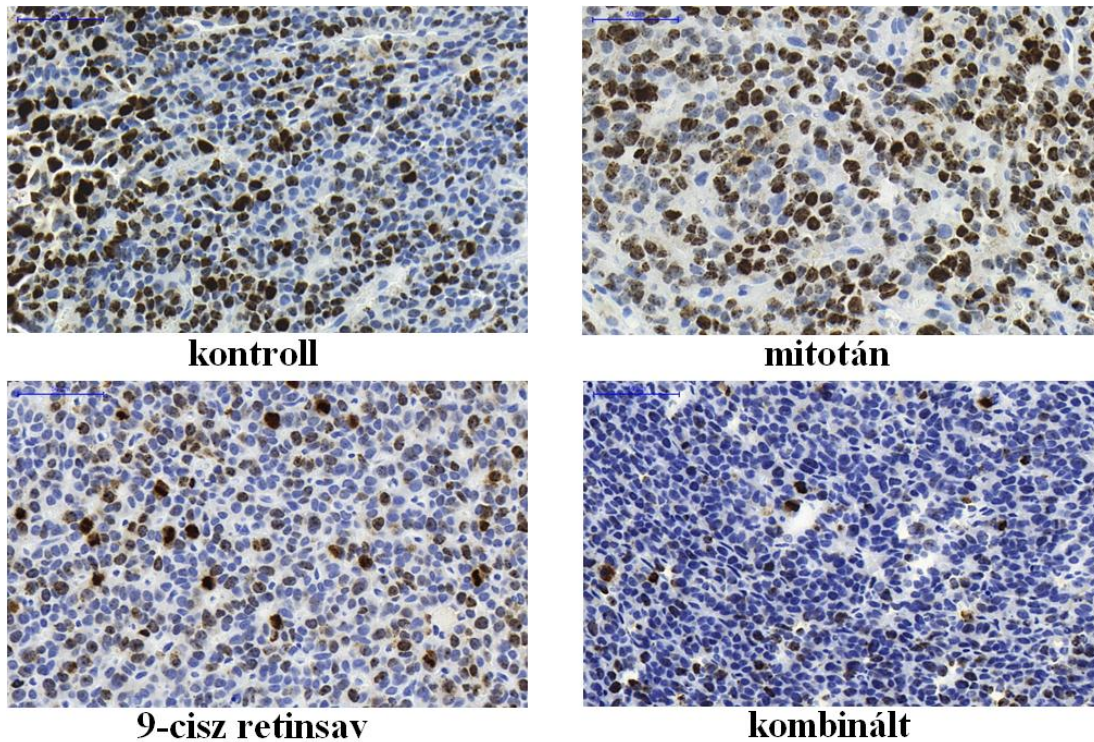
4. Ábra: Normalizált tumortérfogatok a kezelési idő alatt. A kezelt csoportokban mért normalizált tumortérfogatok nagysága folyamatosan alacsonyabb a kontroll csoporthoz képest.



5. Ábra: A 28. napon mért normalizált tumortérfogatok. A térfogatkülönbség a mitotánt önmagában, illetve 9-cisz retinsavval kombinált formában kapó csoportban érte el a szignifikancia szintjét. A 9-cisz retinsav is ígéretes hatást váltott ki, de ez a nagy szórás miatt nem adott szignifikáns eredményt.

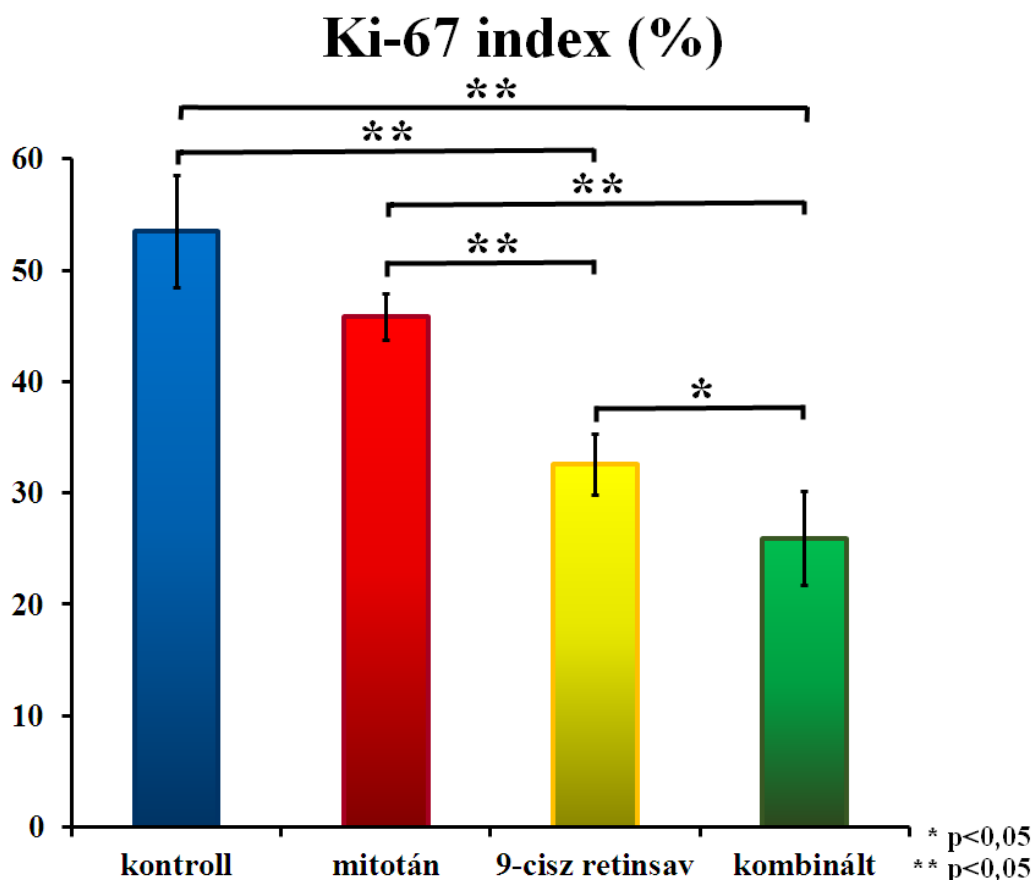
V.2. Szövettan és Ki-67 értékelés

A szövettani vizsgálatban a hematoxilin eozin (HE) festett metszeteken megfigyelhető volt, hogy a 9-cisz retinsavat kapó csoportokban a tumorok differenciáltabb szöveti megjelenést mutattak, mint a kontroll és a mitotán kezelt egerekben.



6. Ábra: Reprezentatív szövettani metszetek a Ki-67 immunhisztokémiai festés után. Jól látható a kontroll és mitotán kezelést kapó csoporthoz képest a 9-cisz retinsavat önmagában és mitotánnal kombinált formában kapó csoport jelentősen kisebb mértékű Ki-67 festődése.

Az immunhisztokémiai módszerrel meghatározható Ki-67 proliferációs indexet [6. Ábra] három, egymástól független patológus is megállapította vak módon. Átlaguk szignifikánsan alacsonyabb volt a 9-cisz retinsavat önmagában, mind mitotánnal együttes formában kapó csoportban a kontroll csoporthoz képest. A 9-cisz retinsav kezelt csoportban ($32,64 \pm 2,2\%$) a kontroll ($54,33 \pm 3,71\%$) és a mitotán kezelt csoporthoz ($46,35 \pm 2,2\%$) képest ($p=0,00018$ vs. kontroll, $p=0,00022$ vs. mitotán); a kombinált, 9-cisz retinsavat és mitotánt együttesen kapó csoport ($25,6 \pm 4,09\%$) mindegyik kezeléshez képest szignifikánsan kisebb Ki-67 indexet mutatott ($p=0,00018$ vs. kontroll, $p=0,00018$ vs. mitotán, $p=0,01684$ vs. 9-cisz retinsav) [7. Ábra].



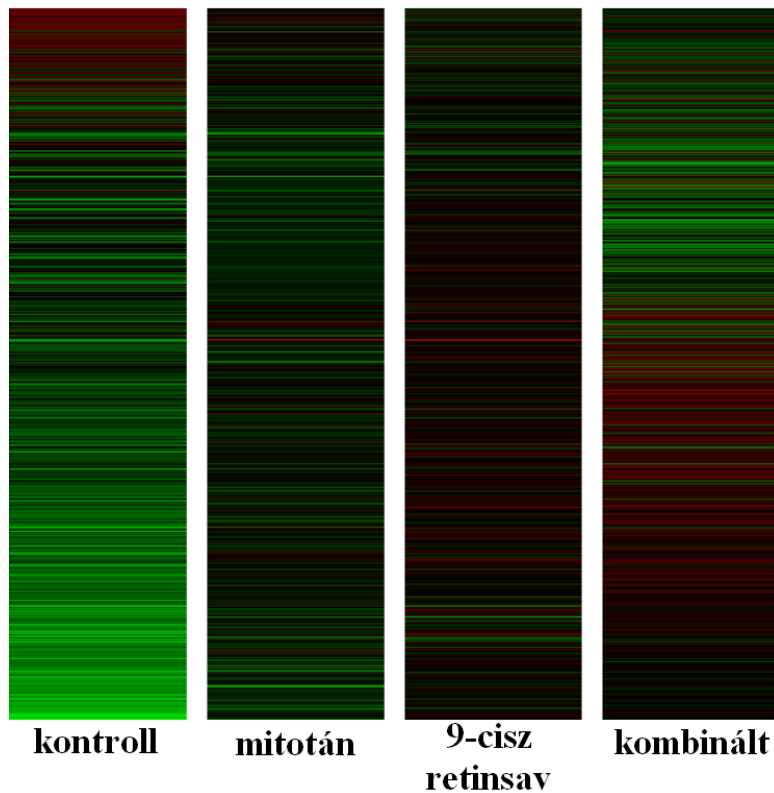
7. Ábra: A három patológus által vak módon meghatározott Ki-67 proliferációs index átlaga. A 9-cisz retinsavat kapó csoportban mért érték mind a kontroll, mind a mitotán, míg a 9-cisz retinsavat és mitotánt együttesen kapó csoportban mért érték mindhárom kezelést kapó csoportban mérthez képest szignifikánsan alacsonyabb szintet mutatott.

A többi szerv szövettani vizsgálata alapján mindössze a májban voltak megfigyelhetőek enyhe zsíros elváltozások, valószínűleg az oldószer kukoricaolajnak köszönhetően. Toxicitásra utaló jeleket a többi eltávolított szervben nem találtunk.

V.3. Microarray elemzés

A kezelések genomra gyakorolt hatásának felderítése érdekében teljes genom génextpressziós vizsgálatot végeztünk. Csoportonként 4-4 mintát, összesen 16-ot jelöltünk

ki microarray vizsgálatra, a minták korábban, Rns-izoláláskor meghatározott RIN értékei alapján. A lemezek szkennelése után, a kapott nyers adatokat statisztikailag elemezve 483 szignifikáns géneexpressziós változást találtunk. Ezután a statisztikai elemzést Benjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR)-tel kiegészítve hajtottuk végre, aminek nyomán mindössze 2 szignifikánsan megváltozott kifejeződésű transzkriptumot találtunk. Egyik a LOC100996813, mely *in silico* predikció alapján a MATE2 (solute carrier family 47 member 2) egyik variánsát, míg a másik a LOC100268168, egy eddig nem karakterizált nem kódoló RNS-t kódolja.

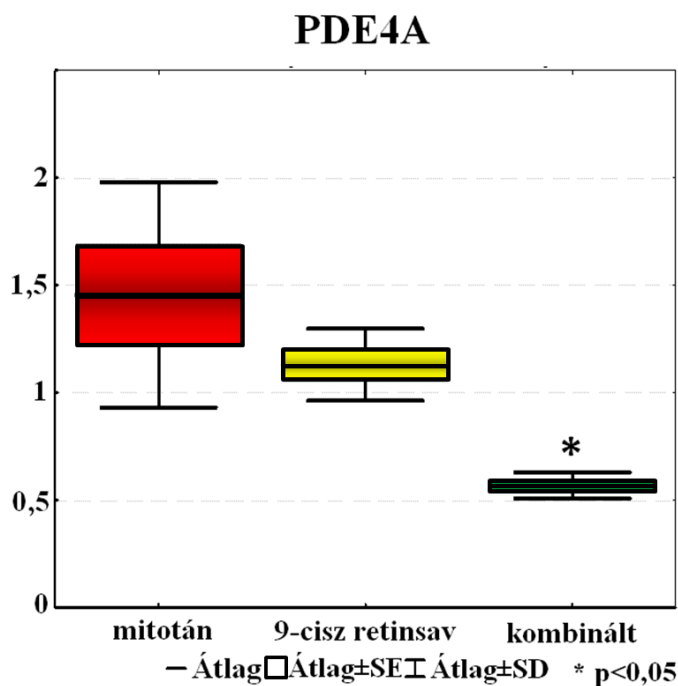
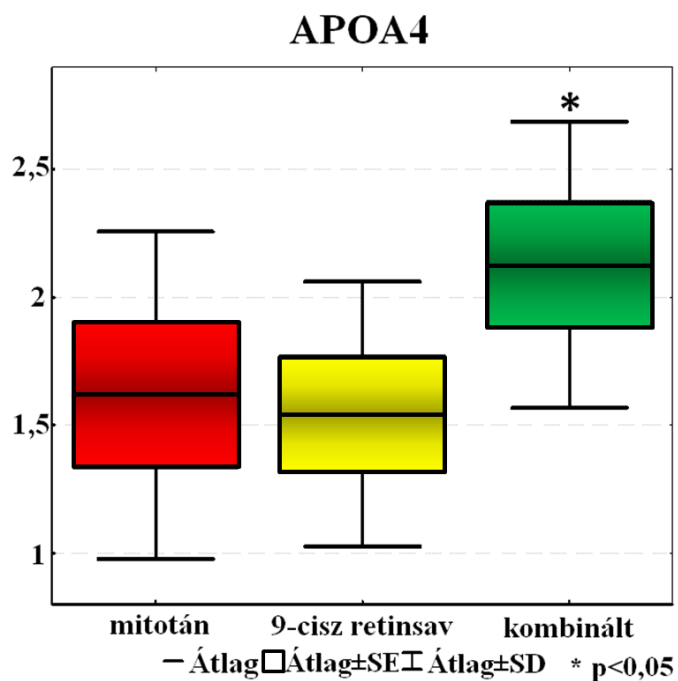


8. Ábra: A microarray lemezek szkennelése után készített hő térkép, úgynevezett heatmap

Microarray vizsgálatunk eredményeit online adatbázisba feltöltöttük, így megtalálhatóak a Gene Expression Omnibus honlapján (GEO; www.ncbi.nlm.nih.gov/geo, azonosítószám: GSE73417).

V.4. RT-qPCR validáció

A kiválasztott 7 gén közül csak kettő kifejeződését sikerült szignifikánsan megváltozottak azonosítani. A jól ismert 9-cisz retinsav célgén *APOA4* kifejeződése szignifikánsan emelkedett ($p=0,0045$), míg a számos tumorban felülexpresszálnak leírt *PDE4A* szintje szignifikánsan csökkent ($p=0,0024$) a kombinált kezelést kapó csoportban a kontroll csoporthoz képest [9. Ábra].



9. Ábra: qRT-PCR módszerrel validált szignifikánsan megváltozott kifejeződést mutató gének. Az *APOA4* szignifikánsan emelkedett, míg a *PDE4A* szignifikánsan csökkent kifejeződést mutatott a kombinált kezelést kapó csoportban. (Az ábra y tengelyén a kontroll csoporthoz képest mért génkifejeződés látható)

V.5. Proteomikai elemzés

A tömegspektrometriával, és bioinformatikai elemzéssel elvégzett proteomikai vizsgálatunk elemzésével 47 szignifikáns fehérjeeltérést találtunk a kontroll és a kezelt csoportok között.

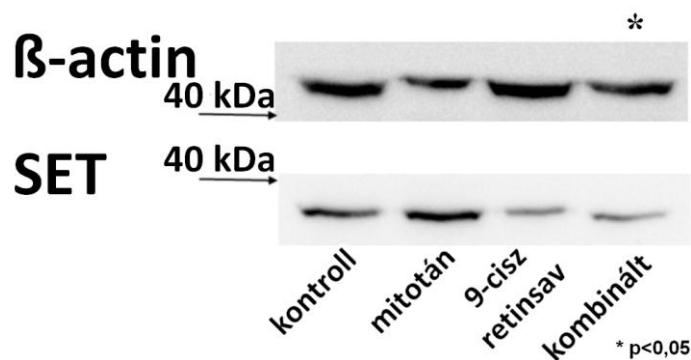
5. Táblázat: Proteomikai vizsgálatunk alapján szignifikánsan megváltozott fehérjék listája.

<i>UniProt ID</i>	Gén neve	Fehérje név
<i>P30050</i>	RPL12	60S ribosomal protein L12
<i>Q13765</i>	NACA	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
<i>B1AK87</i>	CAPZB	Capping protein (Actin filament) muscle Z-line, beta
<i>Q01105</i>	SET	Phosphatase 2A inhibitor I2PP2A
<i>Q86SZ7</i>	PSME2	PSME2 protein
<i>P14314</i>	PRKCSH	Protein kinase C substrate 60.1 kDa protein heavy chain
<i>Q5U8W9</i>	HRMT1L2	Protein arginine methyltransferase 1 isoform 4
<i>Q6DC98</i>	LMNB1	LMNB1 protein
<i>M0QZL1</i>	BLVRB	Flavin reductase (NADPH)
<i>P61158</i>	ACTR3	Actin-related protein 3
<i>Q9UBQ7</i>	GRHPR	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate reductase
<i>O75347</i>	TBCA	Tubulin-specific chaperone A
<i>Q6NVY0</i>	CACYBP	Calcyclin binding protein
<i>K7ES63</i>	TUBB6	Tubulin beta-6 chain
<i>P42126</i>	ECI1	Enoyl-CoA delta isomerase 1
<i>Q5T1M5</i>	FKBP15	FK506-binding protein 15
<i>O75477</i>	ERLIN1	Erlin-1
<i>H7BZ09</i>	ANP32A	Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A
<i>E9PK45</i>	FTH1	Ferritin heavy chain
<i>P62714</i>	PPP2CB	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit beta
<i>P31040</i>	SDHA	Succinate dehydrogenase
<i>H7C333</i>	GBAS	Protein NipSnap homolog 2
<i>Q15404</i>	RSU1	Ras suppressor protein 1
<i>Q92882</i>	OSTF1	Osteoclast-stimulating factor 1
<i>D6RC06</i>	HINT1	Histidine triad nucleotide-binding protein 1
<i>P62888</i>	RPL30	60S ribosomal protein L30
<i>Q969G3</i>	SMARCE1	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily E member 1

<i>P61326</i>	MAGOH	Protein mago nashi homolog
<i>Q16539</i>	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14
<i>P10599</i>	TXN	Thioredoxin
<i>Q9Y333</i>	LSM2	U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM2
<i>P26885</i>	FKBP2	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP2
<i>Q9UJV8</i>	PURG	Purine-rich element-binding protein gamma
<i>P04080</i>	CSTB	Cystatin-B
<i>E5RJH5</i>	ENO3	Beta-enolase
<i>P28062</i>	PSMB8	Proteasome subunit beta type-8
<i>P67775</i>	PPP2CA	Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform
<i>Q53G26</i>	DNAJA3	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 3 variant
<i>Q9UBI6</i>	GNG12	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) subunit gamma-12
<i>Q8NHP8</i>	PLBD2	Putative phospholipase B-like 2
<i>D6R9R5</i>	SAR1B	GTP-binding protein SAR1b
<i>Q00169</i>	PITPNA	Phosphatidylinositol transfer protein alpha isoform
<i>P63173</i>	RPL38	60S ribosomal protein L38
<i>Q5T6V5</i>	C9orf64	UPF0553 protein C9orf64
<i>A4D2P2</i>	RAC1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

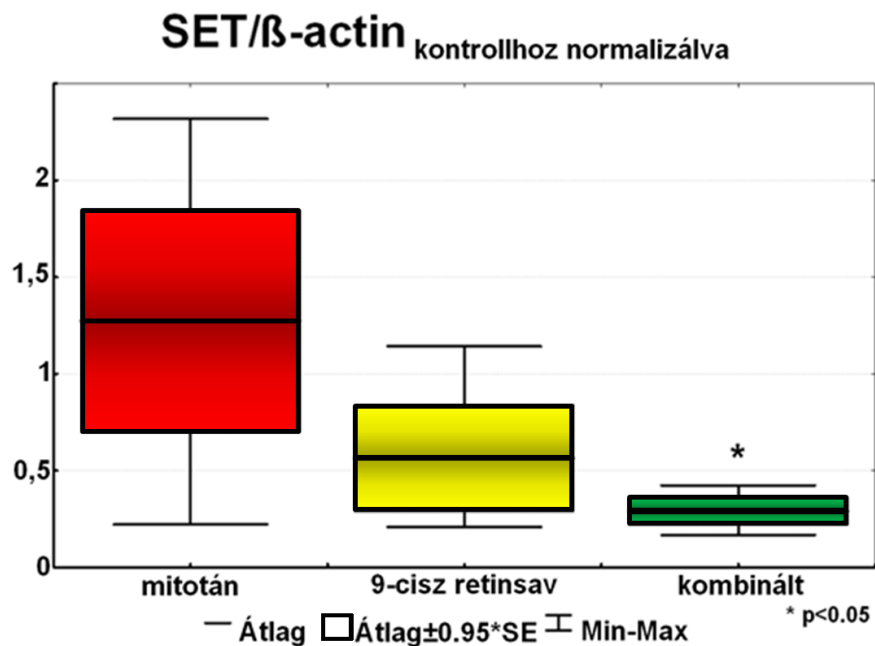
V.6. Western blot vizsgálat

A proteomikai elemzéssel kapott szignifikánsan változó 47 fehérje közül egyet választottunk ki további vizsgálatokra, a PP2A inhibitor SET fehérjét, mivel számos irodalmi adatot találtunk tumorasszociált szerepéről [127–131]. Mellékvesekéreg-carcinómában betöltött jelentőségének igazolása érdekében Western blot módszerrel vizsgáltuk tovább.



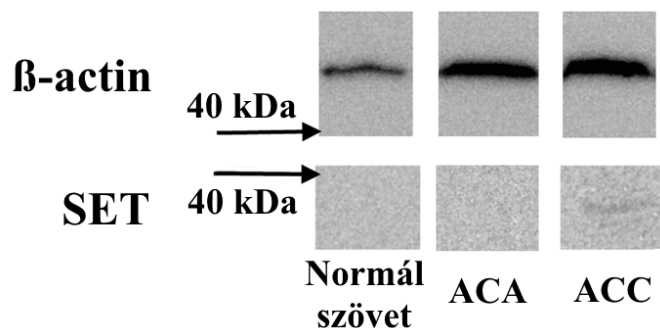
10. Ábra: Western blot vizsgálat eredménye.

Eredményeink azt mutatták, hogy a SET fehérje kifejeződése mindkét 9-cisz retinsavval kezelt csoportban alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest, de ez csak a kombinált csoportban érte el a szignifikancia szintjét.



11. Ábra: A Western blot vizsgálat denzitometriás elemzéssel kapott eredménye. A kontroll csoporthoz viszonyítva a kombinált kezelést kapó csoportban szignifikánsan csökkent a SET kifejeződése.

Annak vizsgálatára, hogy megállapítsuk a SET fehérje potenciális jelentőségét humán mellékvesekéreg-rák esetében, 2-2 normális mellékveseszövetet, mellékvesekéreg-adenomát, valamint mellékvesekéreg-carcinomát vizsgáltunk egy pilóta kísérletben. Ennek során azt találtuk, hogy míg a SET protein normális és adenoma szövetben nem volt detektálható, addig mellékvesekéreg-rák esetében halvány expressziót mutatott.



12. Ábra: Western blot módszerrel a SET fehérje kifejeződését vizsgáltuk humán mellékvesekéreg mintákon végzett pilóta kísérletben: míg normál mellékvesekéreg szövetben és jóindulatú mellékvesekéreg-adenomában nem, addig mellékvesekéreg-rákban a SET enyhe kifejeződését találtuk.

V.7. Funkcionális útvonalelemzés

A proteomikai elemzéssel kapott szignifikáns fehérjékkel DAVID Bioinformatics Resources 6.7 segítségével végzett funkcionális útvonalelemzésünkkel a p53 és Wnt jelátviteli útvonalakban szereplő fehérjéket, valamint riboszómákhoz és proteoszómákhoz kapcsolt útvonalakat azonosítottunk.

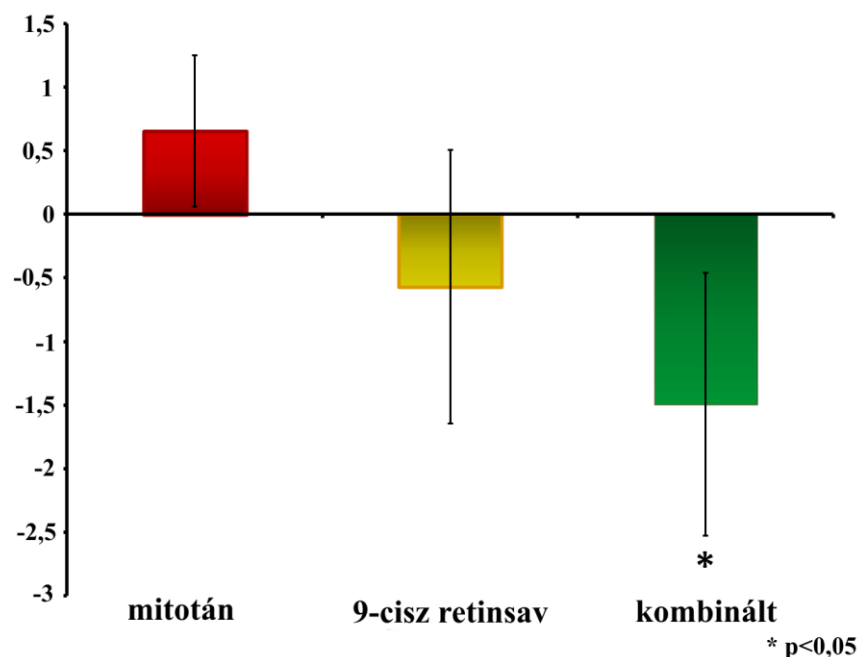
P04398:p53 pathway feedback loops 2	
P00021:FGF signaling pathway	
P00018:EGF receptor signaling pathway	
P04397:p53 pathway by glucose deprivation	
REACT_11045:Signaling by Wnt	
REACT_15295:Opioid Signalling	
REACT_71:Gene Expression	
REACT_17015:Metabolism of proteins	
REACT_1505:Integration of energy metabolism	
REACT_1762:3' -UTR-mediated translational regulation	
KEGG_PATHWAY	Ribosome
KEGG_PATHWAY	Wnt signaling pathway

13. Ábra: DAVID Bioinformatics Resources 6.7 online ingyenesen elérhető útvonalelemző szoftverrel végzett elemzésünk eredménye, melyben látható, hogy a megváltozott kifejeződésű fehérjék többek között a mellékvesekéreg-rák patomechanizmusában jelentős szerepet betöltő Wnt és p53 jelátviteli útvonalakban szerepelnek. (A kép a szoftver felhasználásával készült, <https://david.ncifcrf.gov/>)

V.8. MikroRNS kifejeződés

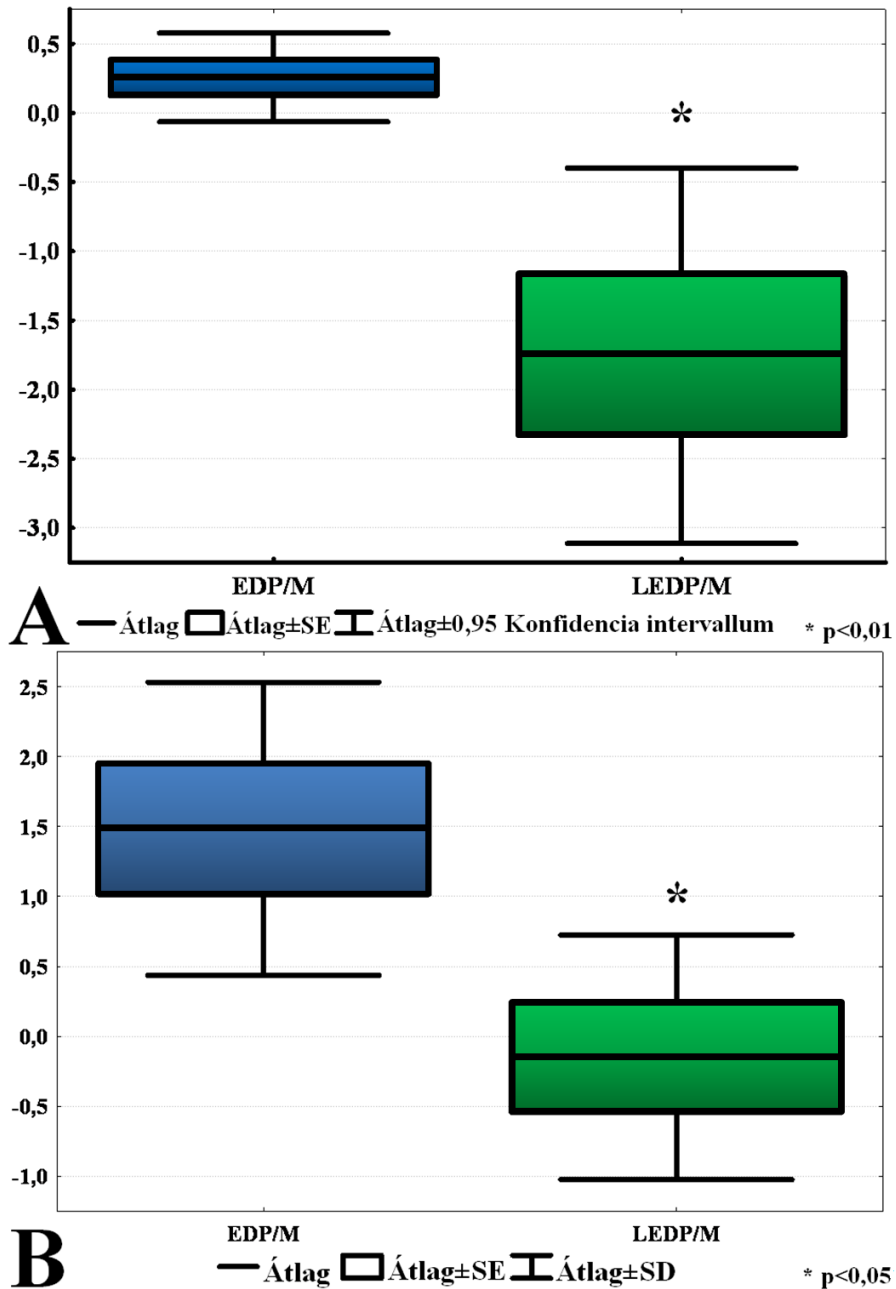
A keringő mikroRNS-ek kifejeződését három, különböző típusú xenograft modellből nyert mintákon vizsgáltuk.

A kiválasztott mikroRNS-ek közül az NCI-H295R xenograft esetén a *hsa-miR-483-5p* szintje szignifikánsan csökkent a kombinált, mitotánt és 9-cisz retinsavat együttesen kapó csoportban a kontrollhoz képest ($p=0,028$). A másik három kiválasztott keringő mikroRNS-nél szignifikáns kifejeződésbeli változást nem találtunk. Normalizáláshoz a spike-in kontroll *cel-miR-39*-et használtuk.



14. Ábra: A keringő mikroRNS *hsa-miR-483-5p* expressziójának változása a különböző kezelések hatására a kontroll csoporthoz képest. A kombinált kezelést kapó csoportban csökkenése szignifikáns változást mutatott. (Az ábra y tengelyén a kontroll csoporthoz képest mért génkifejeződés látható)

Az SW-13 és SJ-ACC3 xenograft plazmamintáiból izolált exoszómákban a *hsa-miR-210* szignifikáns csökkenését mértük az LEDP/M kezelést kapó csoportban SW-13 modellben a kontroll, míg SJ-ACC3 modellben az EDP/M csoporthoz képest. Normalizáláshoz a spike-in kontroll *cel-miR-39*-et használtuk.



15. Ábra: Exoszomális *hsa-miR-210* expressziójának változása a kezelt csoportokban a kontrollhoz képest. A: SW-13 xenograft modellben a mikroRNS szintje szignifikánsan csökkent az LEDP/M kezelt csoportban a kontrollhoz képest; B: SJ-ACC3 xenograft modellben a mikroRNS szintje szignifikánsan csökkent az LEDP/M kezelt csoportban az EDP/M kezelt csoporthoz képest. (Az ábra y tengelyén a kontroll csoporthoz képest mért génkifejeződés látható)

Szöveti szinten is vizsgáltuk a plazmában szignifikánsan csökkenő mikroRNS-eket, de meglepő módon itt nem találtunk szignifikáns eltérést. A négy tesztelt mikroRNS referenciagén közül az *RNU44* és *RNU6B* felelt meg legjobban a mért adatok normalizálásához.

VI. MEGBESZÉLÉS

A mellékvesekéreg-rák komoly kihívások elé állítja az orvostudományt. Rossz prognózisa mellett terápiájában az új kombinációs kemoterápiás kezelések hatékonysága korlátozott, valamint a célzott biológiai kezelések eddig lényegében eredménytelennek bizonyulnak. A mai napig egyetlen, teljes gyógyulás lehetőségét rejtő megoldás a tumor teljes eltávolítása. Gyógyszeres terápiájában egyetlen mellékvesekéreg specifikus szert ismerünk, a számos mellékhatással bíró mitotánt, melynek terápiás ablaka szűk.

A mitotánt vizsgáló sok *in vivo* humán tanulmány ellenére, az irodalomban kevés közlemény található, ami xenograft modellen tanulmányozta volna a szer hatásait [99, 106, 109, 132, 133]. Általánosan elfogadott egérben alkalmazható mitotándózis hiányában, vizsgálatunkban a közölt mennyiségek átlagát választottuk (200mg/kg). Ezen túl a tanulmányok a mitotán eredményességéről is szinte ellentétes megállapításokat közöltek. Lindhe és mtsai leírták, hogy a mitotánnak tumorelles hatása van, ezzel szemben Doghman és mtsai egy hasonló kísérletben a hosszú távú mitotánkezelés hatástalanságát figyelték meg [106, 111]. Saját vizsgálatunkban a mitotán hatékonynak bizonyult a daganatnövekedés gátlásában.

Korábbi tanulmányaink folyamán *in silico* funkcionális genomikai útvonal analízis során a retinoid jelátvitel RXR receptoron keresztüli csökkenését azonosítottuk, mint fontos patomechanizmus mellékvesekéreg-carcinomában. Ennek kapcsán merült fel, hogy a receptor specifikus ligandjával, a 9-cisz retinsavval foglalkozzunk tovább, vizsgáljuk hatásait mellékvesekéreg-carcinomára. *In vitro* kísérleteinkben a 9-cisz retinsav idő és dózis függvényében csökkentette humán NCI-H295R mellékvesekéreg-carcinoma sejtek életképességét, és hormonszekrécióját, valamint jelentős génexpressziós változásokat is indukált. Ezután egy kis elemszámú *in vivo* pilóta kísérletben figyeltük meg a szer ígéretes hatását [59].

A retinoidok az A-vitamin természetes és szintetikus származékai, melyeknek a sejtzaporodásban, -differenciációban és halálban betöltött meghatározó szerepét korábban számos tanulmány közölte. Ezen család egyik tagja az RXR receptor specifikus

ligandjaként számontartott 9-cisz retinsav, melynek a sejtproliferáció és -differenciáció szabályozásán és az immunrendszer befolyásolásán túl tumorelles és antiproliferatív hatásai is jól ismertek [134]. Daganatokban betöltött szerepét számos tumorban leírták *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban is pl. gyomorrák sejtvonalon [135], fej-, nyakrák sejtvonalon [136], neuroblastoma [137], és mellrák [138] esetében is. Hatásait kihasználva alkalmazzák Kaposi-szarkóma [139], különböző bőr-, és hematológiai betegségek [140] kezelésére is.

A 9-cisz retinsav esetében kevés irodalmi adat áll rendelkezésre olyan *in vivo* kísérletekről, melyekben egér xenograftot használtak [137, 141–143], viszont az általunk választott dózis (5 mg/kg) összehasonlítható tartományban volt a közölt tanulmányokban használtakkal, valamint messze kisebb a leírt toxikus dózisonál (60mg/kg) [136].

Kezeléseink során mind a 9-cisz retinsav, mind a mitotánkezelés tumorelles hatását megfigyeltük. A tumortérfogatok mind a három kezelt csoportban alacsonyabbak voltak a kontroll csoporthoz képest, de ez a csökkenés csak a mitotán egyedül, valamint a mitotán és 9-cisz retinsavat kombináltan kapó csoportban volt szignifikáns. A három független patológus által meghatározott Ki-67 proliferációs index értéke viszont csak a 9-cisz retinsavat, és kombinált kezelést kapó csoportban csökkent szignifikánsan. Érdekes módon a tumortérfogatnál tapasztalt mitotán által kifejtett hatással ellentétben, a Ki-67 index tekintetében a szer itt nem ért el különösebb eredményt. Ezen jelenség háttere nem tisztázott. Nagy valószínűséggel a hatás, mellyel Ki-67 index csökkenést ér el, összefüggésben állhat a 9-cisz retinsav sejtekre gyakorolt differenciáló hatásával.

A megfigyelt tumornövekedésre, valamint proliferációra gyakorolt hatások mögött álló mechanizmusok tisztázása érdekében további molekuláris vizsgálatokat hajtottunk végre mind mRNS, mind fehérje szinten.

Korábbi *in vitro* NCI-H295R mellékvesekéreg-carcinoma sejtvonalon végzett kísérleteinkben megfigyeltük, hogy míg a 9-cisz retinsav kezelés jelentős génexpressziós eltéréseket indukált, hiszen több mint 2000 gén kifejeződését befolyásolta, addig a mitotán hatása jóval szerényebb volt, alig több mint 100 gén átíródását változtatta meg [5, 123]. A jelenlegi tanulmányunkban az *in vitro* tapasztalt változásokkal, valamint a kezelések hatására bekövetkező tumor méret és Ki-67 index csökkenésével ellentétben csak mérsékelt

génexpressziós eltéréseket találtunk. Microarray vizsgálattal 483 szignifikáns génváltozást találtunk. Az elemzést Benjamini-Hochberg False Discovery Rate-tel kiegészítve csupán kettő, eddig ismeretlen funkciójú transzkriptumot kaptunk. A 483 szignifikáns génváltozás közül irodalmi adatok, és kifejeződésbeli változások alapján kiválasztott 7 gén közül pedig csak kettőt sikerült szignifikánsan megváltozott kifejeződésűnek igazolnunk. Ez a két gén az *APOA4*, és *PDE4A* volt.

Az *APOA4*, mint az apolipoprotein család tagja, jól ismert 9-cisz retinsav célgén. Fontos szerepet tölt be a zsír- és glükózanyagcserében [144–146], antioxidáns [147, 148] és érlemeszesedés elleni [149] folyamatokban, de prediktív faktorként írták le gyulladással és bélbetegségben is [150, 151]. Új szérumbiomarkerként való felhasználhatóságát közölték petefészek-, méhnyakrák, ALL [152–155] esetében. Mindezek ellenére mellékvesekéreg-rákban betöltött szerepe eddig ismeretlen.

A *PDE4A*, mint a foszfodiészteráz család tagja és a cAMP-szint alapvető szabályozója [156] azon túl, hogy számos a sejt életében alapvető útvonal tagja, tumorok kialakulásában is szerepet játszik. Gátlásával számos tumorellenes hatást kapcsolnak össze, mint például agydaganatok regresszióját [157], csökkent proliferációt és angiogenezist tüdőrákban [158], csökkent sejtmotilitást, és tumorinváziót vastagbél- [159] és emlőráksejtvonalon [160], csökkent növekedést melanoma malignumban [161], antiproliferatív hatást hasnyálmirigysejteken [162]. Ezen megfigyelésekkel összhangban kísérletünkben a gén csökkent kifejeződését azonosítottuk kombinált kezelést kapó csoportban, így arra következtethetünk, hogy a *PDE4A* a mellékvesekéreg-rák kialakulásában, progressziójában is szerepet játszhat.

A talált mérsékelt génexpressziós elváltozások háttérében feltételezésünk szerint az áll, hogy a 28 napos, hosszú kezelési idő miatt már nem a génkifejeződésre gyakorolt mRNS-szintű változások domináltak a tumorellenes hatás háttérében. Ezért a csoportok fehérjemintázatát is elemeztük, mely során proteomikai elemzéssel 47 szignifikánsan megváltozott kifejeződésű fehérjét sikerült azonosítanunk a kezelt csoportokban a kontrollcsoporthoz képest. Ezek közül egyet választottunk ki Western blot módszerrel történő validálásra: a protein foszfatáz 2A inhibitor SET fehérjét. Ahogy számítottunk rá, a SET

kifejeződése a kezelések hatására csökkent, a kombinált csoportban a legalacsonyabb értéket mutatva.

A 47, kezelések hatására változó fehérje közül útvonalelemzésünk során több a mellékvesekéreg-rák patomechanizmusában jelentős szerepet betöltő Wnt- és p53-jelátviteli útvonalakban szerepel. A fehérjék között megtalálhatók még több, a karcinogenezisben szerepet játszó útvonal pl. EGF, FGF jelátvitel tagjai, proteoszómmával és riboszómmákkal kapcsolatos útvonalakban érintettek is.

A SET fehérje, mint a tumorszuppresszor PP2A gátlója, fontos szabályzó szerepet tölt be alapvető sejtszintű funkciókban, mint például a sejtciklus [128], sejthalál [163], sejt migráció [129]. Célpontjának köszönhetően befolyásolja a β -katenin [127], c-Myc [130] és Akt [131] útvonalakat, valamint az nm23-H1 gátlásával fokozza a metasztatikus képességet [164], így elősegítve a tumor progresszióját. A SET fokozott jelenlétét több tumortípusban is leírták, mint például Wilms-tumorban [165], akut lymphoblasztos leukémiában [166], CLL-ben, non-Hodgkin lymphomában [167], tüdő- [168], vastagbél- [169], hasnyálmirigy- [170], prosztata- [171] és petefészekrákban [172]. Legjobb tudásunk alapján a mi tanulmányunk az első, ami leírja lehetséges szerepét mellékvesekéreg-rákban.

Mellékvesekéreg-rák biológiájában betöltött szerepének igazolására egy próbakísérletben humán mellékvesekéreg szövetmintákban vizsgáltuk a SET kifejeződését. Western blot módszerrel normál és jóindulatú daganatmintákban nem, míg rosszindulatú mintákban a SET halvány expresszióját azonosítottuk. Természetesen ezen eredményt egy nagyobb elemszámú kísérletben tovább kell vizsgálni. E megfigyelés mindazonáltal párhuzamba állítható a xenograft eredményeinkkel, hiszen a magas SET-expresszió a kezelések hatására csökkent, és a humán daganatminták közül csak az ACC mintákban észleltünk kismértékű SET-expressziót. Mindezen eredményeink alapján a SET egy új szereplő lehet a mellékvesekéreg-rák biológiájában.

Az NCI-H295R xenograft modellben 9-cisz retinsav és mitotán kezelés a keringő *hsa-miR-483-5p*, az SW-13 és SJ-ACC3 modellben pedig az LEDP/M terápia az exoszómmális *hsa-miR-210* szintjét csökkentette szignifikánsan. Eredményeink tehát azt

sugallják, hogy ezen keringő mikroRNS-ek a jövőben alkalmassá válhatnak a tumorellenes kezelés monitorozására is.

A *hsa-miR-483-5p* a mellékvesekéreg-rákra jellemző mikroRNS-ek közül a legtöbbször említett, fokozott kifejeződése a tumor agresszívebb viselkedésével, rosszabb prognózisával jár együtt. Génje, a miR-483 a 11p15.5-ös kromoszómális régióban az *IGF2* második intronjában található [48], melynek jelentősen fokozott kifejeződése a mellékvesekéreg-rák szintén fontos kórjelzője. Onkogén szerepét más tumorok pl. máj-, emlő-, vastagbél-, tüdőrák esetén is leírták. Funkcióját a mai napig nem ismerjük pontosan, az irodalomban nemrég írták le, hogy képes serkenteni az epithelium mesenchymává alakulását (EMT), valamint fokozza a tüdő-adenocarcinomasejtek migrációját, ezzel fokozva annak áttétadó hajlamát [173]. A mikroRNS génjéről átíródott másik szál, a *hsa-miR-483-3p* célpontja ezzel szemben ismert, a PUMA tumorszuppresszor, melynek gátlásával fejt ki onkogén hatásait [174].

A *hsa-miR-210* fokozott kifejeződése, a *hsa-miR-483-5p*-hez hasonlóan szintén a mellékvesekéreg-rák agresszívebb viselkedésével és rosszabb prognózisával társul. Általánosságban megfigelhető, hogy kifejeződése nagyban függ a szövet oxigénellátottságától, míg normoxiás állapotokban szintje minimális, addig hypoxiás körülmények között kifejeződése a HIF-1 α transzkripciós faktor hatására nagyban emelkedik. Ezen tulajdonsága miatt a *hsa-miR-210*-et a hipoxiás állapotban fokozott kifejeződést mutató hipoxamir-ek közé sorolják. Célpontjai között szerepel például a sejtciklus szabályozásáért felelős E2F3 transzkripciós faktor, valamint emelkedett kifejeződése együtt jár a DNS-javítási mechanizmusok sérülésével, a genetikai instabilitás növekedésével, így elősegítve a sejtek fokozott proliferációját, genomjuk mutációját. Emelkedett szintjét számos daganatban, például gliómában, malignus melanomában, hasnyálmirigyrákban is leírták [174, 175].

Szöveti szinten a csoportok között a mikroRNS-ek szintje nem változott szignifikánsan. Mindezen adatokból arra következtethetünk, hogy a mikroRNS szöveti és keringő szintje egymástól függetlenül változik. Az irodalomban számos megfigyelés szól arról, hogy a mikroRNS-ek szöveti és keringő szintjei között nincs szoros kapcsolat:

párhuzamosan, ellentétesen, akár teljesen függetlenül is változhat kifejeződésük [176, 177]. Az e különbségek mögött fekvő molekuláris mechanizmusok egyelőre még ismeretlenek.

Összességében a 9-cisz retinsav, elsősorban a mitotánnal kombinálva, a mellékvesekéreg-rák hatékony kiegészítő kezelése lehet, ami a mitotánhoz képest kedvezőbb mellékhatásprofilját tekintve új távlatokat nyithatna a mellékvesekéreg-rák kezelésében. Ehhez a jövőben klinikai vizsgálat indítását tervezi munkacsoportunk.

A keringő *hsa-miR-483-5p*, mint a mellékvesekéreg-rák egyik potenciális biomarkere, valamint a *hsa-miR-210*, mint a szervezet egyik fő hipoxamirje a jövőben akár a kezelés monitorozására is alkalmassá válhat.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

Elsőként vizsgáltuk a 9-cisz retinsav tumorellenes hatását mellékvesekéreg-rák *in vivo*, preklinikai modelljén mind önmagában, mind mitotánnal kombinálva, mely során:

- A tumornövekedés jelentős lassulását tapasztaltuk mindhárom kezelésnek köszönhetően, azonban a kezelés végén csak a mitotánt, illetve a 9-cisz retinsavat és a mitotánt együttesen kapó csoportban mértünk szignifikánsan kisebb tumortérfogatot.
- Az immunhisztokémiai festéssel meghatározott és a mellékvesekéreg-carcinoma prognosztikájában jelentős Ki-67 proliferációs index szignifikánsan csökkent a 9-cisz retinsavat önmagában, illetve mitotánnal kombinált formában kapó csoportban.
- A molekuláris hatásmechanizmus felderítésére végzett génexpressziós vizsgálatokkal csekély számú, Benjamini-Hochberg False Discovery Rate alkalmazásával csupán kettő, kétséges biológiai jelentőségű gént azonosítottunk. A statisztikai elemzést Benjamini-Hochberg korrekció nélkül elvégezve 483 szignifikáns génváltozást találtunk.
- A génexpressziós eredményeink alapján kiválasztott 7 gén közül csupán a 9-cisz retinsav célgénként jól ismert *APOA4* felül, míg a számos rosszindulatú daganatban felülexpresszáldottnak leírt, a cAMP szint alapvető szabályzójaként számontartott *PDE4A* alulexpresszióját sikerült validálnunk a 9-cisz retinsavat és mitotánt együttesen kapó csoportban. Modellünkben mindezek alapján viszonylag csekély számú mRNS-szintű eltéréseket sikerült igazolnunk.
- Proteomikai elemzéssel a kontroll csoporthoz képest 47 szignifikáns fehérje eltérést találtunk a kezelésekre hatására, melyek közül irodalmi adatok alapján a protein foszfatáz 2A inhibitorát, a SET fehérjét választottuk ki további vizsgálatra. A szignifikáns fehérjékkel végrehajtott útvonalelemzésünk alapján, több a

mellékvesekéreg-rák patomechanizmusában érintett jelátviteli útvonalat, mint pl. a Wnt- és p53, ill. több a karcinogenezisben alapvető szerepet játszó útvonal pl. EGF, FGF jelátvitel tagját azonosítottuk.

- A proteomikai vizsgálatunk eredményének megfelelően a SET fehérje csökkent kifejeződését igazoltuk a 9-cisz retinsavat és 9-cisz retinsavat és mitotánt együttesen kapó csoportban, ami az utóbbiban elérte a szignifikancia szintjét. Humán mintákon végzett pilótakísérletünkben a SET halvány kifejeződését észleltük mellékvesekéreg-carcinoma szövetekben, míg jóindulatú adenomában, illetve normál mellékvese szövetben ezt nem azonosítottuk.
- A keringő mikroRNS-ek közül az NCI-H295R xenograft modellben a *hsa-miR-483-5p* kombinált kezelés, valamint a SJ-ACC3 és SW-13 xenograft modellekben a *hsa-miR-210* liposzomális kemoterápiás kezelés hatására való szignifikáns csökkenését azonosítottuk. Ezen eredményünk felveti ezen két mikroRNS nemcsak diagnosztikában, hanem kezelések monitorizálására való felhasználhatóságukat is.

VIII. ÖSSZEFOGLALÁS

A mellékvesekéreg-rák egy ritka, agresszív daganat. Jelenlegi gyógyszeres kezelési lehetőségei rendkívül korlátozottak, ezért nagy szükség lenne új, hatékony gyógyszeres kezelési eljárások kifejlesztésére. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján jelen munkám során egy nagy elemszámú H295R xenograft modellen a 9-cisz retinsav, a mitotán, valamint e két szer kombinációjának tumorellenes hatását vizsgáltam mellékvesekéreg-rák modellben. Ezen túl elemeztem a keringő mikroRNS-ek kezelés hatására esetlegesen megváltozó kifejeződését is.

A kezelések során, illetve végén szignifikánsan kisebb tumor növekedést és térfogatot azonosítottam a mitotán, valamint 9-cisz retinsav és mitotán kezelést együttesen kapó csoportokban. Az immunhisztokémiával meghatározott Ki-67 index a 9-cisz retinsavat, illetve a kombinált terápiát kapó csoportban volt szignifikánsan alacsonyabb, utóbbiban a legkisebb. Érdekes módon a tumor növekedést gátló hatása ellenére a mitotán a Ki-67 indexet nem csökkentette. A molekuláris patomechanizmus vizsgálata során, microarray, valamint qRT-PCR módszerrel azonosítottam két szignifikánsan változó gént, az *APOA4*-et, valamint a *PDE4A*-t. Fehérje szinten 47 szignifikáns fehérje eltérést találtam a kezelt és kontroll csoport között, melyek közül irodalmi adatok alapján a SET fehérjét kiválasztva Western blot módszerrel kombinált kezelésben szignifikánsan csökkent szintűnek azonosítottam, így felvetve a SET fehérje lehetséges szerepét a mellékvesekéreg-rák patomechanizmusában.

A keringő mikroRNS-ek kifejeződésének vizsgálatát három különböző xenograft modellen végeztem el, mely során H295R modell esetében a kombináltan kezelt csoportban a keringő *hsa-miR-483-5p*, az SW13 és SJ-ACC3 modellen pedig az LEDP/M kezelt egerekben az exoszómális *hsa-miR-210* szintjének szignifikáns csökkenését azonosítottam.

Doktori tanulmányaim alatt végzett munkám következtetéseként elmondható, hogy a 9-cisz retinsav egy lehetséges kiegészítő szer lehet a mellékvesekéreg-rák kezelésében, valamint a keringő mikroRNS-ek a jövőben nemcsak diagnosztizálásra, hanem kezelés monitorozására is felhasználhatóak lesznek.

IX. SUMMARY

Adrenocortical cancer is a rare, aggressive tumor. Its current drug treatment options are rather limited, thus new therapeutic agents are needed. Based on the former results of our research group, I investigated the antitumoral effects of 9-cis retinoic acid, mitotane and their combination on adrenocortical cancer in a large-scale xenograft model. Furthermore I studied the changes in circulating microRNAs expression due to different treatment regimens.

Significantly slower tumor growth and smaller tumor volumes were observed in the mitotane and mitotane plus 9-cis retinoic acid treated groups compared to control. By immunohistochemical analysis, the Ki-67 proliferation index was significantly smaller in groups receiving 9-cis retinoic acid and the combined treatment. Interestingly, despite the efficient tumor volume reducing effect, mitotane had no influence on the Ki-67 index. To explore the molecular pathomechanism, microarray and qRT-PCR were performed, but only two genes, *APOA4* and *PDE4A* were found to be significantly affected. By proteomic analysis, 47 significant protein changes were found among the treatment groups. By Western blotting, the expression of the protein SET was found to be significantly decreased in the combined treated group raising the potential relevance of SET in adrenocortical tumorigenesis.

The investigation of circulating microRNA expression was performed on three xenograft models: in the NCI-H295R model, the expression of circulating *hsa-miR-483-5p* - by combined treatment -, in SW13 and SJ-ACC3 models the expression of exosomal *hsa-miR-210* - by LEDP/M treatment - was significantly decreased.

In conclusion, 9-cis retinoic acid might be a possible new additional agent in the treatment of adrenocortical cancer, and circulating microRNAs might be for adrenocortical cancer treatment monitoring in the future.

X. IRODALOMJEGYZÉK

1. Igaz P, Tombol Z, Szabo P, Liko I, Racz K. (2008) Steroid Biosynthesis Inhibitors in the Therapy of Hypercortisolism: Theory and Practice. *Curr Med Chem*, 15: 2734–2747.
2. 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, Wilink H, Sender M, Edgerly M, Kenn W, Fojo T, Müller H-H, Skogseid B. (2012) Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*, 366: 2189–97.
3. Else T, Williams AR, Sabolch A, Jolly S, Miller BS, Hammer GD. (2014) Adjuvant therapies and patient and tumor characteristics associated with survival of adult patients with adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 99: 455–61.
4. Szabó PM, Tamási V, Molnár V, Andrásfalvy M, Tömböl Z, Farkas R, Kövesdi K, Patócs A, Tóth M, Szalai C, Falus A, Rác K, Igaz P. (2010) Meta-analysis of adrenocortical tumour genomics data: novel pathogenic pathways revealed. *Oncogene*, 29: 3163–72.
5. Szabó DR, Baghy K, Szabó PM, Zsippai A, Marczell I, Nagy Z, Varga V, Éder K, Tóth S, Buzás EI, Falus A, Kovalszky I, Patócs A, Rác K, Igaz P. (2014) Antitumoral effects of 9-cis retinoic acid in adrenocortical cancer. *Cell Mol life Sci*, 71: 917–32.
6. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. (2013) Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 98: 4551–64.
7. Ronchi CL, Kroiss M, Sbiera S, Deutschbein T, Fassnacht M. (2014) EJE prize 2014: current and evolving treatment options in adrenocortical carcinoma: where do we stand and where do we want to go? *Eur J Endocrinol*, 171: R1–R11.
8. Libé R. (2015) Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis , prognosis , and treatment. 3: 1–8.
9. Else T, Kim AC, Sabolch A, Raymond VM, Kandathil A, Caoili EM, Jolly S, Miller BS, Giordano TJ, Hammer GD. (2014) Adrenocortical Carcinoma. *Endocr Rev*, 35: 282–326.
10. Fay AP, Elfiky A, Teló GH, McKay RR, Kaymakcalan M, Nguyen PL, Vaidya A, Ruan DT, Bellmunt J, Choueiri TK. (2014) Adrenocortical carcinoma: The management of metastatic disease. *Crit Rev Oncol Hematol*.
11. Pianovski MAD, Maluf EMCP, de Carvalho DS, Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Boffetta P, Zancanella P, Figueiredo BC. (2006) Mortality rate of adrenocortical

- tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. *Pediatr Blood Cancer*, 47: 56–60.
12. Custodio G, Parise GA, Kiesel Filho N, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, Grisa L, Parise IZS, Pianovski MAD, Fiori CMCM, Ledesma JA, Barbosa JRS, Figueiredo FRO, Sade ER, Ibanez H, Arram SBI, Stinghen ST, Mengarelli LR, Figueiredo MMO, Carvalho DC, Avilla SGA, Woiski TD, Poncio LC, Lima GFR, Pontarolo R, Lalli E, Zhou Y, Zambetti GP, Ribeiro RC, Figueiredo BC. (2013) Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol*, 31: 2619–2626.
 13. Fassnacht M, Allolio B. (2009) Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23: 273–289.
 14. Creemers SG, Hofland L, Korpershoek E, Franssen GJ., van Kemenade FJ, de Herder WW, Feelders RA. (2015) Future directions in the diagnosis and medical treatment of adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, ERC-15-0452.
 15. Chow WH, Hsing AW, McLaughlin JK, Fraumeni JFJ. (1996) Smoking and adrenal cancer mortality among United States veterans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5: 79–80.
 16. Hsing AW, Nam JM, Co Chien HT, McLaughlin JK, Fraumeni JFJ. (1996) Risk factors for adrenal cancer: an exploratory study. *Int J Cancer*, 65: 432–436.
 17. Igaz P, Wiener Z, Szabo P, Falus A, Gaillard RC, Horanyi J, Racz 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.
 18. Szabó D, Zsippai A, Bendes M, Tömböl Z, Szabó PM, Rácz K, Igaz P. (2010) Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Orv Hetil*, 151: 1163–1170.
 19. Bertherat J, Bertagna X. (2009) Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23: 261–271.
 20. Soon PSH, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. (2008) Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *Oncologist*, 13: 548–561.
 21. Lehmann T, Wrzesinski T. (2012) The molecular basis of adrenocortical cancer. *Cancer Genet*, 205: 131–7.
 22. Assié G, Letouzé E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, Omeiri H, Rodriguez S, Perlemoine K, René-Corail F, Elarouci N, Sbiera S, Kroiss M, Allolio B, Waldmann J, Quinkler M, Mannelli M, Mantero F, Papatomas T, De Krijger R, Tabarin A, Kerlan V, Baudin E, Tissier F, Dousset B, Groussin L, Amar L, Clauser E, Bertagna X, Ragazzon B, Beuschlein F, Libé R, de Reyniès A, Bertherat J. (2014) Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet*, 46: 607–612.
 23. Bertagna X. (2014) Genetics of adrenal diseases in 2014: Genetics improves

- understanding of adrenocortical tumours. *Nat Rev Endocrinol*, 11: 77–78.
24. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, Magarey CJ, Russell CFJ, Schulte K-M, Röher H-D, Delbridge L, Robinson BG. (2002) Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 3467–74.
 25. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Hoog A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C, Backdahl M. (1996) Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res*, 56: 4219–4223.
 26. 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 Res*, 61: 6762–6767.
 27. Barreau O, De Reynies A, Wilmot-Roussel H, Guillaud-Bataille M, Auzan C, René-Corail F, Tissier F, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J, Clauser E, Assié G. (2012) Clinical and pathophysiological implications of chromosomal alterations in adrenocortical tumors: An integrated genomic approach. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: 301–311.
 28. Juhlin CC, Goh G, Healy JM, Fonseca AL, Scholl UI, Stenman A, Kunstman JW, Brown TC, Overton JD, Mane SM, Nelson-Williams C, Backdahl M, Suttorp A-C, Haase M, Choi M, Schlessinger J, Rimm DL, Hoog A, Prasad ML, Korah R, Larsson C, Lifton RP, Carling T. (2015) Whole-exome sequencing characterizes the landscape of somatic mutations and copy number alterations in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 100: E493-502.
 29. Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, Moffitt RA, Danilova L, Murray BA, Lerario AM, Else T, Knijnenburg TA, Ciriello G, Kim S, Assie G, Morozova O, Akbani R, Shih J, Hoadley KA, Choueiri TK, Waldmann J, Mete O, Robertson AG, Wu H-T, Raphael BJ, Shao L, Meyerson M, Demeure MJ, Beuschlein F, Gill AJ, Sidhu SB, Almeida MQ, Fragoso MCBV, Cope LM, Kebebew E, Habra MA, Whitsett TG, Bussey KJ, Rainey WE, Asa SL, Bertherat J, Fassnacht M, Wheeler DA, Hammer GD, Giordano TJ, Verhaak RGW. (2016) Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell*, 29: 723–736.
 30. 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.
 31. Soon PSH, Gill AJ, Benn DE, Clarkson A, Robinson BG, McDonald KL, Sidhu SB. (2009) Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer*, 16: 573–583.

32. 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.
33. Laurell C, Velazquez-Fernandez D, Lindsten K, Juhlin C, Enberg U, Geli J, Hoog A, Kjellman M, Lundeberg J, Hamberger B, Larsson C, Nilsson P, Backdahl M. (2009) Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol*, 161: 141–152.
34. Tömböl Z, Szabó PM, Molnár V, Wiener Z, Tölgyesi G, Horányi J, Riesz P, Reismann P, Patócs A, Likó I, Gaillard R-C, Falus A, Rác 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.
35. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JMG, Hanash SM. (2003) Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol*, 162: 521–531.
36. West AN, Neale G a., Pounds S, Figueredo BC, Rodriguez Galindo C, Pianovski MAD, Oliveira Filho AG, Malkin D, Lalli E, Ribeiro R, Zambetti GP. (2007) Gene Expression Profiling of Childhood Adrenocortical Tumors. *Cancer Res*, 67: 600–608.
37. De Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Moigne G Le, 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*, 90: 1819–1829.
38. Velazquez-Fernandez D, Laurell C, Geli J, Hoog A, Odeberg J, Kjellman M, Lundeberg J, Hamberger B, Nilsson P, Backdahl M. (2005) Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery*, 138: 1087–1094.
39. Ragazzon B, Libé R, Gaujoux S, Assié G, Fratticci A, Launay P, Clauser E, Bertagna X, Tissier F, De Reyniès A, Bertherat J. (2010) Transcriptome analysis reveals that p53 and β -catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. *Cancer Res*, 70: 8276–8281.
40. Barreau O, Assié G, Wilmot-Roussel H, Ragazzon B, Baudry C, Perlemoine K, René-Corail F, Bertagna X, Dousset B, Hamzaoui N, Tissier F, de Reyniès A, Bertherat J. (2013) Identification of a CpG Island Methylator Phenotype in Adrenocortical Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 98: E174–E184.
41. Rechache N, Wang Y, Stevenson H, Killian J, Edelman D, Merino M, Zhang L, Nilubol N, Stratakis C, Meltzer P, Kebebew E. (2012) DNA Methylation Profiling

- Identifies Global Methylation Differences and Markers of Adrenocortical Tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: E1004-13.
42. Legendre CR, Demeure MJ, Whitsett TG, Gooden GC, Bussey KJ, Jung S, Waibhav T, Kim S, Salhia B. (2016) Pathway Implications of Aberrant Global Methylation in Adrenocortical Cancer. *PLoS One*, 11: e0150629.
 43. Muljo SA, Kanellopoulou C, Aravind L. MicroRNA targeting in mammalian genomes: genes and mechanisms. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2: 148–61.
 44. Igaz P, Igaz I, Nagy Z, Nyíró G, Szabó PM, Falus A, Patócs A, Rác K. (2014) MicroRNAs in adrenal tumors: relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Cell Mol Life Sci*, 72: 417–428.
 45. Özata DM, Caramuta S, Velázquez-Fernández D, Akçakaya P, Xie H, Höög A, Zedenius J, Bäckdahl M, Larsson C, Lui W-O. (2011) The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*, 18: 643–55.
 46. Wang C, Sun Y, Wu H, Zhao D, Chen J. (2014) Distinguishing adrenal cortical carcinomas and adenomas: A study of clinicopathological features and biomarkers. *Histopathology*, 64: 567–576.
 47. Soon PSH, 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.
 48. 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: 1630–9.
 49. Szabó PM, Butz H, Igaz P, Rác K, Hunyady L, Patócs A. (2013) Minireview: miRomics in endocrinology: a novel approach for modeling endocrine diseases. *Mol Endocrinol*, 27: 573–85.
 50. Schmitz KJ, Helwig J, Bertram S, Sheu SY, Suttorp a C, 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: 529–35.
 51. Kumar Gara S, Wang Y, Patel D, Liu-Chittenden Y, Jain M, Boufraquech M, Zhang L, Meltzer PS, Kebebew E. (2015) Integrated genome-wide analysis of genomic changes and gene regulation in human adrenocortical tissue samples. *Nucleic Acids Res*, 43: 9327–9339.
 52. Velázquez-Fernández D, Caramuta S, Özata DM, Lu M, Höög A, Bäckdahl M, Larsson C, Lui WO, Zedenius J. (2014) MicroRNA expression patterns associated with hyperfunctioning and non-hyperfunctioning phenotypes in adrenocortical adenomas. *Eur J Endocrinol*, 170: 583–591.

53. Duregon E, Rapa I, Votta A, Giorcelli J, Daffara F, Terzolo M, Scagliotti G V., Volante M, Papotti M. (2014) MicroRNA expression patterns in adrenocortical carcinoma variants and clinical pathologic correlations. *Hum Pathol*, 45: 1555–1562.
54. Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, Zhao W, Peralta-Del Valle MHC, Figueiredo BC, Zambetti GP, Lalli E. (2010) Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by MicroRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res*, 70: 4666–4675.
55. Chabre O, Libe R, Assie G, Barreau O, Bertherat J, Bertagna X, Feige JJ, Cherradi N. (2013) Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr Relat Cancer*, 20: 579–594.
56. Robertson S, Mackenzie SM, Alvarez-Madrazo S, Diver LA, Lin J, Stewart PM, Fraser R, Connell JM, Davies E. (2013) MicroRNA-24 is a novel regulator of aldosterone and cortisol production in the human adrenal cortex. *Hypertension*, 62: 572–578.
57. Brun P, Yang KJZ, Lee S, Yuen JJ, Blaner WS. (2013) Retinoids: Potent regulators of metabolism. *BioFactors*, 39: 151–163.
58. Rhinn M, Dolle P. (2012) Retinoic acid signalling during development. *Development*, 139: 843–858.
59. Szabó DR, Baghy K, Szabó PM, Zsippai A, Marczell I, Nagy Z, Varga V, Éder K, Tóth S, Buzás EI, Falus A, Kovalszky I, Patócs A, Rácz K, Igaz P. (2014) Antitumoral effects of 9-cis retinoic acid in adrenocortical cancer. *Cell Mol life Sci*, 71: 917–32.
60. Sharma N, Herts BR. (2014) Adrenocortical carcinoma presenting with Cushing syndrome. *J Urol*, 191: 800–1.
61. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, Bonnin A, Brigaire H. (1990) Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med*, 322: 1195–1201.
62. Chowdhury PS, Nayak P, Gurumurthy S, David D. (2014) Aldosterone and cortisol co-secreting bifunctional adrenal cortical carcinoma: A rare event. *Indian J Urol*, 30: 339–341.
63. Griffin AC, Kelz R, LiVolsi VA. (2014) Aldosterone-secreting adrenal cortical carcinoma. A case report and review of the literature. *Endocr Pathol*, 25: 344–349.
64. Uruc F, Urkmez A, Yuksel OH, Sahin A, Verit A. (2015) Androgen secreting giant adrenocortical carcinoma with no metastases: A case report and review of the literature. *Can Urol Assoc J = J l'Association des Urol du Canada*, 9: E644-7.
65. 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. *Endocr Relat Cancer*, 12: 149–159.
66. Zini L, Porphiglia F, Fassnacht M. (2011) Contemporary management of adrenocortical carcinoma. *Eur Urol*, 60: 1055–65.
 67. Egbert N, Elsayes KM, Azar S, Caoili EM. (2010) Computed tomography of adrenocortical carcinoma containing macroscopic fat. *Cancer Imaging*, 10: 198–200.
 68. Bharwani N, Rockall AG, Sahdev A, Gueorguiev M, Drake W, Grossman AB, Reznick RH. (2011) Adrenocortical carcinoma: the range of appearances on CT and MRI. *AJR Am J Roentgenol*, 196: W706-14.
 69. Sundin A. (2012) Imaging of adrenal masses with emphasis on adrenocortical tumors. *Theranostics*, 2: 516–522.
 70. Hahner S, Sundin A. (2011) Metomidate-based imaging of adrenal masses. *Horm Cancer*, 2: 348–353.
 71. Weiss LM. (1984) Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*, 8: 163–169.
 72. Medeiros LJ, Weiss LM. (1992) New developments in the pathologic diagnosis of adrenal cortical neoplasms. A review. *Am J Clin Pathol*, 97: 73–83.
 73. Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. (1982) Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 6: 655–663.
 74. Tissier F, Aubert S, Leteurtre E, Al Ghuzlan A, Patey M, Decaussin M, Doucet L, Gobet F, Hoang C, Mazerolles C, Monges G, Renaudin K, Sturm N, Trouette H, Vacher-Lavenu M-C, Viallon V, Baudin E, Bertagna X, Coste J, Libe R. (2012) Adrenocortical tumors: improving the practice of the Weiss system through virtual microscopy: a National Program of the French Network INCa-COMETE. *Am J Surg Pathol*, 36: 1194–1201.
 75. Papathomas TG, Pucci E, Giordano TJ, Lu H, Duregon E, Volante M, Papotti M, Lloyd R V, Tischler AS, van Nederveen FH, Nose V, Erickson L, Mete O, Asa SL, Turchini J, Gill AJ, Matias-Guiu X, Skordilis K, Stephenson TJ, Tissier F, Feelders RA, Smid M, Nigg A, Korpershoek E, van der Spek PJ, Dinjens WNM, Stubbs AP, de Krijger RR. (2016) An International Ki67 Reproducibility Study in Adrenal Cortical Carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 40: 569–576.
 76. Beuschlein F, Weigel J, Saeger W, Kroiss M, Wild V, Daffara F, Libe R, Ardito A, Al Ghuzlan A, Quinkler M, Osswald A, Ronchi CL, de Krijger R, Feelders RA, Waldmann J, Willenberg HS, Deutschbein T, Stell A, Reincke M, Papotti M, Baudin E, Tissier F, Haak HR, Loli P, Terzolo M, Allolio B, Muller H-H, Fassnacht M. (2015) Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection. *J Clin Endocrinol Metab*, 100: 841–849.
 77. Libe R, Borget I, Ronchi CL, Zaggia B, Kroiss M, Kerkhofs T, Bertherat J, Volante M, Quinkler M, Chabre O, Bala M, Tabarin A, Beuschlein F, Vezzosi D,

- Deutschbein T, Borson-Chazot F, Hermsen I, Stell A, Fottner C, Leboulleux S, Hahner S, Mannelli M, Berruti A, Haak H, Terzolo M, Fassnacht M, Baudin E. (2015) Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. *Ann Oncol*, 26: 2119–2125.
78. Fassnacht M, Wittekind C, Allolio B. (2010) Aktuelle TNM-Klassifikationssysteme für das Nebennierenkarzinom. *Pathologe*, 31: 374–378.
79. Lughezzani G, Sun M, Perrotte P, Jeldres C, Alasker A, Isbarn H, Budaus L, Shariat SF, Guazzoni G, Montorsi F, Karakiewicz PI. (2010) The European Network for the Study of Adrenal Tumors staging system is prognostically superior to the international union against cancer-staging system: a North American validation. *Eur J Cancer*, 46: 713–719.
80. Bellantone R, Lombardi CP, Raffaelli M. (2015) What is the appropriate role of minimally invasive vs. open surgery for small adrenocortical cancers? *Curr Opin Oncol*, 27: 44–49.
81. Terzolo M, Zaggia B, Allasino B, De Francia S. (2014) Practical treatment using mitotane for adrenocortical carcinoma. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 21: 159–165.
82. Sbiera S, Leich E, Liebisch G, Sbiera I, Schirbel A, Wiemer L, Matysik S, Eckhardt C, Gardill F, Gehl A, Kendl S, Weigand I, Bala M, Ronchi CL, Deutschbein T, Schmitz G, Rosenwald A, Allolio B, Fassnacht M, Kroiss M. (2015) Mitotane inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 triggering lipid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis in adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology*, 156: 3895–908.
83. Sperone P, Ferrero A, Daffara F, Priola A, Zaggia B, Volante M, Santini D, Vincenzi B, Badalamenti G, Intrivici C, Del Buono S, De Francia S, Kalomirakis E, Ratti R, Angeli A, Dogliotti L, Papotti M, Terzolo M, Berruti A. (2010) Gemcitabine plus metronomic 5-fluorouracil or capecitabine as a second-/third-line chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma: a multicenter phase II study. *Endocr Relat Cancer*, 17: 445–453.
84. Berruti A, Sperone P, Ferrero A, Germano A, Ardito A, Priola AM, De Francia S, Volante M, Daffara F, Generali D, Leboulleux S, Perotti P, Baudin E, Papotti M, Terzolo M. (2012) Phase II study of weekly paclitaxel and sorafenib as second/third-line therapy in patients with adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol*, 166: 451–458.
85. Kroiss M, Quinkler M, Johanssen S, Erp NP van, Lankheet N, Pöllinger A, Laubner K, Strasburger CJ, Hahner S, Müller H-H, Allolio B, Fassnacht M, van Erp NP, Lankheet N, Pöllinger A, Laubner K, Strasburger CJ, Hahner S, Müller H-H, Allolio B, Fassnacht M. (2012) Sunitinib in Refractory Adrenocortical Carcinoma: A Phase II, Single-Arm, Open-Label Trial. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: 3495–503.

86. Haluska P, Worden F, Olmos D, Yin D, Schteingart D, Batzel GN, Paccagnella ML, de Bono JS, Gualberto A, Hammer GD. (2010) Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*, 65: 765–773.
87. Fassnacht M, Berruti A, Baudin E, Demeure MJ, Gilbert J, Haak H, Kroiss M, Quinn DI, Hesseltine E, Ronchi CL, Terzolo M, Choueiri TK, Poondru S, Fleege T, Rorig R, Chen J, Stephens AW, Worden F, Hammer GD. (2015) Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet Oncol*, 16: 426–435.
88. Quinkler M, Hahner S, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Ritter C, Strasburger C, Allolio B, Fassnacht M. (2008) Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab*, 93: 2057–2062.
89. Kroiss M, Reuss M, Kuhner D, Johanssen S, Beyer M, Zink M, Hartmann MF, Dhir V, Wudy SA, Arlt W, Sbiera S, Allolio B, Fassnacht M. (2011) Sunitinib Inhibits Cell Proliferation and Alters Steroidogenesis by Down-Regulation of HSD3B2 in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2: 27.
90. Naing A, Kurzrock R, Burger A, Gupta S, Lei X, Busaidy N, Hong D, Chen HX, Doyle LA, Heilbrun LK, Rohren E, Ng C, Chandhasin C, LoRusso P. (2011) Phase I trial of cixutumumab combined with temsirolimus in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, 17: 6052–6060.
91. Rygaard J, Povlsen CO. (1969) Heterotransplantation of a human malignant tumour to “Nude” mice. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 77: 758–60.
92. Johnson JI, Decker S, Zaharevitz D, Rubinstein L V, Venditti JM, Schepartz S, Kalyandrug S, Christian M, Arbuck S, Hollingshead M, Sausville EA. (2001) Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. *Br J Cancer*, 84: 1424–1431.
93. Hoffman RM. (1999) Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation: a bridge to the clinic. *Invest New Drugs*, 17: 343–359.
94. Hantel C, Beuschlein F. (2016) Xenograft models for adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*, 421: 28–33.
95. Leibovitz A, McCombs WM 3rd, Johnston D, McCoy CE, Stinson JC. (1973) New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex. *J Natl Cancer Inst*, 51: 691–697.
96. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca R V. (1990) Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res*, 50: 5488–5496.
97. Pinto EM, Morton C, Rodriguez-Galindo C, McGregor L, Davidoff AM, Mercer K,

- Debelenko L V, Billups C, Ribeiro RC, Zambetti GP. (2013) Establishment and characterization of the first pediatric adrenocortical carcinoma xenograft model identifies topotecan as a potential chemotherapeutic agent. *Clin Cancer Res*, 19: 1740–1747.
98. Barlaskar FM, Spalding AC, Heaton JH, Kuick R, Kim AC, Thomas DG, Giordano TJ, Ben-Josef E, Hammer GD. (2009) Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 204–212.
 99. Lindhe Ö, Skogseid B. (2010) Mitotane Effects in a H295R Xenograft Model of Adjuvant Treatment of Adrenocortical Cancer. *Horm Metab Res*, 42: 725–730.
 100. Luconi M, Mangoni M, Gelmini S, Poli G, Nesi G, Francalanci M, Pratesi N, Cantini G, Lombardi A, Pepi M, Ercolino T, Serio M, Orlando C, Mannelli M. (2010) Rosiglitazone impairs proliferation of human adrenocortical cancer: preclinical study in a xenograft mouse model. *Endocr Relat Cancer*, 17: 169–77.
 101. Demeure MJ, Stephan E, Sinari S, Mount D, Gately S, Gonzales P, Hostetter G, Komorowski R, Kiefer J, Grant CS, Han H, Von Hoff DD, Bussey KJ. (2012) Preclinical investigation of nanoparticle albumin-bound paclitaxel as a potential treatment for adrenocortical cancer. *Ann Surg*, 255: 140–6.
 102. Doghman M, Lalli E. (2012) Efficacy of the novel dual PI3-kinase/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in a preclinical model of adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*, 364: 101–4.
 103. Jain M, Zhang L, He M, Patterson EE, Nilubol N, Fojo AT, Joshi B, Puri R, Kebebew E. (2012) Interleukin-13 receptor alpha2 is a novel therapeutic target for human adrenocortical carcinoma. *Cancer*, 118: 5698–708.
 104. Mariniello B, Rosato A, Zuccolotto G, Rubin B, Cicala MV, Finco I, Iacobone M, Frigo AC, Fassina A, Pezzani R, Mantero F. (2012) Combination of sorafenib and everolimus impacts therapeutically on adrenocortical tumor models. *Endocr Relat Cancer*, 19: 527–39.
 105. Gaujoux S, Hantel C, Launay P, Bonnet S, Perlemoine K, Lefèvre L, Guillaud-Bataille M, Beuschlein F, Tissier F, Bertherat J, Rizk-Rabin M, Ragazzon B. (2013) Silencing Mutated β -Catenin Inhibits Cell Proliferation and Stimulates Apoptosis in the Adrenocortical Cancer Cell Line H295R. *PLoS One*, 8: 1–5.
 106. Doghman M, Lalli E. (2013) Lack of long-lasting effects of mitotane adjuvant therapy in a mouse xenograft model of adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*, 381: 66–9.
 107. Chimento A, Sirianni R, Casaburi I, Zolea F, Rizza P, Avena P, Malivindi R, De Luca A, Campana C, Martire E, Domanico F, Fallo F, Carpinelli G, Cerquetti L, Amendola D, Stigliano A, Pezzi V. (2015) GPER agonist G-1 decreases adrenocortical carcinoma (ACC) cell growth in vitro and in vivo. *Oncotarget*, 6:

19190–203.

108. Satoh K, Zhang L, Zhang Y, Chelluri R, Boufraquech M, Nilubol N, Patel D, Shen M, Kebebew E. (2016) Identification of Niclosamide as a Novel Anticancer Agent for Adrenocortical Carcinoma. *Clin Cancer Res*, 22: 3458–3466.
109. Hantel C, Jung S, Mussack T, Reincke M, Beuschlein F. (2014) Liposomal polychemotherapy improves adrenocortical carcinoma treatment in a preclinical rodent model. *Endocr Relat Cancer*, 21: 383–394.
110. Beuschlein F, Jakoby J, Mentz S, Zambetti G, Jung S, Reincke M, Süss R, Hantel C. (2016) IGF1-R inhibition and liposomal doxorubicin: progress in preclinical evaluation for the treatment of adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*.
111. Lindhe O, Skogseid B. (2010) Mitotane effects in a H295R xenograft model of adjuvant treatment of adrenocortical cancer. *Horm Metab Res*, 42: 725–30.
112. Klopffleisch R, Weiss ATA, Gruber AD. (2011) Excavation of a buried treasure - DNA, mRNA, miRNA and protein analysis in formalin fixed, paraffin embedded tissues. *Histol Histopathol*, 26: 797–810.
113. Halkova T, Cuperkova R, Minarik M, Benesova L. (2015) MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Involvement in Carcinogenesis and Potential Use for Diagnosis and Prognosis. *Gastroenterol Res Pract*, 2015: 1–11.
114. Wen X, Deng F, Wang J. (2014) MicroRNAs as predictive biomarkers and therapeutic targets in prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol*, 2: 219–230.
115. Vescovo V Del. (2014) MicroRNAs as lung cancer biomarkers. *World J Clin Oncol*, 5: 604.
116. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. (2010) The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids *METHODS* : 1741: 1733–1741.
117. Nagy Z, Igaz P. (2015) Introduction to microRNAs: Biogenesis, Action, Relevance of Tissue microRNAs in Disease Pathogenesis, Diagnosis and Therapy-The Concept of Circulating microRNAs. *EXS*, 106: 3–30.
118. Igaz P, Nagy Z, Vásárhelyi B, Buzás E, Falus A, Rácz K. (2012) [Potential role for microRNAs in inter-individual and inter-species communication]. *Orv Hetil*, 153: 1647–50.
119. Larrea E, Sole C, Manterola L, Goicoechea I, Armesto M, Arestin M, Caffarel MM, Araujo AM, Araiz M, Fernandez-Mercado M, Lawrie CH. (2016) New concepts in cancer biomarkers: Circulating miRNAs in liquid biopsies. *Int J Mol Sci*. doi: 10.3390/ijms17050627
120. Butz H, Patócs A. Technical Aspects Related to the Analysis of Circulating microRNAs. In: Igaz P (ed). Springer Basel, Basel, pp 55–71

121. Szabó DR, Luconi M, Szabó PM, Tóth M, Szücs N, Horányi J, Nagy Z, Mannelli M, Patócs A, Rácz K, Igaz P. (2014) Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors. *Lab Investig*, 94: 331–9.
122. Patel D, Boufrajech M, Jain M, Zhang L, He M, Gesuwan K, Gulati N, Nilubol N, Fojo T, Kebebew E. (2013) MiR-34a and miR-483-5p are candidate serum biomarkers for adrenocortical tumors. *Surgery*, 154: 1224–8.
123. Zsippai A, Szabó DR, Tömböl Z, 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 NCI-H295R: a microarray study. *Pharmacogenomics*, 13: 1351–1361.
124. Cheng W-C, Chang C-W, Chen C-R, Tsai M-L, Shu W-Y, Li C-Y, Hsu IC. (2011) Identification of reference genes across physiological states for qRT-PCR through microarray meta-analysis. *PLoS One*, 6: e17347.
125. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25: 402–8.
126. Guan S, Price JC, Prusiner SB, Ghaemmaghami S, Burlingame a. L. (2011) A Data Processing Pipeline for Mammalian Proteome Dynamics Studies Using Stable Isotope Metabolic Labeling. *Mol Cell Proteomics*, 10: M111.010728-M111.010728.
127. Götz J, Probst A, Mistl C, Nitsch RM, Ehler E. (2000) Distinct role of protein phosphatase 2A subunit C α in the regulation of E-cadherin and β -catenin during development. *Mech Dev*, 93: 83–93.
128. Canela N, Rodriguez-Vilarrupla A, Estanyol JM, Diaz C, Pujol MJ, Agell N, Bachs O. (2003) The SET protein regulates G2/M transition by modulating cyclin B-cyclin-dependent kinase 1 activity. *J Biol Chem*, 278: 1158–1164.
129. Ten Klooster JP, Leeuwen I v, Scheres N, Anthony EC, Hordijk PL. (2007) Rac1-induced cell migration requires membrane recruitment of the nuclear oncogene SET. *EMBO J*, 26: 336–345.
130. Arnold HK, Sears RC. (2008) A tumor suppressor role for PP2A-B56alpha through negative regulation of c-Myc and other key oncoproteins. *Cancer Metastasis Rev*, 27: 147–158.
131. Leopoldino AM, Squarize CH, Garcia CB, Almeida LO, Pestana CR, Polizello ACM, Uyemura S a., Tajara EH, Gutkind JS, Curti C. (2012) Accumulation of the SET protein in HEK293T cells and mild oxidative stress: Cell survival or death signaling. *Mol Cell Biochem*, 363: 65–74.
132. Stacpoole PW, Varnado CE, Island DP. (1982) Stimulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase activity by o,p'-DDD. *Biochem Pharmacol*, 31: 857–860.

133. Arenas C, Melián C, Pérez-Alenza MD. (2014) Long-term survival of dogs with adrenal-dependent hyperadrenocorticism: A comparison between mitotane and twice daily trilostane treatment. *J Vet Intern Med*, 28: 473–480.
134. Sun S-Y, Lotan R. (2002) Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol*, 41: 41–55.
135. Liu Y, Zhu Z, Zhang S-N, Mou J, Liu L, Cui T, Pei D-S. (2013) Combinational effect of PPAR γ agonist and RXR agonist on the growth of SGC7901 gastric carcinoma cells in vitro. *Tumour Biol*, 34: 2409–18.
136. Shalinsky DR, Bischoff ED, Gregory ML, Gottardis MM, Hayes JS, Lamph WW, Heyman RA, Shirley MA, Cooke TA, Davies PJ. (1995) Retinoid-induced suppression of squamous cell differentiation in human oral squamous cell carcinoma xenografts (line 1483) in athymic nude mice. *Cancer Res*, 55: 3183–91.
137. Ponthan F, Kogner P, Bjellerup P, Klevenvall L, Hassan M. (2001) Bioavailability and dose-dependent anti-tumour effects of 9-cis retinoic acid on human neuroblastoma xenografts in rat. *Br J Cancer*, 85: 2004–2009.
138. Maeng S, Kim GJ, Choi EJ, Yang HO, Lee D-S, Sohn YC. (2012) 9-Cis-retinoic acid induces growth inhibition in retinoid-sensitive breast cancer and sea urchin embryonic cells via retinoid X receptor α and replication factor C3. *Mol Endocrinol*, 26: 1821–35.
139. Jemec G, Petersen. (2009) Alitretinoin – its use in intractable hand eczema and other potential indications. *Drug Des Devel Ther*, 3: 51.
140. Fritz K, Tiplica GS, Salavastru C, Onder M. (2013) [Off-label use of alitretinoin]. *Hautarzt*, 64: 748–51.
141. Shalinsky DR, Bischoff ED, Gregory ML, Lamph WW, Heyman R a, Hayes JS, Thomazy V, Davies PJ. (1996) Enhanced antitumor efficacy of cisplatin in combination with ALRT1057 (9-cis retinoic acid) in human oral squamous carcinoma xenografts in nude mice. *Clin cancer Res*, 2: 511–520.
142. McCormick DL, Rao K V, Steele VE, Lubet R a., Kelloff GJ, Bosland MC. (1999) Chemoprevention of rat prostate carcinogenesis by 9-cis-retinoic acid. *Cancer Res*, 59: 521–4.
143. Wu K, Kim H, Rodriquez JL, Mice CVTA, Munoz-medellin D, Mohsin SK, Hilsenbeck SG, Lamph WW, Gottardis MM, Shirley M a, Kuhn JG, Green JE. (2000) 9- cis -Retinoic Acid Suppresses Mammary Tumorigenesis in C3 (1) - Simian Virus 40 T Antigen-transgenic Mice 9-cis-Retinoic Acid Suppresses Mammary Tumorigenesis in. *Clin Cancer Res*, 3: 3696–3704.
144. Apfelbaum TF, Davidson NO, Glickman RM. (1987) Apolipoprotein A-IV synthesis in rat intestine: regulation by dietary triglyceride. *Am J Physiol*, 252: G662-6.
145. Tabet F, Rye K-A. (2009) High-density lipoproteins, inflammation and oxidative

- stress. *Clin Sci*, 116: 87–98.
146. Wang F, Kohan a. B, Kindel TL, Corbin KL, Nunemaker CS, Obici S, Woods SC, Davidson WS, Tso P. (2012) Apolipoprotein A-IV improves glucose homeostasis by enhancing insulin secretion. *Proc Natl Acad Sci*, 109: 9641–9646.
 147. Qin X, Swertfeger DK, Zheng S, Hui DY, Tso P. (1998) Apolipoprotein AIV: a potent endogenous inhibitor of lipid oxidation. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*, 274: H1836–H1840.
 148. Spaulding HL. (2005) Apolipoprotein A-IV attenuates oxidant-induced apoptosis in mitotic competent, undifferentiated cells by modulating intracellular glutathione redox balance. *AJP Cell Physiol*, 290: C95–C103.
 149. Culnan DM, Cooney RN, Stanley B, Lynch CJ. (2009) Apolipoprotein A-IV, a putative satiety/antiatherogenic factor, rises after gastric bypass. *Obesity*, 17: 46–52.
 150. Broedl UC, Schachinger V, Lingenhel A, Lehrke M, Stark R, Seibold F, Goke B, Kronenberg F, Parhofer KG, Konrad-Zerna A. (2007) Apolipoprotein A-IV is an independent predictor of disease activity in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 13: 391–397.
 151. Orsó E, Moehle C, Boettcher a., Szakszon K, Werner T, Langmann T, Liebisch G, Buechler C, Ritter M, Kronenberg F, Dieplinger H, Bornstein SR, Stremmel W, Schmitz G. (2007) The satiety factor apolipoprotein A-IV modulates intestinal epithelial permeability through its interaction with α -catenin: Implications for inflammatory bowel diseases. *Horm Metab Res*, 39: 601–611.
 152. Li L, Xu Y, Yu CX. (2012) Proteomic analysis of serum of women with elevated Ca-125 to differentiate malignant from benign ovarian tumors. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 13: 3265–3270.
 153. Braoudaki M, Lambrou GI, Vougas K, Karamolegou K, Tsangaris GT, Tzortzatos-Stathopoulou F. (2013) Protein biomarkers distinguish between high- and low-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia in a tissue specific manner. *J Hematol Oncol*, 6: 52.
 154. Guo X, Hao Y, Kamilijiang M, Hasimu A, Yuan J, Wu G, Reyimu H, Kadeer N, Abudula A. (2014) Potential predictive plasma biomarkers for cervical cancer by 2D-DIGE proteomics and Ingenuity Pathway Analysis. *Tumor Biol*, 36: 1711–1720.
 155. Timms JF, Arslan-Low E, Kabir M, Worthington J, Camuzeaux S, Sinclair J, Szaub J, Afrough B, Podust VN, Fourkala E-O, Cubizolles M, Kronenberg F, Fung ET, Gentry-Maharaj A, Menon U, Jacobs I. (2014) Discovery of serum biomarkers of ovarian cancer using complementary proteomic profiling strategies. *Proteomics Clin Appl*, 8: 982–993.
 156. Conti M, Richter W, Mehats C, Livera G, Park JY, Jin C. (2003) Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem*, 278: 5493–5496.

157. Goldhoff P, Warrington NM, Limbrick DD, Hope A, Woerner BM, Jackson E, Perry A, Piwnica-Worms D, Rubin JB. (2008) Targeted inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase-4 promotes brain tumor regression. *Clin Cancer Res*, 14: 7717–7725.
158. Pullamsetti SS, Banat G a, Schmall A, Szibor M, Pomagruk D, Hänze J, Kolosionek E, Wilhelm J, Braun T, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Savai R. (2013) Phosphodiesterase-4 promotes proliferation and angiogenesis of lung cancer by crosstalk with HIF. *Oncogene*, 32: 1121–1134.
159. Murata K, Sudo T, Kameyama M, Fukuoka H, Muka M, Doki Y, Sasaki Y, Ishikawa O, Kimura Y, Imaoka S. (2000) Cyclic AMP specific phosphodiesterase activity and colon cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis*, 18: 599–604.
160. Dong H, Claffey KP, Brocke S, Epstein PM. (2015) Inhibition of breast cancer cell migration by activation of cAMP signaling. *Breast Cancer Res Treat*, 152: 17–28.
161. Narita M, Murata T, Shimizu K, Nakagawa T, Sugiyama T, Inui M, Hiramoto K, Tagawa T. (2007) A role for cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 in regulation of the growth of human malignant melanoma cells. *Oncol Rep*, 17: 1133–1139.
162. Mouratidis PXE, Colston KW, Bartlett JB, Muller GW, Man H-W, Stirling D, Dalgleish AG. (2009) Antiproliferative Effects of CC-8062 and CC-8075 in Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas*, 38: 78–84.
163. Madeira A, Pommet JM, Prochiantz A, Allinquant B. (2005) SET protein (TAF1beta, I2PP2A) is involved in neuronal apoptosis induced by an amyloid precursor protein cytoplasmic subdomain. *FASEB J*, 19: 1905–1907.
164. Fan Z, Beresford PJ, Oh DY, Zhang D, Lieberman J. (2003) Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein set is its inhibitor. *Cell*, 112: 659–672.
165. Carlson SG, Eng E, Kim EG, Perlman EJ, Copeland TD, Ballermann BJ. (1998) Expression of SET, an inhibitor of protein phosphatase 2A, in renal development and Wilms' tumor. *J Am Soc Nephrol*, 9: 1873–80.
166. Sirma Ekmekci S, G Ekmekci C, Kandilci A, Gulec C, Akbiyik M, Emrence Z, Abaci N, Karakas Z, Agaoglu L, Unuvar A, Anak S, Devecioglu O, Ustek D, Grosveld G, Ozbek U. (2012) SET oncogene is upregulated in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Tumori*, 98: 252–6.
167. Christensen DJ, Chen Y, Oddo J, Matta KM, Neil J, Davis ED, Volkheimer AD, Lanasa MC, Friedman DR, Goodman BK, Gockerman JP, Diehl LF, de Castro CM, Moore JO, Vitek MP, Weinberg JB. (2011) SET oncoprotein overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin lymphoma: a predictor of aggressive disease and a new treatment target. *Blood*, 118: 4150–4158.
168. Liu H, Gu Y, Yin J, Zheng G, Wang C, Zhang Z, Deng M, Liu J, Jia X, He Z. (2014) SET-mediated NDRG1 inhibition is involved in acquisition of epithelial-to-

- mesenchymal transition phenotype and cisplatin resistance in human lung cancer cell. *Cell Signal*, 26: 2710–20.
169. Jiang Q, Zhang C, Zhu J, Chen Q, Chen Y. (2011) The set gene is a potential oncogene in human colorectal adenocarcinoma and oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep*, 4: 993–9.
 170. Bhutia YD, Hung SW, Krentz M, Patel D, Lovin D, Manoharan R, Thomson JM, Govindarajan R. (2013) Differential processing of let-7a precursors influences RRM2 expression and chemosensitivity in pancreatic cancer: role of LIN-28 and SET oncoprotein. *PLoS One*, 8: e53436.
 171. Anazawa Y, Nakagawa H, Furihara M, Ashida S, Tamura K, Yoshioka H, Shuin T, Fujioka T, Katagiri T, Nakamura Y. (2005) PCOTH, a Novel Gene Overexpressed in Prostate Cancers, Promotes Prostate Cancer Cell Growth through Phosphorylation of Oncoprotein TAF-I β /SET. *Cancer Res*, 65: 4578–4586.
 172. Ouellet V, Page CL, Guyot MC, Lussier C, Tonin PN, Provencher DM, Mes-Masson AM. (2006) SET complex in serous epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer*, 119: 2119–2126.
 173. Song Q, Xu Y, Yang C, Chen Z, Jia C, Chen J, Zhang Y, Lai P, Fan X, Zhou X, Lin J, Li M, Ma W, Luo S, Bai X. (2014) miR-483-5p promotes invasion and metastasis of lung adenocarcinoma by targeting RhoGDI1 and ALCAM. *Cancer Res*, 74: 3031–3042.
 174. Cherradi N. (2016) microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 6: 1–15.
 175. Dang K, Myers KA. (2015) The role of hypoxia-induced miR-210 in cancer progression. *Int J Mol Sci*, 16: 6353–6372.
 176. Waters PS, McDermott AM, Wall D, Heneghan HM, Miller N, Newell J, Kerin MJ, Dwyer RM. (2012) Relationship between Circulating and Tissue microRNAs in a Murine Model of Breast Cancer. *PLoS One*, 7: 1–8.
 177. Wang J, Zhang KY, Liu SM, Sen S. (2014) Tumor-Associated circulating micrnas as biomarkers of cancer. *Molecules*, 19: 1912–1938.

XI. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE:

Nagy Z, Baghy K, Hunyadi-Gulyás É, Micsik T, Nyíró G, Rácz G, Butz H, Perge P, Kovalszky I, Medzihradzky F. K, 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 **IF: 3,425**

Jung S, **Nagy Z**, Fassnacht M, Zambetti G, Weiss M, Reincke M, Igaz P, Beuschlein F, Hantel C. (2016) **Progress for a liposomal chemotherapy protocol against adrenocortical carcinoma.**

ENDOCRINE RELATED CANCER (közlésre elfogadva, IF: 4,472 **doi: 10.1530/ERC-16-0249**)

TOVÁBBI SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE:

Nagy Z, Szabó DR, Zsippai A, Falus A, Rácz K, Igaz P (2012) **A hosszú, nem kódoló RNS-ek jelentősége a daganatbiológiában**

ORVOSI HETILAP 153:(38) pp. 1494-1501.

Igaz P, **Nagy Z**, Vásárhelyi B, Buzás E, Falus A, Rácz K (2013) **A mikroRNS-ek lehetséges szerepe az egyének és fajok közötti kommunikációban.**

ORVOSI HETILAP 153:(42) pp. 1647-1650.

Zsippai A, Szabo PM, Szabo DR, **Nagy Z**, Patocs A, Racz K, Igaz P (2013) **In silico analysis of pathways affected by differentially expressed microRNAs in adrenocortical tumors.**

JOURNAL OF ENDOCRINOLOGICAL INVESTIGATION 36:(11) pp. 1011-1019. IF: 1,552

Szabo DR, Baghy K, Szabo PM, Zsippai A, Marczell I, **Nagy Z**, Varga V, Eder K, Toth S, Buzas EI, Falus A, Kovalszky I, Patocs A, Racz K, Igaz P (2014) **Antitumoral effects of 9-cis retinoic acid in adrenocortical cancer.**

CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 71:(5) pp. 917-932. IF: 5,808

Szabo DR, Luconi M, Szabo PM, Toth M, Szucs N, Horanyi J, **Nagy Z**, Mannelli M, Patocs A, Racz K, Igaz P (2014) **Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors.**

LABORATORY INVESTIGATION 94:(3) pp. 331-339. IF: 3,676

Igaz P, Igaz I, **Nagy Z**, Nyíró G, Szabo PM, Falus A, Patócs A, Rácz K (2015) **MicroRNAs in adrenal tumors: relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy**

CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 72:(3) pp. 417-428. IF: 5,694

Igaz I, Nyíró 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: Paper 589230. 6 p. IF: 2,376

Nagy Z, Igaz P (2015) Introduction to microRNAs: Biogenesis, Action, Relevance of Tissue microRNAs in Disease Pathogenesis, Diagnosis and Therapy-The Concept of Circulating microRNAs.

EXPERIENTIA SUPPLEMENTUM, SPRINGER, Igaz P: Circulating microRNAs in disease diagnostics and their potential biological relevance (EXS 106) Chapter 1 pp. 3-30.

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném kifejezni köszönetem **Prof. Dr. Rácz Károlynak**, a II.sz. Belgyógyászati Klinika volt igazgatójának, hogy programvezetőként lehetővé tette felvételemet a Doktori Iskolába, valamint hogy kutatásom mindvégig figyelemmel kísérte és támogatta. Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Igaz Péter** egyetemi docensnek, a II.sz. Belgyógyászati Klinika jelenlegi igazgatójának a lehetőséget, hogy orvostanhallgatóként csatlakozhattam kutatócsoportjához, továbbá hogy töretlen lelkesedésével, személyes támogatásával és magas színvonalú szakmai tapasztalatával munkám során folyamatosan segített.

Köszönöm **Prof. Dr. Tulassay Tivadarnak** és **Prof. Dr. Tulassay Zsoltnak**, a Doktori Iskola volt és jelenlegi Igazgatójának, hogy lehetőséget biztosítottak kutatásom elvégzésére.

Köszönöm **Prof. Dr. Tóth Miklósnak**, a II. sz. Belgyógyászati Klinika volt igazgatójának, hogy mindvégig támogattott a Klinikán zajló tudományos munkámban.

Köszönettel tartozom **Dr. Patócs Attila** egyetemi docensnek, hogy magasszintű szakmai tudásával kutatásom alatt mindig hasznos tanácsokkal látott el.

Köszönöm **Prof. Dr. Kovalszky Ilonának** és munkacsoportjának, valamint az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet valamennyi dolgozójának, továbbá **Prof. Dr. Medzihradszky F. Katalinnak** és munkacsoportjának, hogy útmutatásukkal és segítségükkel támogattak labormunkáim során.

Köszönöm továbbá **Dr. Butz Henriett** és **Dr. Nyíró Gábor** posztdoktoroknak, **dr. Koncz Klára**, **dr. Molnár Ágnes**, **Dr. Stark Júlia**, **dr. Zsippai Adrienn**, **Fülöpné Németh Kinga**, **dr. Grolmusz Vince**, **dr. Nagy Zsolt**, **dr. Perge Pál**, **Dr. Szabó Péter Márton** volt és jelenlegi PhD-hallgatóknak, 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 türelemért és támogatásért, amit az évek során kaptam tőlük.