

Genetikai és epigenetikai biomarkerek neuroendokrin daganatokban

Doktori értekezés

Dr. Kövesdi Annamária

Semmelweis Egyetem
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Patócs Attila, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Küronya Zsófia, PhD., egyetemi adjunktus
Dr. Gál Anikó, PhD., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Horváth Csaba, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Hubina Erika, PhD., főorvos

Dr. Beke Artúr, PhD., egyetemi adjunktus

Budapest
2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés.....	7
1.1. A neuroendokrin daganatok.....	7
1.2. Az öröklődő multiplex endokrin neoplasia 1 (MEN1) szindróma	8
1.2.1. A MEN1 szindróma klinikai manifesztációi.....	8
1.2.1.1. Primer hyperparathyreosis (PHPT)	8
1.2.1.2. Hypophysis adenoma (PA).....	9
1.2.1.3. Gastroenteropancreaticus neuroendokrin tumorok (GEP-NET)	10
1.2.2. Más ritka manifesztációk	11
1.2.3. A MEN1 szindróma etiológiája, öröklődése	12
1.2.4. A fenokópia jelensége	15
1.3. Sporadikus neuroendokrin neoplasiák	17
1.3.1. A MEN1-asszociált neuroendokrin neoplasiák sporadikus előfordulása.....	17
1.3.1.1. Sporadikus PHPT	17
1.3.1.2. Sporadikus pancreas NET	18
1.3.2. Phaeochromocytoma/paraganglioma	20
1.4. Chromogranin A jelentősége a neuroendokrin tumorok diagnosztikájában.....	21
1.5. A mikroRNS-ek, mint biomarkerek.....	22
1.5.1. Eltérően expresszálandó miRNS-ek PHPT-ben.....	25
1.5.2. Eltérően expresszálandó miRNS-ek pNET-ben.....	26
1.5.3. Eltérően expresszálandó miRNS-ek PPGL-ben.....	27
2. Célkitűzések	29
3. Módszerek	30
3.1. MEN1 szindrómás betegek vizsgálata.....	30
3.1.1. A <i>MEN1</i> genetikai vizsgálatra beküldött betegek adatai	30
3.1.2. A <i>MEN1</i> és <i>CDKN1B</i> gének szekvenálása	30
3.2. Sporadikus és MEN1-asszociált PHPT szövetminták vizsgálata	31
3.2.1. PHPT betegek és a felhasznált szövetminták.....	31
3.2.2. Menin és Ki-67 expresszió vizsgálata.....	32
3.2.3. Szomatikus <i>MEN1</i> mutációk vizsgálata sporadikus PHPT szövetekben.....	33
3.2.4. A <i>MEN1</i> gént célzó miRNS-ek <i>in silico</i> vizsgálata	33

3.2.5. A kiválasztott miRNS-ek szöveti expressziójának meghatározása valós idejű kvantitatív PCR-rel.....	34
3.3. miRNS-ek vizsgálata pancreas NET szövetmintákban.....	34
3.3.1. A kiválasztott pNET betegek és szövetek	34
3.3.2. Az elérhető miRNS microarray adatok <i>in silico</i> reanalízise	35
3.3.3. A kiválasztott miRNS-ek expressziójának meghatározása valós idejű kvantitatív PCR-rel.....	35
3.4. Chromogranin A mérés és keringő miRNS profilozás egészséges és NET mintákban.....	35
3.4.1. Betegek és kontrollok.....	35
3.4.2. A szérum chromogranin A mérése.....	37
3.4.3. Keringő miRNS-ek profilozása újgenerációs szekvenálással	37
3.4.4. A kiválasztott miRNS-ek expressziójának validálása valós idejű kvantitatív PCR-rel.....	38
3.5. Statisztikai analízis	39
4. Eredmények	41
4.1. A hazai MEN1 adatbázis	41
4.1.1. Mutációt hordozó esetek. Új csírasejtes <i>MEN1</i> mutációk.....	41
4.1.2. Mutáció-negatív esetek. MEN1 fenokópia.....	50
4.1.3. A genetikai vizsgálat indikációi	51
4.1.4. GEP-NET-ek prediktív szerepe MEN1 szindrómában	52
4.1.5. A GEP-NET-ek szövettani típusai	55
4.1.6. Genotípus-fenotípus összefüggések	55
4.2. <i>MEN1</i> és miRNS expresszió PHPT szövetmintákban.....	57
4.2.1. Új csírasejtes <i>MEN1</i> mutációk	57
4.2.2. MEN1 és menin expresszió összefüggése PHPT szövetekben	57
4.2.3. Magasabb miR-24 és miR-28 expresszió sporadikus PHPT szövetekben....	60
4.3. Prognosztikai jelentőségű miRNS-ek pancreas NET szövetekben.....	64
4.3.1. A szövettani grade-ek között szignifikánsan eltérő expressziójú miRNS-ek	64
4.3.2. Negatív prediktív jelentőségű miRNS-ek	66
4.4. Keringő miRNS biomarkerek pancreas NET-ben és pheochromocytómában... 71	
4.4.1. Sejtkontaminációt jelző miRNS-ek expressziójának vizsgálata	71
4.4.2. Keringő miRNS expressziós profil vizsgálata újgenerációs szekvenálással. 71	
4.4.3. A kiválasztott miRNS-ek validálása	75

4.4.4. Összefüggések a miRNS-ek expressziója és a kliniko-patológiai paraméterek között.....	77
4.4.5. A keringő miRNS-ek diagnosztikus értéke PPGL/pNET esetekben	80
4.4.6. Deregulált pNET/PPGL szöveti miRNS-ek vizsgálata szérumban ..	81
5. Megbeszélés	85
5.1. A hazai MEN1 adatbázis elemzése, genotípus-fenotípus összefüggései.....	85
5.2. <i>MEN1</i> mutációk és <i>MEN1</i> -et célzó miRNS-ek jelentősége a PHPT patogenezisében	88
5.3. Prognosztikus jelentőségű miRNS-ek pancreas NET-ekben	90
5.4. Keringő miRNS-ek diagnosztikus értéke hormonálisan inaktív pancreas NET-ekben	91
6. Következtetések	95
6.1. Tapasztalataink a hazai MEN1 adatbázis elemzése kapcsán	95
6.2. Menin és miRNS expresszió sporadikus és MEN1-asszociált PHPT-ben	96
6.3. Prognosztikus szöveti miRNS biomarkerek pNET-ben	96
6.4. Keringő miRNS biomarkerek pNET-ben	97
7. Összefoglalás	98
8. Summary	99
9. Irodalomjegyzék	100
10. Saját publikációk jegyzéke	127
11. Köszönetnyilvánítás.....	129

Rövidítések jegyzéke

ACTH	adrenocorticotrop hormon
AIP	aryl hydrocarbon receptor-interacting protein
ATRX	alpha thalassaemia/mental retardation syndrome X-linked
AUC	area under curve (görbe alatti terület)
CaSR	kalcium szenzor receptor
CCND1	cyclin D1
CDKN1B	cyclin-dependens kináz inhibitor 1
CgA	chromogranin A
DAXX	death-domain associated protein
ER α	ösztrogén receptor α
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FBHH	familiáris benignus hypocalciuriás hypercalcaemia
FIPA	familial isolated pituitary adenomas
FSH	folliculus stimuláló hormon
GEP-NET	gastroenteropancreaticus neuroendokrin tumor
GH	growth hormon (növekedési hormon)
HPT-JT	hyperparathyreosis-állkapocs tumor szindrómas
IGF-1	insulinszerű növekedési faktor 1
LH	luteinizáló hormon
LOH	loss of heterozygosity
MEN1	multiplex endokrin neoplasia 1
miR	microRNS
MLPA	multiplex ligációs próbaamplifikáció
MRI	magnetic resonance imaging (mágneses rezonancia vizsgálat)
mTOR	mammalian target of rapamycin
NEC	neuroendokrin carcinoma
NET	neuroendokrin tumor

NF1	neurofibromatosis 1
NSL	nukleáris lokalizációs szignál
PA	pituitary adenoma (hypophysis adenoma)
PCC	phaeochromocytoma
PCR	polymerase chain reaction
PHPT	primer hyperparathyreosis
pNET	pancreas neuroendokrin tumor
PPGL	phaeochromocytoma-paraganglioma
PPI	protonpumpa inhibitor
PPV	pozitív prediktív érték
PRL	prolactin
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTH	parathyroid hormon
RIA	radioimmunoassay
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR
SDHB	szukcinát dehydrogenáz B alegység
TMM	Trimmed Mean of the M-values
TSC	tuberous sclerosis
99mTc-MIBI	technetium-99m sestamibi
UMI	unique molecular index
UTR	untranslated region (nem átírózó régió)
VHL	von Hippel-Lindau szindróma
VIP	vasoaktív intestinalis peptid

1. Bevezetés

1.1. A neuroendokrin daganatok

A neuroendokrin daganatok (NET) a szervezet endokrin sejtjeiből származó, biológiailag heterogén daganatok. A leggyakrabban érintett szervek: az agyalapi mirigy, a thymus, a mellékvesevelő, valamint a diffúz neuroendokrin rendszer sejtjei (pl. tüdő, hasnyálmirigy, gasztrointesztinális traktus, a paraganglionok és a pajzsmirigy C-sejtjei) [1]. Molekuláris háttérükre jellemző, hogy más, szolid daganattípusokkal összehasonlítva kevesebb genetikai rendellenesség (mutáció és kromoszomális aberráció) igazolható [2].

A differenciáció és proliferatív index alapján két csoportjuk különíthető el, amelyek a prognózist is jól jelzik: 1.) jól differenciált, lassan növekvő neuroendokrin tumorok és 2.) rosszul differenciált, magas grádusú, klinikailag agresszív neuroendokrin carcinomák (NEC) [3]. Az utóbbi évek genomikai vizsgálatainak köszönhetően megismertük a NET-ek kialakulásában legfontosabb genetikai útvonalakat. Így világossá vált az is, hogy a magas grádusú neuroendokrin carcinomák külön tumorbiológiai entitást képeznek, és nem a jól differenciált neuroendokrin tumorokból alakulnak ki [3].

20%-uk örökletes daganatszindrómához társul, mint pl. a multiplex endokrin neoplasia 1-es, 2A és 2B típusai, a Von-Hippel-Lindau szindróma, a neurofibromatosis 1-es, a phaeochromocytoma/paraganglioma szindrómák. Az esetek zöme azonban sporadikus megjelenésű. Az örökletes szindrómákban érintett gének mutációi (pl. *MEN1*, *NF1*, *TSC1-2*, *CDKN1B*) sporadikus esetekben, szomatikus mutációként is megtalálhatók és felelősek a daganatok kialakulásáért [1].

A neuroendokrin tumorok patogenezisében leírt gének a chromatin remodellingben, a telomerhossz fenntartásában, a DNS hibajavításban, a sejtproliferációban vesznek részt [1,4]. A leggyakoribb, pancreas kiindulású NET-ekben három fő útvonalat: az mTOR útvonal által szabályozott sejtproliferációban, metabolizmusban szerepet játszó gének mutációit (*PTEN*, *TSC2*, *PIK3CA*); a chromatin stabilizációt és telomert szabályozó *DAXX/ATRX* mutációkat; és a komplex biológiai funkciójú, a DNS hibajavításban, a sejtproliferációban szerepet játszó *MEN1* gén mutációit [5] írták le. A p53-at kódoló *TP53*

és a retinoblastoma-1-et kódoló *RBI* gének mutációi a rosszul differenciált neuroendokrin carcinomák legnagyobb részének patogeneziséért felelnek [3].

A neuroendokrin daganatokban megfigyelt alacsony mutációs ráta alapján felvetődik, hogy más mechanizmusok, például epigenetikai változások járulnak hozzá a NET-ek kialakulásához és progressziójához. A NET-ek esetén széles körben vizsgált hiszton metilációnak terápiás jelentősége is lehet a jövőben, bár az eddig rendelkezésre álló *in vivo* adatok a várttól jelentősen elmaradtak [1].

1.2. Az öröklődő multiplex endokrin neoplasia 1 (MEN1) szindróma

A MEN1 ritka daganatszindróma, prevalenciája 1-10/100.000 fő [6,7]. Három fő manifesztációja a mellékpajzsmirigy túlműködés, a gastroenteropancreaticus neuroendokrin daganatok (GEP-NET), valamint az agyalapi mirigy adenoma [8]. Az endokrin daganatok penetranciája az életkorral nő, azonban jelentős variabilitás figyelhető meg a fenotípusban [9,10]. A MEN1 diagnózisa 3 esetben állítható fel: ha a három manifesztációból legalább kettő fennáll (klinikai MEN1 szindróma) ugyanabban a betegben; ha egy klinikailag MEN1 szindrómás beteg egyenesági rokonában egy MEN1-asszociált daganat alakul ki; vagy ha csírasejtes *MEN1* mutációt találtunk egy egyénben, aki lehet akár tünetmentes is [11].

1.2.1. A MEN1 szindróma klinikai manifesztációi

1.2.1.1. Primer hyperparathyreosis (PHPT)

A leggyakoribb manifesztáció a mellékpajzsmirigy jóindulatú túlműködésével járó primer hyperparathyreosis (PHPT). A sporadikus esetekkel ellentétben MEN1 szindrómában többnyire fiatal felnőttkorban jelentkeznek, a betegek 90%-ában 20 és 25 éves kor között; a betegség penetranciája 50 éves korra csaknem 100%. A MEN1 szindróma részeként jellemzően több mellékpajzsmirigy is érintett. Gyakran tünetmentes, ezért nem kerül felismerésre. Többnyire mellékletként észlelt hyperkalcémia hívja fel

rá a figyelmet; okozhat polydipsziát, polyuriát, obstipációt, a csontok ásványianyag-tartalmának csökkenését, ritkábban vesekövességet, peptikus fekélyeket okoz [12]. Bár a sporadikus PHPT-hez képest a MEN1-asszociált formában többnyire biokémiaileg enyhébb betegséget találunk (alacsonyabb szérum kalcium és PTH szintek), a csont ásványianyag tartalma alacsonyabb MEN1 szindrómában, ami hosszabb betegségfennállásra utal [13,14]. A MEN1-asszociált PHPT betegek 50%-ában kialakul osteoporosis 35 éves korra, amely fokozott törési rizikóhoz vezet [15].

A PHPT definitív terápiája sebészi. A MEN1-asszociált PHPT látszólag sikeres szubtotál parathyroidectomia után is gyakran recidív. A multiglanduláris érintettség és gyakori kiújulás miatt a jelenleg érvényes szakmai irányelv [11,16] szubtotális vagy totális parathyroidectomiát javasol kétoldali nyaki feltárással, totális parathyroidectomia esetén az egyik mellékpajzsmirigy autotranszplantációjával. Emellett profilaktikus thymectomiát is javasolnak, az esetleges ektopiás mellékpajzsmirigyek eltávolítására és a thymus neuroendokrin carcinoma megelőzésére [12]. Ugyanakkor egy 2019-ben publikált tanulmányban 89 beteg vizsgálatával azt találták, hogy a fenti műtéti technikákat követő gyakori szövődményes hypoparathyreosisal szemben elegendő csak az érintett mellékpajzsmirigy eltávolítása. Ezek biztonságosan lokalizálhatók ^{99m}Tc -MIBI (technetium-99m sestamibi) SPECT szcintigráfiával, és az intraoperatív parathormon (PTH) szint monitorozása is a műtét sikerességét segíti elő. Így reoperáció szükségessége esetén is kevesebb szövődménnyel kell számolni [17]. Vitatott kérdés a műtét időpontja, különösen tünetmentes fiatalokban. Korán elvégzett műtéttel csökkentjük az osteoporosis és a vesezővődmények kialakulásának esélyét; mások viszont a műtét késleltetését preferálják, amivel elkerülhető a többszörös műtét. Tünetet okozó hyperparathyreosis illetve tünetmentes esetben súlyos hyperkalcémia, csont- vagy veseérintettség esetén indokolt a műtét [16].

1.2.1.2. Hypophys adenoma (PA)

Az agyalapi mirigy adenomáinak penetranciája MEN1 szindrómában kb. 30-50%. Nem és életkor szerinti megoszlásuk, típusaik hasonlóak MEN1 szindrómában, mint sporadikus esetekben [18]: gyakrabban alakul ki nőkben; átlagosan 38 éves korban [19].

Nagyobb részük hormontermelő; leggyakrabban prolaktint (PRL) (60%-ban), ritkábban növekedési hormont (GH) (25%), adrenocorticotrop hormont (ACTH) (5%) termelnek [20], a fennmaradó esetek hormonálisan inaktív adenomák. A sporadikus adenomákhoz képest gyakran termelnek egyidejűleg több hormont (az esetek 39%-ában), leggyakrabban prolaktint és ACTH-t [19]. A MEN1-asszociált hypophysis adenomák nagyobbak, agresszívebbek, és kevésbé reagálnak a sporadikus esetekben alkalmazott terápiákra. Az esetek 85%-ban 1 cm-nél nagyobb macroadenomák alakulnak ki, amelyek a környezetet is infiltrálhatják, és a kezelés ellenére perzisztál a hormonhyperszekréció az esetek akár 45%-ában [21–23]. Prospektív vizsgálatok igazolták, hogy biokémiai változások 10 évvel megelőzhetik a klinikai manifesztációkat, ezért pozitív családi anamnézis vagy genetikai vizsgálattal igazolt *MEN1* mutáció hordozása esetén évente PRL és IGF-1 meghatározás valamint 3 évente sella MRI vizsgálat javasolt [24].

1.2.1.3. Gastroenteropancreaticus neuroendokrin tumorok (GEP-NET)

A MEN1-hez társuló GEP-NET-ek a sporadikus GEP-NET-ekhez képest kb. 10 évvel korábban jelentkeznek, gyakran multiplex formában [25]. Penetranciája igen magas, különböző források alapján elérheti a 80-100%-ot [26–28]. Az utóbbi évek vizsgálatai azt mutatják, hogy a funkcionálisan aktív GEP-NET-ek gyakran vezetnek a MEN1 diagnózisához [26]. Egy 1403 *MEN1*-mutációt hordozó beteget magában foglaló adatbázis alapján 60 éves korra a betegek kb. 66%-ában kialakul [7,29], túlnyomó többségben a pancreasban. Napjainkra a diagnosztikus eszköztár gazdagodásával a nem-funkcionáló GEP-NET lett a leggyakoribb altípus; ugyanakkor a klinikailag detektálható daganat mellett patológiai mintákban az esetek 95%-ában mikroszkopikus tumorokat is találtak a pancreasban (microadenomatosis) [30]. Egy egyénben előfordulhat egyidőben hormonálisan aktív és nem-funkcionáló NET is.

A funkcionálisan aktív GEP-NET daganatok közül MEN1 szindrómában leggyakoribb a gastrinoma (a GEP-NET-ek 21-70%-a) [15]. Az összes gastrinomás beteg 20%-a csírasejtes *MEN1* mutációt hordoz. A hypergasztrinémia megnövekedett gyomorsav szekréciót és recidív peptikus fekélyeket okoz, amelyet Zollinger-Ellison szindrómának nevezünk [11]. A MEN1-asszociált gastrinomák gyakran malignusak, és akár 50%-ban

nyirokcsomó- és májártétet adhatnak már a felfedezésük előtt [21]. Nemrég felvetődött a lehetősége annak, hogy a protonpumpa-inhibitor (PPI) kezelés okozta szekunder hypergasztrinémia talaján neuroendokrin tumorok kialakulásának rizikója növekedett [31]. A protonpumpagátlók elterjedését megelőzően a peptikus fekélyek szövődményeként kialakult vérzés, gyomorperforáció okoztak leggyakrabban halálozást MEN1 szindrómában. Az aktuális ajánlás alapján [11] minden gastrinomás beteg esetén indokolt a *MEN1* gén genetikai vizsgálata.

Az insulinomák okozta Whipple-triád az esetek 10%-ában a MEN1 szindróma első manifesztációja. Többnyire szoliter benignus léziók, gyakran 1 cm-nél nagyobbak [21]. A glucagonomák és VIP-omák ritkák; előbbi esetek gyakran aszimptomatikusak, míg a VIP túltermelés vizes hasmenést okoz [11]. Nemrég megjelent két, nagy esetszámú és hosszú utánkötéses vizsgálatban igazolták, hogy a 2 cm-nél kisebb nem funkcionáló pancreas NET-ek (pNET) ritkán malignusak és kevésbé metasztatizálnak, ezért a primer műtét helyett ajánlott ezen betegek utánkötése [32,33]. Annak ellenére, hogy a sporadikus NET-ekhez képest a MEN1-asszociált GEP-NET-ek lassabban növekednek [33], továbbra is a GEP-NET-ek malignus potenciálja a vezető halálok MEN1 szindrómában [15,27]; a nem funkcionáló pNET-ek 10 éves túlélése 23-62% [34]. A MEN1-asszociált GEP-NET-ek kezelése is kevésbé sikeres a sporadikus daganatokhoz képest. A gastrinomák gyakran multiplexek, ezért sebészi kezelésük is nehezebb: kb. 15%-ban sikerül a műtéttel "disease-free", azaz tumormentes állapotot elérni, szemben a sporadikus esetekben talál 45%-kal [21]. Az insulinomás esetek akár 50%-ában előfordulhat okkult metasztatikus betegség, míg a sporadikus eseteknek csupán 10%-a malignus [21]. A sporadikus daganatokhoz képest kedvezőbb túlélés a lassú növekedés mellett a MEN1 családokban történő korai szűrésnek és diagnózisnak is köszönhető [35].

1.2.2. Más ritka manifesztációk

Ritkábban kialakulhat MEN1 szindrómában bronchiális vagy thymus neuroendokrin tumor, általában felnőttkorban. A thymus NET-ek rendkívül agresszívek, jelentősen magas morbiditást okoznak; a MEN1-hez kapcsolódó halálozás 19%-áért felelnek [11,16]. Mindkét tumorra jellemző, hogy a betegek gyakran aszimptomatikusak. A

thymus NET-ek 25%-ában csírasejtes *MEN1* mutáció található, ezért sporadikus thymus neuroendokrin tumor esetén MEN1 szindrómára gondolni kell [16]. Előfordult néhány, parathyroidectomiával társult profilaktikus thymectomiát követően kialakult thymus NET eset az irodalomban, ezért fontos az eltávolítást követően is kontroll képalkotó vizsgálatok végzése [16]. A bronchiális NET-ek néhány kivételtől eltekintve jól differenciált NET-ek; prognózisuk is kedvező [36,37]. A mellékvese térfoglalások gyakorisága MEN1 szindrómában változó, 20-73% lehet. Ezek többnyire benignus, nem hormontermelő mellékvesekéreg adenomák. Gyakran alakulnak ki bőrmanifesztációk: angiofibromák (64%) és kollagenomák (62%), ritkábban lipomák (17-34%) [16]. Független MEN1 kohorszokban gyakoribbnak találták az emlőrákot *MEN1* mutációt hordozókban, ezek fiatalabb életkorban alakultak ki, mint az átlag populációban [38]. Az összefüggést megerősítette az a megfigyelés, hogy emlő carcinoma sejtekben a menin kolokalizált az ösztrogén receptor α -val ($ER\alpha$), így a menin feltehetően regulálja az $ER\alpha$ -t a daganatképződésben [39].

1.2.3. A MEN1 szindróma etiológiája, öröklődése

1997-ben pozicionális klónozással azonosították a 11q13 régióban található, kb. 9000 bázispárból álló, 10 exont tartalmazó, *MEN1* gént [40]. A 610 aminosavból álló, elsősorban a sejtmagban található fehérje terméke a menin a transzkripció szabályozásában, a genom stabilitásában, a sejtosztódásban és proliferációban vesz részt [41,42]. A menin fehérje nukleáris lokalizációs szekvenciái (NLS) a C-terminális régióban található, ezek teremtenek közvetlen kapcsolatot a DNS-sel [21]. Egérmodellben a *MEN1* mindkét alléljának csírasejtes deléciója in utero halált okoz, míg csak az egyik allél deléciója az emberben megfigyelt tumorok kialakulásához vezet egerekben [43].

A familiáris MEN1 esetek 70-90%-ában csírasejtes heterozigóta mutáció található; a sporadikus MEN1 esetek kis részében *de novo* mutáció alakul ki. A csírasejtes mutáció következtében kialakult heterozigóta állapot egy újabb, szomatikus mutáció következtében megszűnik (LOH – loss of heterozygosity), a menin fehérje nem expresszálódik. A mutációk túlnyomó többsége inaktiváló mutáció. Ezek alapján a menin

tumor szuppresszor funkciójának tartjuk [41]. MEN1-asszociált Zollinger-Ellison szindrómában ugyanakkor azt találták, hogy a multifokális gastrinomák evolúciója különbözőképpen zajlik: a második allél inaktivációja a betegeknek csak kevesebb mint 50%-ában történt meg; és ugyanabban a betegben egyes góciókban csak a 11q13 régiót, másokban a teljes kromoszómát érintő LOH mellett előfordult a LOH hiánya is [44]. A második, szomatikus allél inaktivációjában szerepet játszhatnak epigenetikai tényezők is, mint pl. a Luzzi és munkatársai által közölt miR-24-1, amely a meninnek negatív feedback rendszert alkot [45]. Egy későbbi közleményükben összefüggést találtak három miRNS (miR-4258, miR-1301, miR-664) és a menin expressziója (LOH vs. nem-LOH szövetek) között mellékpajzsmirigy szövetben, így ezeknek jelentősége lehet a mellékpajzsmirigy daganatképződésben [46]. A sporadikus GEP-NET-ek jelentős részében szomatikus *MEN1* mutációt találtak, ezekben az esetekben a *MEN1* mindkét alléljának inaktivációja szomatikus szinten történik [41] (lásd 1.1.1.3 fejezet). Kevés közlemény jelent meg azonban miRNS-ek jelentőségéről MEN1 szindrómában [47].

Napjainkig több, mint 1200 csírasejtes *MEN1* mutációt közöltek. Ezek a teljes kódoló régióban elszórtan találhatóak, ún. hot-spot régiót nem azonosítottak [41]. Két közleményben összegyűjtötték és elemezték az 1997-2007 és 2007-2015 között publikált mutációkat [48,49]. Nagyobb részük a fehérje szerkezetének változását okozza: 42%-uk frameshift, 14% nonsense, 10,5% splice régiót érintő mutáció, ritkán nagy deléciók fordulnak elő; azonban a missense (25,5%) és in-frame (5,5%) mutációk is lehetnek patogének [41,48]. Bár esettanulmányok és kis esetszámú vizsgálatok szerint a menin fehérje szerkezetét jelentősen befolyásoló frameshift és nonsense mutációk agresszívabb betegségfolyással járnak, a MEN2 szindrómával ellentétben MEN1-ben mindeztidáig nem találtak egyértelmű genotípus-fenotípus összefüggést [21]. A mutáció típusa alapján tehát nem következtethetünk a manifesztációk kialakulásának valószínűségére, idejére, a betegség progressziójára [16].

Emellett jelentős különbségeket figyeltek meg ugyanazon mutációt hordozó családtagok klinikai manifesztációi között is [50]. Ennek okaként felmerültek epigenetikai tényezők mellett a meninnel interakcióban lévő fehérjék is [21,47,51,52].

A *MEN1* gén genetikai vizsgálata a jelenleg érvényes irányelvek alapján a következő esetekben indokolt:

- 2 vagy több MEN1-asszociált daganat az index betegben
- aszimptomatikus index betegben, akinek elsőfokú családtagja *MEN1* mutációt hordoz
- *MEN1* mutációt hordozó, öröklődő MEN1 szindróma tüneteit mutató beteg elsőfokú családtagjában
- olyan betegekben, akiknél MEN1 klinikai gyanúja vagy atípusos MEN1 áll fenn:
 - mellékpajzsmirigy adenoma 30 éves életkor alatt
 - több mirigyet érintő mellékpajzsmirigy adenoma
 - gastrinoma
 - multiplex pancreas NET bármilyen életkorban
 - két vagy több MEN1-asszociált daganat, amelyek nem részei a klasszikus triásznak (PHPT, pancreas NET vagy hypophysis adenoma)

A szakirodalomban publikált MEN1 esetek közül előfordult nagyon korai, 5-10 éves életkorban jelentkező betegségmanifesztáció, ezért igazolt *MEN1* mutációt hordozó családtag esetén javasolt már 5 éves életkorban a genetikai vizsgálatot elvégezni [11,41,53]. Egy néhány évvel ezelőtti összefoglaló felhívta a figyelmet arra, hogy a diagnózis késése rontja a betegség kimenetelét [54]. Az olasz MEN1 kohorszban az átlagos életkor index betegekben az első MEN1 manifesztációkor 41,6 év volt, míg a MEN1 diagnózisakor 55,1 év; tehát az első tünethez képest több, mint 10 évet késett a diagnózis. Ennek egyik oka a MEN1 bizonyos manifesztációinak (PHPT, hypophysis adenoma) gyakori előfordulása az átlag populációban, valamint a MEN1 szindróma és a genetikai vizsgálati indikációk ismeretének hiánya [54]. Gyakran késik a családtagok felismerése is: a holland MEN1 kohorszban az index beteg és a családtagok genetikai tesztelése között átlagosan 3,5 év telt el; nem egy esetben alakult ki ez idő alatt metasztatikus neuroendokrin tumor [55].

Manoharan és munkatársai ugyanakkor nemrég kétségbe vonták a tünetmentes egyének rutin szűrésének hasznát, tapasztalatuk szerint ugyanis a súlyos MEN1 manifesztációk ritkán alakulnak ki 16 évesnél fiatalabb egyéneknél; ezen okból a tünetmentes esetek genetikai vizsgálatának időpontját 16 éves kor előtt nem javasolták [56]. A mindennapi klinikai gyakorlatban a kérdés jelentőségét jelzi a betegségtudat okozta szorongás és a rosszabb életminőség MEN1 betegekben [54].

A *MEN1* gén mutációanalízise során a kódoló és a splice régiók Sanger szekvenálását végezzük el először. Amennyiben itt nem találunk mutációt, úgy a nagy deléciók kimutatására multiplex ligációs próbaamplifikációt (MLPA) alkalmazunk [11,41].

Igazolt *MEN1* mutáció esetén az adott egyénben magas a rizikó a MEN1-asszociált tumorok kialakulására, ezért rendszeres szűrővizsgálatokat ajánlott végezni ezek detektálására [11]. Bizonyították, hogy a MEN1 betegek intenzív utánkövetése és szűrése csökkenti a morbiditást és javítja a túlélést [7,57]. A MEN1 diagnózisának késése az egyénre nézve potenciálisan káros lehet a növekvő morbiditás miatt [55].

PHPT szűrésére évente javasolt a plazma kalcium és PTH szint meghatározása. GEP-NET igazolására évente szükséges a gastrointestinalis hormonok meghatározása: gastrin, glucagon, vasoaktív intestinalis peptid (VIP), pancreaticus polypeptid, chromogranin A és insulin mérése. A képalkotó vizsgálatok elérhetősége nem mindenhol adott, így nem is született konszenzus ezt illetően. Javasolt évente a pancreas és a duodenum vizualizálása MRI, CT vagy endoszkópos ultrahang vizsgálatokkal. A hypophysis adenomák szűrése a klinikai megítéléstől is függ. Javasolt évente plazma prolaktin és IGF-1 meghatározás, valamint 3-5 évente sella MRI elvégzése. Kóros eredmények esetén további vizsgálatok szükségesek. Thymus és bronchopulmonális NET szűrésére 1-2 évente mellkasi CT vagy MRI vizsgálat javasolt. Mellékvese daganatok szűrésére elegendő 3 évente hasi CT vagy MRI vizsgálat; térfoglaló folyamat esetén a malignitás kizárása és a daganat utánkövetése szükséges. A hormonális aktivitás megítélése klinikai tünetek esetén javasolt [11]. Egy friss ajánlás szerint a szűrővizsgálatokat elegendő 16 éves korban elkezdeni, ekkor is legfőképp a morbiditás és mortalitás szempontjából legjelentősebb manifesztáció, a GEP-NET-ek kizárása miatt. Tünetek esetén természetesen bármilyen életkorban indokolt a kivizsgálás [58].

1.2.4. A fenokópia jelensége

A klinikailag MEN1 szindrómás esetek 10-30%-ában nem találunk csírasejtes mutációt a *MEN1* génben. Előfordulhatnak mutációk a promoter vagy UTR (nem átíródó régió, untranslated region) régióban, azonban erre irodalmi adatok nincsenek [48]. A *MEN1*

mutációt nem hordozó, klinikailag MEN1 szindrómás betegek esetét fenokópiának nevezzük. Fenokópiát okozhatnak más gének mutációi következtében kialakult szindrómák.

A sejtciklus egyik regulátorát, a ciklin-dependens kináz inhibitor p27 fehérjét kódoló gén (*CDKN1B*) mutációja felelős a MEN4 szindróma kialakulásáért [41,59]. A p27 fiziológiásan a sejtciklus progresszióját gátolja, a ciklin-dependens kinázok gátlásán keresztül. A mutációk a fehérje celluláris lokalizációját, stabilitását vagy a célfehérjékhez való kötődését befolyásolják. Bár egy allél elvesztése gyakran előfordul különböző daganatokban (leukémiában, lymphómában, emlőrákban, vékonybél NET-ekben), a másik allél ritkán mutálódik vagy veszik el LOH következtében (haploinsufficiencia); ezért a *CDKN1B* nem klasszikus tumor szuppresszor gén [59]. Ismert, hogy a menin transzkripcionálisan regulálja a *CDKN1B* gént epigenetikai úton. *MEN1* mutáció esetén a p27 expressziója is csökkent, ezáltal befolyásolhatja a MEN1 patomechanizmusát [59]. Mindeddig kevesebb, mint 50 esetet publikáltak [60]. Az eddig közölt esetek kis százalékában duodenopancreaticus neuroendokrin daganat is előfordul. Az esetek 80%-ában kialakul PHPT, amely a MEN1-hez képest későbbi életkorban alakul ki. Hypophysis adenoma a második leggyakoribb manifesztáció (kb. 40%), azonban ritkábban alakult ki GEP-NET [59].

Családon belül gyakori előfordulású hypophysis adenomát (familial isolated pituitary adenomas, FIPA) okoz az aryl hydrocarbon receptor-interacting protein (*AIP*) öröklődő mutációja [11,54]. Egy további neuroendokrin daganat kialakulása – például az egyébként is gyakori PHPT – ezekben a betegekben elegendő a MEN1 szindróma kritériumainak teljesüléséhez. A parafibromint kódoló *CDC73* mutációi a hyperparathyreosis-állkapocs-tumor szindrómát (HPT-JT) okozzák, ebben az esetben a hyperparathyreosisért gyakran az egyébként nagyon ritka mellékpajzsmirigy carcinoma felelős. A kalcium-szenzor receptor (*CaSR*) génjének mutációi familiáris benignus hypocalciuriás hypercalcaemiához vezetnek (FBHH) [11,61].

A fenokópiák többsége negatív családi anamnézisű eset. Egy hosszú utánkövetési idejű, mutáció-pozitív és -negatív betegeket összehasonlító vizsgálat alapján a mutáció-negatív esetek enyhe klinikai lefolyásúak, és a várható élettartamuk a normál populációéhoz hasonló volt [7]. A leggyakoribb, mutáció-negatív MEN1 fenotípus a hypophysis

adenoma és mellékpajzsmirigy adenoma társulása [7]. Mindkét daganattípus gyakori endokrin betegség. A PHPT prevalenciája nagy esetszámú tanulmányok alapján 2-5/1000 főre becsülhető [62]; míg a hypophysis adenomáké 1/1000 fő [63]. Egy családon belül, egyenesági rokonokban mellékpajzsmirigy és agyalapi mirigy adenomák előfordulása lehet ko incidencia következménye. Klein és munkatársai 32 ilyen családból csak 8-ban (25%) azonosítottak *MEN1* mutációt. Ugyanakkor egy egyéni belül mindkét daganat előfordulásának valószínűsége jóval kisebb. Az előbb említett vizsgálatban például egyetlen ilyen beteg sem hordozott *MEN1* mutációt [64]; míg más vizsgálatokban nagyon alacsony arányban voltak jelen [65]. Sporadikus daganatok ko incidenciájára jellemző, hogy a daganatok szignifikánsan későbbi életkorban alakulnak ki és enyhe lefolyásúak; valamint a *MEN1*-asszociált PHPT-vel szemben, amelyben nagyon gyakori több mellékpajzsmirigy érintettsége, sporadikus esetekben a PHPT egy mirigyét érint [7,54,65]. Nem lehet teljességgel kizárni, hogy egy klinikailag *MEN1* szindrómás, *MEN1* mutációt nem hordozó beteg más génben eddig nem ismert mutációt hordoz, amely esetleg további neuroendokrin tumor kialakulásához vezethet. A mutációt hordozó betegek korai életkorban kezdődő és gyakori szűrése szükséges, amelynek súlyos anyagi, pszichés és életminőségbeli vonzata van; ugyanakkor a mutáció-negatív eseteket biztonsággal emittálhatjuk. Fontos tehát azoknak a betegeknek az azonosítása, akiket tovább kell vizsgálnunk; ehhez a részletes családi anamnézis felvétele elengedhetetlen [41,54].

1.3. Sporadikus neuroendokrin neoplasiák

1.3.1. A *MEN1*-asszociált neuroendokrin neoplasiák sporadikus előfordulása

1.3.1.1. Sporadikus PHPT

A PHPT az egyik leggyakoribb endokrin betegség, incidenciája 0,4-82/100.000 fő körül van [62]. 80%-ban solitaer mellékpajzsmirigy adenoma okozza, 10-15%-ban mind a négy mirigyét érintő hyperplasia áll fenn, 5%-ban több mirigyben alakul ki adenoma, igen

ritkán (<1%-ban) mellékpajzsmirigy carcinomát találnak [66]. Az életkor előrehaladtával előfordulása is egyre gyakoribb, a sporadikus PHPT esetek 50%-a postmenopausalis nő. Az esetek 95%-a sporadikus [67], ritkábban öröklődő szindrómákhoz társult, mint a dolgozat elején részletezett MEN1 szindróma.

A sporadikus PHPT kialakulásának oka eddig nem ismert. Az utóbbi évek eredményei alapján a MEN1 gén szomatikus mutációja a leggyakoribb driver mutáció sporadikus PHPT szövetmintákban [67–69]. A cyclin D1-et kódoló *CCND1* gén overexpressziója szintén gyakori esemény a sporadikus mellékpajzsmirigy daganatok evolúciójában. A mellékpajzsmirigy adenomák többnyire benignus természete mellett szól a teljes exom szekvenálással ezekben a daganatokban talált alacsony mutációs ráta [67].

Mellékpajzsmirigy carcinoma esetén gondolni kell a hyperparathyreosis – állkapocs tumor szindrómára, melyért a *HRPT2* (*CDC73*) gén mutációja felelős [67,70].

1.3.1.2. Sporadikus pancreas NET

A hasnyálmirigy endokrin szigeteiből kiinduló neuroendokrin daganatok (pNET) ritkák, incidenciájuk kb. 0,2-0,3/100.000 [71,72]. A pancreasban és a gastrointestinalis traktusban legalább 17 különböző neuroendokrin sejtípust találtak [73], ezek közül néhány biológiailag aktív peptideket választ ki. A pNET-ek kb. 30%-a képes hormontermelésre: leggyakrabban insulin- vagy gastrintermelő daganatok fordulnak elő; a jellegzetes klinikai szindrómákat eredményező tumorokat funkcionálisan aktív daganatoknak nevezzük. A pNET-ek többsége nem funkcionáló, azaz vagy nem termel hormont, vagy a biológiailag aktív peptid nem okoz klinikai tüneteket (pl. pancreaticus polypeptid) [74–76]. A tünetek hiánya és a megfelelő biomarker hiánya miatt a nem funkcionáló daganatokat általában később ismerik fel [77]. A pNET betegek 60%-ában a diagnózis idejében már metasztatikus betegséget találunk, ennek ellenére prognózisa a pancreas adenocarcinomás betegekéhez képest kedvezőbb [72], a 20 éves túlélés 51% [78].

A gastroenteropancreaticus (GEP-NET) daganatok proliferációs rátája (Ki-67 indexszel jellemzett paraméter) alapján G1-G2-G3 fokozatokat különböztetünk meg. A G1-G2

neuroendokrin tumorok jól differenciáltak, míg a G3 rosszul differenciált daganatokat neuroendokrin carcinomáknak nevezük (NEC). Az utóbbi években a G3 betegcsoportban elkülönülni látszott egy alcsoport: a magas, G3 grádusú, azonban jól differenciált neuroendokrin neoplasmákat G3 neuroendokrin tumornak (NET G3) nevezük; míg a G3 rosszul differenciált daganatokra használjuk a NEC G3 elnevezést. A két alcsoport jelentősen különbözik mind a patogenezis, mind a prognózis, kezelésre adott válasz szempontjából [79]. A NEC G3 daganatok leggyakrabban a nyelőcsőben, gyomorban, pancreasban és a vastagbélben fordulnak elő; agresszívebbek, korábban metasztatizálnak; a metasztatikus betegség átlagos túlélése kemoterápia mellett 11-12 hónap [79,80]. A NET G3 daganatok a G3 csoport kb. 15-20%-át teszik ki, és többnyire a pancreasban fordulnak elő [81]. Elkülönítésük a neuroendokrin carcinomáktól differenciáció alapján gyakran nem egyértelmű [82].

A pNET esetek többsége sporadikus, ritkábban örökletes szindrómákhoz társul: a már korábban részletezett MEN1 szindrómán kívül előfordulhat von Hippel-Lindau szindrómában (VHL), neurofibromatosis 1-es típusában (NF1), sclerosis tuberosában (TSC) [28]. Magas átírási képességű vizsgálatokkal sikerült azonosítani néhány további, a tumor evolúciójáért felelős gyakori szomatikus mutációt [83,84]. Ezek a chromatin remodellingben részt vevő (*MEN1*, *DAXX*, *ATRX*) illetve tumor szuppresszor génekben (*PTEN*, *TSC2*) található meg [83]. A három leggyakoribb útvonal: a *MEN1* gén szomatikus inaktivációja felelős az esetek 44%-áért; a *DAXX* (death-domain associated protein) és *ATRX* (alpha thalassaemia/mental retardation syndrome X-linked) gének 43%-ban; az mTOR jelátviteli útvonal tagjai (*PTEN*, *TSC2*, *PIK3CA*) pedig 14%-ban érintettek [5]. Ezek a mutációk a jól differenciált NET-ekben fordulnak elő. Az irodalmi adatok alapján a rosszul differenciált, külön klinikai entitásként kezelt NEC-ek evolúciója is különbözik: gyakori microsatellita instabilitás (MSI) mellett a *TP53*, *KRAS*, *APC* és *RB* gének mutációit találjuk [5,85,86]. Egy nemrégiben megjelent, nagy esetszámot feldolgozó közlemény szerint a klinikailag sporadikus pNET-ek között a vártnál gyakrabban derül ki, hogy valójában csírasejtes mutációk okozzák; ezek közül több a DNS repairben részt vevő fehérjéket kódoló génekben (*MUTYH*, *CHEK2*, *BRCA2*) található [87].

1.3.2. Pheochromocytoma/paraganglioma

A pheochromocytomák és a paragangliomák (PPGL) chromaffin sejtekből származó ritka neuroendokrin tumorok. Kiindulhatnak a mellékvesevelőből (pheochromocytoma, PCC) és az idegrendszer paravertebralis ganglionjaiból (paraganglioma, PGL). Termelhetnek catecholaminokat: az adrenális pheochromocytomák legfőképp adrenalin (adrenergik); az extraadrenális paragangliomák noradrenalin szecernálnak (noradrenergik). A fej-nyak régióban kialakuló PGL-k jellemzően nem hormontermelőek, ezáltal tünetet sem okoznak, ami miatt felismerésük nehéz [88]. Leggyakrabban 30-50 éves kor között jelentkeznek, az öröklődő formák esetén ennél fiatalabb életkorban. A catecholaminok paroxysmalis vagy tartós hypertóniát, elsápadással, fejfájással, izzadással, palpítatioval, nyugtalansággal járó rosszulléteket, orthostaticus hypotóniát okoznak [89]. Ritkán catecholamin-krízist is okozhatnak: súlyos hypertenzió, keringési elégtelenség és sokk alakulhat ki többszervi elégtelenséggel [90].

A PPGL esetek 40%-ában autoszomális dominánsan öröklődő csírasejtes mutáció felelős a daganat kialakulásáért; jelenleg 18 hajlamosító gén ismert (pl. *TMEM127*, *MAX*, *KIF1b*, *PHD2*) [91]. Néhány esetben daganatszindróma részeként manifesztálódnak, pl. neurofibromatosis 1-es típusban (*NF1* mutáció), MEN2 szindrómában (*RET* mutáció), von Hippel-Lindau szindrómában (*VHL* mutáció), vagy az örökletes paraganglioma szindrómákban (*SDH* mutációk). További 30-40%-ban szomatikus mutáció igazolható [92]. Többnyire jóindulatú daganatok (10 éves túlélésük 96% körüli); kb. 25%-ban malignusak. Rosszindulatú pheochromocytoma akkor állapítható meg, ha a daganat nem chromaffin szövetbe tör vagy áttétet ad. Semmilyen, a malignitást előrejelző klinikai, molekuláris, hisztopatológiai vagy biokémiai tényező nem ismert. Egyes esetekben a diagnózist követő 50 évvel is kialakulhat áttét; ugyanakkor több mint 40 éven keresztül stabil metasztatikus betegséget is megfigyeltek már [93].

Morbiditásának és mortalitásának jelentős részét a hormonszekréció következtében kialakuló kardiovaszkuláris események adják. Diagnosztikájának alapvető része a 24 órás gyűjtött vizeletből mért catecholamin lebomlási termékeknek, a metanephrinoknak a kimutatása. A pheochromocytomák kezelése elsősorban sebészi (adrenalectomia), az

örökletes esetekben a mellékvesekéreg megtartásával végzett tumoreltávolítás javasolt [90].

1.4. Chromogranin A jelentősége a neuroendokrin tumorok diagnosztikájában

A graninok polypeptid prohormonok, a neuroendokrin sejtek dense core szekréciónak granuláriumainak fő összetevői, amelyek a szekréciónak granuláriumok képzését és működését befolyásolják [77,94]. A chromogranin A-ból (CgA) konvertázok hatására több bioaktív peptid képződik, különböző biológiai funkciókkal, melyekre több in vitro kísérletes bizonyíték van, az in vivo endokrin funkciójuk azonban nem tisztázott [77].

A CgA egyes sejt típusokra specifikus hormonokkal és bioaktív peptidekkel (mint pl. az insulin, glucagon, gastrin, serotonin) együtt szecernálódik a neuroendokrin sejtekből, valamint catecholaminokkal együtt a mellékvesévelő sejteiből és a szimpatikus neuronokból [77]. Normál tartománya szérumban és plazmában a meghatározás módszerétől függ, de általánosságban a felső határértéket 2-3-szor meghaladó értéket tekintik kórosnak [77].

Az elmúlt években megjelent nagyszámú közlemény tapasztalatai megkérdőjelezik a CgA hatékonyságát a neuroendokrin daganatok diagnosztikájában, utánkövetésében, prognosztikájában. Ezeket megelőzően a CgA-t szenzitív, de nem specifikus biomarkerként használtuk a neuroendokrin daganatok esetén. Majdnem az összes típusú neuroendokrin eredetű daganatra jellemző az emelkedett keringő CgA szint [77,95], azonban a tumor típusától függően szenzitivitása 47-100% között változik (100% gastrinomában, 89% phaeochromocytomában, 69% nem-funkcionáló pNET-ben) [77,96,97]. Más onkológiai és nem-onkológiai tényezők is befolyásolják a CgA szérumszintjét, ezáltal csökkentik a specificitását. Ezek közé tartozik a veseelégtelenség, nem-endokrin daganatok (pl. prostata, emlő, thymus, uterus, colon), kardiovaszkuláris betegségek, gyulladáscsökkentő bélbetegségek, krónikus gastritis valamint protonpumpa-gátló kezelés [96,98]. Korábbi közlemények – köztük az egyik munkacsoportunk kutatása – kimutatták, hogy rövid- és hosszútávú PPI vagy más savcsökkentő kezelés szignifikánsan növeli a CgA szintjét a vérben, ezáltal csökkentve annak klinikai hasznosságát

neuroendokrin daganatok kivizsgálásában [99,100]. Más, jobb biomarker hiányában a CgA az egyetlen, rutinszerűen mért keringő marker neuroendokrin daganatokban.

A CgA alacsony szenzitivitása, specificitása, pozitív és negatív prediktív értéke miatt nem állja meg a helyét biomarkerként. Diagnosztikus (0. típusú) biomarkerként való használatát elsősorban alacsony specificitása gátolja, hiszen emelkedett CgA-t találunk más, pl. gyulladós betegségekben, veseelégtelenségben [101]. Lokális NET predikciójában szenzitivitása 43%, metasztázisok esetén is csak 57% [101]. Kis méretű tumorok gyakran hyperszekréciót mutatnak, míg nagyobb méretű tumorokra alacsonyabb elválasztás jellemző [102]. Alacsony tumorterheléssel járó esetekben a CgA nem volt megbízható jelzője a terápiás válasznak (1. típusú biomarker). Több közlemény szerint a magasabb CgA szint összefüggést mutatott a rövidebb túléléssel (prognosztikus, 2. típusú biomarker), azonban ezen vizsgálati eredményeket még nem támasztották alá prospektív tanulmányokkal [101]. Összességében a CgA nem felel meg a nemzetközileg elfogadott biomarker standardoknak [103].

Az eredmények összehasonlításában jelentős nehézséget okoz a különböző assay-k használata. Az eddig használt két fő mérőmódszeren kívül – RIA (radioimmunoassay) és ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) – új, nem radioaktív mérési metódus is elérhető [101]. Nincs egységesen elfogadott módszer a CgA mérésére, jelentősen különbözik a mérőmódszerek diagnosztikus tartománya, emellett ezek szenzitivitása és specificitása is [101]. A CgA további hátránya, hogy elsősorban a tumorsejtes szekréciós aktivitásáról ad információt. Ez azonban nem tükrözi megfelelően a daganatok biológiai viselkedését, proliferációs és metabolikus aktivitását [102]. Kevésbé differenciált NET-ekben és a neuroendokrin sejtek szekrécióját is gátló szomatostatín analóg kezelés alatt gyakran alacsony CgA expressziót észlelünk.

1.5. A mikroRNS-ek, mint biomarkerek

A daganatos betegségek kezelésében alapvető fontosságú a daganat aktivitásának folyamatos követése, a kezelésre adott válasz monitorizálása. Ennek eddigi legadekvátabb eszközei a tumorból vett biopsziából származó szöveti markerek. A

betegség szoros utánkövetése („real-time”) azonban nem kivitelezhető gyakori invazív mintavételekkel. A daganatsejtből a keringésbe kerülő szekréciós termékek önmagukban nem alkalmasak a tumorsejt aktivitásának pontos meghatározására, nem tükrözik a számtalan biológiai folyamatot, amely a daganat progresszióját okozza [102,104]. Az alacsony szenzitivitású és specificitású klasszikus tumormarkerek helyett a daganatok evolúciójára jellemző, az adott egyénre specifikus biomarkerek kutatása került előtérbe. A folyadék-biopsziának (liquid biopsy) nevezett módszerrel nem invazív módon keringő tumorsejteket, tumorból származó DNS-t, mRNS-t, miRNS-t vizsgálnak vérből, vizeletből és más testnedvekből [104]. Multifaktoriális módon, azaz több marker egyidejű meghatározásával részletesebb információt kaphatunk a tumor biológiai viselkedéséről [104]. Az utóbbi években körvonalazódott a törekvés a tumorsejtek molekuláris genomikai mechanizmusainak meghatározására, a mutációk detektálása mellett a transzkripció profil, mRNS és jelátviteli útvonalak vizsgálatára [102].

A génexpresszióhoz hasonlóan a rövid, nem-kódoló miRNS-ek expressziója is sejtspecifikus; számos alapvető biológiai folyamatot regulálnak, a génexpresszió poszttranszkripcionális szintjén, a mRNS átírását csendesítve. Becslések szerint a kódoló génszakaszok mintegy 60%-át regulálják [105], ezáltal olyan esszenciális folyamatokat is, mint a proliferáció, a differenciáció, jelátviteli útvonalak, apoptózis [106–108]. Daganatos sejtekben gyakran megváltozik a miRNS-ek expressziója. A tumorigenezisben, a daganatos progresszióban, a metasztázis képzésben betöltött szerepükre utal a különböző jelátviteli útvonalakban részt vevő targetekkel való interakciójuk [109]. Teljes genom profilozás során megállapították, hogy a miRNS expressziós mintázat összefügg a daganatok típusával, grádjával és a klinikai jellemzőivel, ezáltal alkalmasak lehetnek biomarkernek [104,110,111]. Daganatos betegségek mellett neurológiai, kardiovaszkuláris betegségekben, diabéteszben, virális infekciókban és más kórfolyamatokban is deregulált miRNS mintázatot találtak [112].

A vérből kimutatott, keringő miRNS-ek eredetéről több elképzelés van. Származhatnak elpusztult sejtekből (nekrózis, gyulladás, szövetkárosodás); aktív szekrécióval a sejtekből származó mikrovezikulákból vagy exoszómákból; vagy fehérjekomplexekkel együtt kiválasztva a sejtekből. Utóbbi két esetben a miRNS-ek védettek az RNS bontó enzimek (RNázok) hatásától is. Jelentős előnyük, hogy a testnedvekben, a keringésben és tárolás alatt is stabilak. Az életkor, a nem, a testsúly, sőt, az étkezés is jelentősen befolyásolja a

miRNS szinteket. Az onkogének hasonlóságára a daganatokban felülexpresszált és a tumor evolúcióját elősegítő miRNS-eket oncomiR-nek nevezzük, míg az alulexpresszált miRNS-eknek tumor szuppresszor szerepe valószínű [108,112–114]. Egy miRNS több különböző célszövetet is targetálhat; ugyanakkor egy gén expresszióját több különböző miRNS is regulálhatja. Tovább nehezíti klinikai megítélésüket, hogy egy daganatban oncomiR-ként funkcionáló miRNS egy másik tumorban tumor szuppresszor lehet.

A Ras gént célzó let-7 család volt az első közölt tumorszuppresszor miR tulajdonságú csoport [115]. Az onco-miR tulajdonságú miR-21-ről már 2007-ben leírták, hogy a *PTEN*-t célozza, ezáltal elősegíti az inváziót és a migrációt [112]. Magasabb szintjét több daganattípusban igazolták: glioblastomában, emlő carcinomában, colorectalis és tüdő daganatokban és több más malignitásban [112]. A miR-96 a *KRAS* downregulációja által, tumor szuppresszor hatást kifejtve lassította a tumoros növekedést pancreas carcinomában [116]; míg glioma sejtekben a miR-96 oncomiR hatásának csendesítése által csökkent a glioma sejtek proliferációja [117]. A miR-29a tumor szuppresszorként viselkedik tüdőrákban, hepatocellularis carcinomában és leukémiában, ezzel szemben emelkedett plazmaszintjét találták előrehaladott colorectalis daganatos betegekben és ovárium carcinomában [112].

A keringésben megtalálható miRNS-ek biomarkerként való alkalmazására több daganattípusban is találunk már példát. Diagnosztikus és prognosztikus effektusokon túl segíthetnek a daganatok altípusainak, szövettanilag nehezen differenciálható eseteinek elkülönítésében; hasznukat vehetjük a tumoros progresszió követésében; a daganatellenes kezelés terápiai effektusának meghatározásában [118]. Felülexpresszálnak találták például a miR-18a-t colorectális carcinomában szenvedő betegekben [119]; ezen felül elkülönítette a precancerosus stádiumú adenomás betegeket az egészségesektől a korai diagnosztika során [120]. A miR-155 nemcsak elkülönítette az emlő carcinomás betegeket az egészséges kontrolltól, de a kemoterápiát és műtétet követően csökkenő szintje miatt a terápiai hatást jelző biomarkerként is szolgálhat [121].

Az esetek döntő többségében a keringő és a tumorszövetben mért miRNS szintek szignifikánsan konkordánsak [122]. A néhány esetben megfigyelt inverz kapcsolatot egy eddig nem tisztázott, de feltehetően lényeges biológiai jelenség magyarázza [122]. Több esetben igazolták, hogy daganatos betegekben a keringésben magasan expresszált

miRNS-ek szintje a tumor eltávolítása után normál szintre áll vissza, ami arra utal, hogy a keringő miR-ek szintje a tumor miR-ek expresszióját tükrözi [122].

A biomarkerek alkalmazásának alapvető feltétele a magas szenzitivitás és specificitás. A potenciálisan biomarkerként szolgáló keringő miRNS-ek többsége egészségesekben is megtalálható; a betegek és egészséges kontrollok közötti expressziójuknak különbsége azonban többnyire kicsi [122]. Az elmúlt években egyre gyakrabban használják miRNS-ek kombinációját a diagnosztikus erő növelésére. Egy 15 miRNS-ből álló szett 91,4%-os diagnosztikus pontossággal különítette el a tüdőrákos betegeket a kontrolloktól [123]; míg hólyagcarcinomás betegeken 7 miRNS felhasználásával érték el 97%-os diagnosztikus pontosságot [124].

Néhány évvel Modlin és munkatársai a neuroendokrin tumorok transzkriptom-alapú profilozását dolgozták ki. Meghatározták a hasonlóságokat a daganatszövetből származó és a keringő génexpressziós mintázatban, melyből kizárták a normál szöveti expresszióra illetve más daganatokra (pl. emlő, vastagbél) jellemző géneket. Így 51 különböző, neuroendokrin daganatokhoz kapcsolódó keringő transzkriptet tartalmazó multianalit biomarkert (NETest) határoztak meg, amelyet jelentős elemszámú kontroll csoporton validáltak. A NETest képes azonosítani a különböző típusú neuroendokrin daganatokat, még azokat a kisméretű tumorokat is, amelyeket képalkotó eljárások nem mutatnak ki; meghatározható a stabil vagy progresszív betegség. Szignifikánsan szenzitívebb és hatékonyabb diagnosztikus, terápiás és prognosztikus módszernek bizonyult a neuroendokrin daganatok esetén az önálló biomarkerekhez képest [102] (szenzitivitása, specificitása és diagnosztikus pontossága is 90% feletti); bár használhatóságát elérhetősége és ára korlátozhatja [125].

1.5.1 Eltérően expresszálódó miRNS-ek PHPT-ben

Genetikai tényezőkön kívül epigenetikai mechanizmusok is szerepet játszhatnak a PHPT kialakulásában [126]. Több vizsgálatban találtak a parathyroid adenomát és carcinomát elkülönítő miRNS-eket [127]. Luzzi és munkatársai bizonyították először a miRNS-ek jelentőségét a MEN1-asszociált parathyroid tumorigenezisben. A miR-24 a *MEN1* gén

konzervált 3' UTR szakaszát célozza, ezáltal, mint onco-miR, poszttranszkripcionálisan csendesítve a *menin* expressziót, ezzel az epigenetikai mechanizmussal utánozva a Knudson-féle második találatot [45]. Közleményünk megjelenését követően rövid időn belül publikáltak két tanulmányt a témában. Hwang és munkatársai szintén a sporadikus és örökletes mellékpajzsmirigy daganatok elkülönítésére alkalmas markert kerestek miRNS profilozás segítségével. Eredményeik alapján a miR-199b-5p alkalmas lehet a két daganattípus elkülönítésére [128]. Luzi és munkatársai szintén miRNS microarray módszerrel hasonlítottak össze *MEN1*-asszociált és sporadikus PHPT szöveteket. Validálást követően megállapították, hogy a miR-4258, a miR-664 és miR-1301 szignifikánsan eltérően expresszálódott LOH (*MEN1* és *menin* negatív) és nem-LOH (egy megtartott *MEN1* allél és részleges *menin* expresszió) szövetek között, tehát expressziójukat feltehetően a *menin* szabályozza. Emellett miRNS target analízissel azt találták, hogy a fenti 3 miRNS familiáris mellékpajzsmirigy daganatot okozó géneket céloznak, így valószínűleg részt vesznek a (nem csak *MEN1*-asszociált) PHPT tumorigenezisben [46]. Yavropoulou és munkatársai nemrég megjelent közleményükben tíz, a parathyroid tumorigenezisben részt vevő génekkel interakcióban lévő miRNS-ek expresszióját vizsgálták sporadikus PHPT esetekben a szövetben és a keringésben egészséges kontrollokhoz képest. A *MEN1*, *CaSR*, *CDKN1B*, *CTNNB1* és *CCND1* géneket reguláló miRNS-ek deregulációja rámutat azok jelentőségére a mellékpajzsmirigy daganatok kialakulásában [129].

1.5.2. Eltérően expresszálódó miRNS-ek pNET-ben

Közleményünk megjelenéséig csak két tanulmány elemezte a pNET-ek miRNS expressziós profilját. A publikációnkban is felhasznált adatbázison végzett vizsgálatban a miR-103 és miR-107 emelkedett, míg a miR-155 csökkent expressziója elkülönítette a sporadikus pancreas NET-eket és adenocarcinómákat az egészséges pancreas szövetről; emellett a jól ismert miR-21 onco-miR magasabb szintje összefüggött a magas proliferációs indexszel és a metasztázisok jelenlétével pNET-ben [130]. A miR-642 expressziója korrelált a Ki-67 indexszel, valamint a miR-210 a metasztatikus betegséggel [131]. A miR-193b pNET szövetben és a betegek szérumban is felülexpresszált volt,

amely utalhat a tumor progresszióban betöltött szerepére, illetve ezáltal potenciális biomarkerként is szolgálhat [131]. Közleményünk megjelenésével közel egyidőben publikáltak Malczewska és munkatársai egy 22 vizsgálatot összefoglaló tanulmányt, amelyben a GEP-NET-ben talált, potenciálisan biomarker miRNS-ekről szóló vizsgálatokat reanalizáltak [108]. A fent említettek mellett a következőekben ebből a legfontosabb eredményeket emelném ki. Több, a 14q32 régióban kódolt miRNS, köztük a miR-122/451 cluster overexpresszióját igazolták insulinomában normál szigetsejtes mintákhoz képest. Pancreas β sejtvonalon vizsgálva a miR-144 a *PTEN*-t targetálva az Akt útvonalat aktiválta; míg a miR-451 a sejtciklust reguláló p19-et célozta, mindkét esetben a β sejt proliferációt elősegítve [118,132]. Korábbi miRNS microarray adatok reanalízise alapján három clusterbe sorolták a pNET-eket [133], azonban a miRNS-ek prognosztikus jelentőségét nem vizsgálták részletesen. Egy 37 pNET mintából álló vizsgálatban összefüggésbe hozták a miR-196a szintjét a betegség stádiumával és a mitotikus aktivitással, ez alapján jó negatív prognosztikus faktornak véleményezték [134]. Nagyobb esetszámú vizsgálatban miRNS profilozás során összefüggést találtak a miR-3653 magasabb szintje és a metasztatikus pNET betegség között [135]. Cavalcanti és munkatársai egy 8 miR-ből álló panel összefüggését mutatták ki a gastrointestinális NET-ek grade-jével [136].

1.5.3 Eltérően expresszálódó miRNS-ek PPGL-ben

A PPGL-k miRNS mintázatáról szóló néhány vizsgálatban elsősorban az öröklődő szindrómához kapcsolódó phaeochromocytomákat és a benignus vs. malignus PCC-k közötti eltéréseket elemezték [137]. Munkacsoportunk 2010-ben sporadikus és öröklődő, recidív és nem recidív PCC-k vizsgálatával azt találta, hogy a miR-1225-3p jó szenzitivitással és specificitással különböztette meg a sporadikus recidív daganatokat a nem recidívektől [138]. Meyer-Rochow és munkatársai a malignus PCC diagnosztikus markerének találták a miR-483-5p, a miR-15a és a miR-16 miR-eket [139]. Patterson és munkatársai megerősítették a miR-483-5p diagnosztikus erejét, emellett a miR-101 és miR-183 miR-eket is diagnosztikus erejűnek találták a malignus és benignus PCC-k elkülönítésében [140]. Szintén magasabbnak találták a miR-101 szintjét malignus PCC-

ben a benignushoz és egészséges kontrollokhöz képest is, valamint magasabb volt *SDHD* mutációt hordozókban a benignus PCC-khez képest [141]. A pheochromocytomák különböző genetikai típusának megfelelően azok miRNS profilja is különböző – miR-139-3p, miR-541, miR-765 és miR-133b szintje emelkedett *VHL* mutációnál; miR-96 és miR-183 felülexpresszált *SDHB* mutációnál; miR-885-5p szintje magasabb *RET* mutációnál; míg a miR-137 és miR-382 a PPGL esetek túlnyomó részében felülexpresszált, – ami felveti a miRNS-ek szerepét a daganat evolúciójában [118,142].

2. Célkitűzések

Doktori munkámban örökletes és sporadikus neuroendokrin daganatok klinikai, genetikai és epigenetikai vizsgálatával foglalkoztam.

1. Munkám első célja volt összefoglalni és elemezni az összes, *MEN1* genetikai vizsgálatra beküldött beteg klinikai és genetikai adatát, valamint létrehozni a magyarországi *MEN1* adatbázist. A mutáció-pozitív és -negatív esetek összehasonlításával olyan tulajdonságokat kerestem, amelyek előrejelzik a pozitív genetikai tesztet, valamint megvizsgáltam a *MEN1* mutációk hatását a fenotípus kialakulásában.

2. Korábbi közlemények alapján a *MEN1*-et érintő genetikai eltérések a fő patogén tényezők PHPT-ben, ezért a továbbiakban vizsgálatunk célja volt a *MEN1* mutációk és a potenciálisan *MEN1* gént targetáló miRNS-ek hatásának vizsgálata a menin deficienciára *MEN1*-asszociált és sporadikus PHPT szövetekben.

3. Bár a miRNS biomarkereket széles körben vizsgálták különböző daganatokban, kevés adat ismert a pancreas neuroendokrin tumorokban kifejeződő miRNS-ekről. PNET-ek szöveti miRNS expressziójának vizsgálatával olyan proliferációtól függően eltérő expressziójú miRNS-eket kerestünk, amelyek prognosztikus markerként szolgálhatnak.

4. Napjainkig a leggyakrabban használt, nem elég szenzitív és specifikus tumormarker a pancreas neuroendokrin tumorok diagnosztikájában és kezelésében a szérumban CgA. PNET betegek keringő miRNS-einek vizsgálatával új biomarkereket kerestem. Phaeochromocytomás betegek, valamint protonpumpa inhibitor szedő és nem-szedő kontrollok bevonásával a miRNS-ek diagnosztikus hatékonyságát kívántam meghatározni a CgA-hoz képest.

3. Módszerek

3.1. MEN1 szindrómás betegek vizsgálata

3.1.1. A *MEN1* genetikai vizsgálatra beküldött betegek adatai

A *MEN1* gén genetikai vizsgálata Magyarországon 2001 óta elérhető Endokrinológiai és Genetikai Laboratóriumunkban. 2001. január és 2017. december között Laboratóriumunkba *MEN1* genetikai vizsgálatra referált összes beteget bevontuk vizsgálatunkba. A betegek elérhető adatait retrospektíve gyűjtöttem össze. Az összesen 189 esetből 134 probandot és 55 családtagjukat teszteltük csírasejtes *MEN1* mutációkra. A genetikailag konfirmált MEN1 proband betegek összes elérhető elsőfokú családtagját bevontuk a vizsgálatba. A 134 probandból 104 esetben teljesültek a Nemzetközi Endokrin Társaság (The Endocrine Society) 2012-ben megfogalmazott *MEN1* mutáció-analízis kritériumai (lásd 1.2.3. fejezet) [11]. A korlátozottan rendelkezésre álló családi anamnézis miatt a betegség familiáris vagy sporadikus eredete nem minden esetben volt egyértelmű. A klinikai információkat a kezelő endokrinológusoktól gyűjtöttem össze. Az egyes manifesztációk diagnózisát az adott irányelveknek megfelelően állították fel [11]. Az érintett szervekben kialakuló daganatok további rendszeres szűrővizsgálatát mutáció-pozitív és klinikailag MEN1 szindrómás mutáció-negatív betegekben végezték el, a széles körben elfogadott ajánlásoknak megfelelően [9,11]. Elvégeztem a klinikai adatok, laboratóriumi, képalkotó és szövettani leletek együttes analízisét. A betegek tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozatot írtak alá, a vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (ETT-TUKEB 4457/2012/EKU).

3.1.2. A *MEN1* és *CDKN1B* gének szekvenálása

A betegséget okozó csírasejtes *MEN1* gén mutációinak vizsgálatát minden esetben perifériás vérből izolált DNS-ből végeztük el. A *MEN1* exonjait polimeráz láncreakcióval

(polimerase chain reaction, PCR) módszerrel amplifikáltuk, Morelli és munkatársai munkája alapján tervezett primerekkel, a munkacsoportunk által korábban leírt protokollok szerint [143,144]. A DNS szekvenálás bidirekcionális Sanger dideoxy módszerrel történt. Az új *MEN1* mutációkat a klinikai képpel való összefüggés alapján patogénnek tekintettük. "High-impact" mutációk közé soroltuk a frame-shift, nonsense és splice régió mutációit és a nagy deléciókat. A missense és in-frame mutációkat "low-impact" mutációknak tekintettük.

A *MEN1* gén nagy delécióinak és a *CDKN1B* gén mutációinak ritka előfordulása miatt további genetikai vizsgálatokat abban a 15 *MEN1*-gyanús, *MEN1*-negatív esetben végeztünk, akiknél mindhárom major manifesztáció kialakult vagy két major manifesztációt hordoztak 40 éves kor alatt. Ezekben a probandokban MLPA vizsgálatot végeztünk a nagy *MEN1* deléciók detektálására, SALSA MLPA próbamix kit P017-D1 használatával a gyártó utasításainak megfelelően (MRC-Holland, Amsterdam, Hollandia). A *CDKN1B* mutációk vizsgálatára a gén két exonját PCR-amplifikáltuk erre tervezett, kereskedelemben kapható primerekkel, majd direkt Sanger módszerrel megszekvenáltuk. A primer párok szekvenciái: exon 1 forward primer (E1F): 5' CGC TTT GTT TTG TTC GGT TT 3'; exon 1 reverz primer (E1R): 5' ATA CGC CGA AAA GCA AGC TA 3'; exon 2 forward primer (E2F): 5' TAA AAG CCA CTG GGG ATG AC 3'; exon 2 reverz primer (E2R): 5' CAG TGC GTG CTC CTT TAG TG 3'.

3.2. Sporadikus és *MEN1*-asszociált PHPT szövetminták vizsgálata

3.2.1. PHPT betegek és a felhasznált szövetminták

56 mellékpajzsmirigy szövetet gyűjtöttünk össze és analizáltunk. 16 PHPT szövet *MEN1* csírasejtes mutációt hordozó betegről származott. A 40 sporadikus PHPT szövet kiválasztását, ezek hisztopatológiai vizsgálatát és a PHPT klinikai diagnózisának megerősítését expert patológus (Dr. Borka Katalin, II. sz. Patológiai Intézet, Semmelweis Egyetem) végezte el. A szöveteket csírasejtes *MEN1* mutációra tesztelt, mutáció-negatív esetek közül választotta ki. A preoperatív kalcium és parathormon (PTH) szinteket a

Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetben határozták meg. A vizsgálatot az Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (ETT-TUKEB 4457/2012/EKU).

3.2.2. Menin és Ki-67 expresszió vizsgálata

Az immunhisztokémiai vizsgálatokat a II. sz. Patológiai Intézetben Dr. Borka Katalin végezte. Formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE), 3-4 µm-es metszeteket használtunk. Deparaffináció (EZ Prep Concentrate 10X, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ), endogén peroxidáz blokkolás és antigén feltárás után (CC1, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) monoklonális egér anti-Ki-67 antitestet használtunk (Clone MIB-1, DAKO, Glostrup, Dánia, katalógusszám: M7240) primer antitestként 1:200 hígításban, 42°C-on 30 percig. Ugyanilyen előkezelést követően poliklonális nyúl menin antitestet használtunk (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság, katalógusszám: ab2605, poliklonális antitest multiplex epitópok detektálására az 575. aminosav és a C-terminus között, 1:100 hígításban) 32 percig 42°C-on. Az immunhisztokémiai festést HRP multimer alapú, biotinmentes detekciós technikával végeztük automatizált rendszeren, a gyártó protokolljának megfelelően (Ventana Benchmark XT automate, Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Vizualizálásra UltraView™ Universal DAB Detection Kit-et használtunk (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). A menin expresszió esetében humán pancreas és normál mellékpajzsmirigy szövetet, míg a Ki-67 expresszió esetében nyirokcsomót használtunk pozitív kontrollként. Negatív kontroll céljából a primer antitestek helyett negatív kontroll antitest reagenst használtunk (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ). Ki-67 esetében a nukleáris festődést, míg menin esetében nukleáris és cytoplazmatikus festődést is pozitív eredményként fogadtuk el. Ki-67 esetében a pozitívan festődő sejtek százalékos arányát határoztuk meg. A proliferatív aktivitás megítélését két független módon végeztük el: egyrészt meghatároztuk a mitotikus sejtek számát 10 nagy nagyítású látótérben (HPF, high power field); másrészt megadtuk a pozitív tumorsejtek százalékos arányát a "hot spot" régiókban. A diffúz és homogén menin expresszió miatt a menin-pozitív sejtek százalékos aránya helyett egy négyfokozatú skála alapján osztályoztuk a menin

immunoreaktivitásának intenzitását (0 = hiányzó festődés, 1 = gyenge, 2 = közepes, 3 = erős festődés) [145]. Külön osztályoztuk a nukleáris és a cytoplazmatikus festődést. A nukleáris menin festődés hiányát menin-negatívnak ítéltük meg.

3.2.3. Szomatikus *MEN1* mutációk vizsgálata sporadikus PHPT szövetekben

A *MEN1* szindrómás esetekben a betegségkókozó csírasejtes *MEN1* mutációt a korábban leírt módszerekkel azonosítottuk (3.1.2. fejezet). Minden sporadikus, nem-szindrómás PHPT esetben elvégeztük a szomatikus *MEN1* mutációk analizisét mellékpajzsmirigy szövetből. 4x20 µm-es FFPE metszetekből genomiális DNS-t izoláltunk (ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System, Promega). A *MEN1* kódoló régióját PCR-rel amplifikáltuk egy korábbi közleményben is használt primerekkel [146], és a PCR termékeket a gold standardként elfogadott bidirekcionális Sanger DNS szekvenálással elemeztük.

3.2.4. A *MEN1* gént célzó miRNS-ek *in silico* vizsgálata

In silico módszerrel kerestünk a *MEN1* 3' UTR régióját potenciálisan célzó miRNS-eket. Öt, különböző algoritmust használó online miRNS target predikciós szoftvert használtunk [147]: Diana microT 3.0 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/> [148]); miRWalk (<http://www.umm.uniheidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/index.html> [149]); microCosm Targets 5.0 (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/> [150]); PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/> [151]); TargetScan (<http://www.targetscan.org/> [152]). Azokat a miRNS-eket választottuk ki további vizsgálatra, amelyeket legalább két szoftver azonosított. Így összesen 6 miRNS-t választottunk ki kvantitatív valós idejű PCR analizisre (quantitative real-time PCR, qRT-PCR): miR-24, miR-28, miR-326, miR-484, miR-637 és miR-744.

3.2.5. A kiválasztott miRNS-ek szöveti expressziójának meghatározása valós idejű kvantitatív PCR-rel

FFPE PHPT metszetekből totál RNS-t izoláltunk a gyártó instrukcióinak megfelelően (Ambion RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific). Minden egyes mintához négy 20 µm-es metszetet használtunk. Az RNS koncentrációt NanoDrop 1000 spektrofotométerrel határoztuk meg (Thermo Fisher Scientific).

A qRT-PCR-hez 5 ng totál RNS reverz transzkripcióját (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Life Technologies), majd kvantifikációját végeztük el miRNS-specifikus TaqMan próbákkal (miR-24, ID: 000402; miR-28, ID: 000411; miR-326, ID: 000542; miR-484, ID: 001821; miR-637, ID: 001581; miR-744, ID: 002324; RNU6B, ID: 001093; Applied Biosystems, Life Technologies) a gyártó protokolljának megfelelően, 7500 Fast Real-time PCR készüléken (Applied Biosystems, Life Technologies). A miRNS expressziót ΔC_t módszerrel a RNU6B relatív expressziójához normalizáltuk [cikk 30]. Minden esetben két technikai párhuzamos mérésével végeztük a vizsgálatot.

3.3. miRNS-ek vizsgálata pancreas NET szövetmintákban

3.3.1. A kiválasztott pNET betegek és szövetek

1999 és 2015 között a Semmelweis Egyetem II.sz. Patológiai Intézetből 63 független, primer pNET mintát vontunk be a vizsgálatba (validációs kohorsz). A rutin patológiai vizsgálatot, a hisztopatológiai analízist, beleértve a Ki-67 immunhisztokémiai vizsgálatot és a mitózisok számának meghatározását, a pNET diagnózisának confirmálását expert patológus végezte (Dr. Borika Katalin). A Ki-67 immunhisztokémiai vizsgálat a 3.2.2. fejezetben leírtaknak megfelelően, monoklonális egér anti-Ki-67 antitesttel történt (Clone MIB-1, DAKO, Glostrup, Dánia, katalógusszám: M7240). A pNET grádus (grade) meghatározás a WHO 2017-ben megjelent klasszifikációja alapján történt, ahol a

magasabb grádus magasabb Ki-67 indexet és mitózisszámot jelöl (WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs, WHO Press, 2017).

3.3.2. Az elérhető miRNS microarray adatok *in silico* reanalízise

A korábban publikált miRNS expressziós profilokat letöltöttük a Gene Expression Omnibus adatbázisból (GEO ID: GSE73350) [130] és a GeneSpring 12.6 szoftver (Agilent Technologies) segítségével reanalizáltuk. Összesen 40 pNET szövet miRNS expressziós profilját vontuk be a vizsgálatba ("discovery", felderítő kohorsz).

3.3.3. A kiválasztott miRNS-ek expressziójának meghatározása valós idejű kvantitatív PCR-rel

FFPE metszetekből totál RNS-t izoláltunk (Ambion RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit, Thermo Fisher Scientific), a 3.2.5. fejezetben leírtakhoz hasonlóan. 5 ng totál RNS reverz transzkripcióját (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Life Technologies) egyedi TaqMan miRNS assay-k segítségével végeztük el (miR-21, ID: 000397; miR-29a, ID: 002112; miR-10a, ID: 125 000387; miR-106b, ID: 000442; miR-101, ID: 002253; RNU6B, ID: 001093); majd a miRNS expresszió mértékét 7500 Fast Real-time PCR készüléken (Thermo Fisher Scientific) vizsgáltuk a TaqMan miRNS assay-k leírásának megfelelően. A miRNS expressziót az RNU6B relatív expressziójához normalizáltuk, a ΔC_t módszerrel. Minden esetben három technikai párhuzamost használtunk.

3.4. Chromogranin A mérés és keringő miRNS profilozás egészséges és NET mintákban

3.4.1. Betegek és kontrollok

A vizsgálatba bevont mintákat a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetébe szérumszint meghatározásra beküldött minták közül választottam ki, 2017. november 1. és 2019. július 24. között (12. táblázat) A miRNS expresszió vizsgálata és a CgA szint meghatározása tehát minden esetben ugyanazon mintából történt. Összesen 74 mintát vizsgáltunk meg: 25 pancreas neuroendokrin tumorban szenvedő, 20 phaeochromocytomás-paragangliomás beteg mintáját, valamint 29 mintát 24 kontroll személytől.

A vizsgálat első, felderítő szakaszában ("exploratory study") összesen 24 mintán határoztuk meg a keringő miRNS expressziót, újgenerációs szekvenálással. A 8 pNET-es beteg közül 4 esetben alacsony (CgA < 100 ng/mL), a másik 4 esetben pedig magas CgA (> 100 ng/mL) értékeket mértünk ugyanabból a szérummintából. További 8 phaeochromocytomás és 8 kontroll mintát választottam ki. A 8 kontroll minta 6 egészséges személytől származik. Ketten közülük protonpumpa-gátló kezelésben részesültek; mind a kezelés előtti, mind a kezelés utáni mintákat belefoglaltam felderítő vizsgálatunkba.

A vizsgálat második, validációs szakaszában ("validation study") a felderítő kohorsz mintáin felül további 17 pNET-es és 12 PPGL-es beteg szérummintáját használtam fel. A validációs kohorszba a felderítő kohorsz 16 (8 pNET és 8 PPGL) mintájához életkor és nem-szerint illesztett kontroll mintákat választottam. Ezek közül egy kontroll minta megegyezik a felderítő kohorsz egyik kontroll mintájával. További 3 olyan kontroll személyt választottam, akiknek PPI terhelés előtti és utáni mintáit is vizsgáltuk. A validációs kohorszba így összesen 22 kontroll minta került, 18 különböző személytől.

Az összes pancreas neuroendokrin daganatos beteg nem funkcionáló és metasztatikus NET-ben szenvedett. A 12 nőbeteg és 13 férfibeteg átlagéletkora 63,4 év volt. 9 betegnél 100 ng/mL-nél alacsonyabb, 16 betegnél 100 ng/mL-nél magasabb CgA értékeket találtunk. A daganatok grade-jének meghatározása a Ki-67 index alapján a WHO 2017-es klasszifikációja szerint történt.

A PPGL-es betegek (12 nő és 8 férfi) átlagéletkora 41,8 év volt. 8 esetben benignus, 11 esetben malignus daganatban (1 bilaterális, 1 lokálisan recidiváló, 9 metasztatikus) szenvedtek, egy esetről pedig nem állt rendelkezésre több információ. 14 betegnek sporadikus, 6-nak pedig öröklődő daganata volt. A csírasejtes mutációk a már ismert,

betegségokozó mutációk közül kerültek ki. Az összes PPGL-ben szenvedő betegnél magas CgA értékeket mértünk (CgA átlagosan 1751 ng/mL).

Összesen 24 kontroll személytől származó 29 szérumszámítást vizsgáltam. A felderítő vizsgálat 6 kontrollja egészséges önkéntes volt, közülük 2 esetben végeztünk PPI terhelést. A validációs kohorszba a felderítő vizsgálat 16 tumoros betegéhez életkor és nem szerint illesztett 16 kontroll személyből egy az előbb említett 6 egészséges önkéntes közül került ki. További 3 olyan kontrollt választottam, akiknél PPI szedés előtti és utáni minták is rendelkezésre álltak. Összesen tehát 5 kontroll személy esetében történt magas dózissal, legalább 2 hétig tartó PPI szedés [100]. A kontroll esetek egyikének sem volt endokrin vagy daganatos betegsége vagy veseelégtelensége.

A klinikai adatokat a Semmelweis Egyetem MedSol rendszeréből nyertük. A vizsgálatokat a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB 4457/2012/EKU, 2012. február 2.) és a Nemzeti Népegészségügyi Központ (41189-7/2018/EÜIG, 2018. december 13.) jóváhagyta.

A szérumszámításokat a vérvételt követő egy órán belül centrifugálással szeparáltam (3000xg, 10 percig, 4°C-on). A mintákat felhasználásig -20°C-on tároltam.

3.4.2. A szérumszámítás chromogranin A mérése

A chromogranin A mérést rutin diagnosztikai keretek között végeztük, CGA-RIACT kompetitív radioimmunoassay módszerrel (Cisbio Bioassays, Codolet, Franciaország), RIA-mat-280 gamma számláló készüléken (Byk-Sangtec Diagnostica, Dietzenbach, Németország), a gyártói előírásoknak megfelelően.

3.4.3. Keringő miRNS-ek profilozása újgenerációs szekvenálással

A keringő miRNS-ek expressziójának méréséhez a szérumszámításokat jégen való felolvasztás után centrifugálással (16.000xg, 15 percig, 4°C-on) izoláltam a trombocytáktól, majd 200 µl szérumból teljes RNS-t izoláltam miRNeasy Serum/Plasma

Kit (Qiagen, Hilden, Németország) használatával, a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS extrakció közben normalizálás céljából cel-miR-39-3p spike-in kontrollt (Qiagen) adtam minden mintához. A miRNS-eket is tartalmazó izolált teljes RNS-t további felhasználásig -80°C-on tároltam.

5 µl teljes RNS-ből QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen) segítségével, reverz transzkripcióval cDNS könyvtárat készítettem, a gyári protokollnak megfelelően. A minták a reakció közben egyedi molekuláris indexeket (unique molecular index, UMI) kaptak. A megfelelő, miRNS méretű könyvtárak jelenlétét Agilent 2100 Bioanalyzer eszközön High Sensitivity DNA Analysis Kit (Agilent Technologies) segítségével ellenőriztem. A könyvtárak koncentrációját Qubit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztam meg. Az újgenerációs szekvenálást (NGS) Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) készüléken végeztem.

Az adatok bioinformatikai analízisének első lépésében a cutadapt program (<http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>) segítségével eltávolítottuk a read-ekről a 3' és 5' adaptereket. A szekvenciákat a bowtie algoritmussal (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) a miRBase v21 adatbázisban található érett miRNS szekvenciákra illesztettük. A minták közötti miRNS expressziós különbségeket az UMI (unique molecular index) read számok alapján kalkuláltuk, amelyhez a másodlagos adatelemzés során TMM normalizálást (Trimmed Mean of the M-values) használtunk [153].

3.4.4. A kiválasztott miRNS-ek expressziójának validálása valós idejű kvantitatív PCR-rel

A teljes RNS reverz transzkripciójához TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtam. A miRNS-ek expressziójának meghatározásához a következő egyedi Advanced TaqMan miRNS Assay-eket (Thermo Fisher Scientific) használtam, a gyártó utasításainak megfelelően: cel-miR-39-3p: 478293_mir; hsa-let-7b-5p: 478575_mir; hsa-let-7i-5p: 478375_mir; hsa-miR-143-3p: 477912_mir; hsa-miR-203a-3p: 478316_mir; hsa-miR-30d-5p:

478606_mir; hsa-miR-451a: 478107_mir; hsa-miR-486-5p: 478128_mir. Belső kontrollként a már említett cel-miR-39-3p szolgált. A valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) vizsgálatokat Quant Studio 7 (Thermo Fisher Scientific) készüléken, 3 technikai párhuzamos alkalmazásával végeztem. A miRNS expresszió meghatározásához a ddCt módszert használtuk, a fold change értékeket a 2^{-ddCt} képlettel határoztuk meg.

A keringő, szérumból kimutatott miRNS-ek potenciális eredetének felderítésére, illetve a szöveti és szérumból kimutatott miRNS expressziós profil összehasonlítására irodalomkutatást végeztünk. 7 pNET-es mintákon [130–132,134,154–156] és 5 PPGL mintákon [138–141,157] végzett kutatás eredményeit gyűjtöttük össze és hasonlítottuk össze a vizsgálatunkban találtakal.

3.5. Statisztikai analízis

A statisztikai analízist IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM, Armonk, NY) valamint Dell Statistica (version 13., Dell Inc. (2016)) szoftverekkel végeztük. A mutációs státusz és a klinikai manifesztációk közti korrelációk, a nemek közti megoszlás vizsgálatára χ^2 és Fisher-egzakt tesztet használtunk. A csoportok közti különbségeket az életkor, a mellékpajzsmirigy adenoma legnagyobb átmérője, a plazma PTH és szérumból kimutatott kalcium (Ca^{2+}) szint és a miRNS-ek expressziója (ΔCt értékek) tekintetében Student-féle T-tesztet végeztük. A hisztopatológiai különbségeket, így a mitosist, a Ki-67 indexet és a menin festődést a csoportok között Mann-Whitney U-tesztet vizsgáltuk. Az életkor-függő penetranciát Kaplan-Meier görbével ábrázoltuk és log-rank (Mantel-Cox) tesztet alkalmaztunk.

A korábbi microarray adatok statisztikai analízisét a korábban említettnek megfelelően a GeneSpring 12.6 szoftverrel végeztük. A tumor grade szerinti miRNS expressziós eltéréseket (ΔCt értékek) egyutas ANOVA elemzést követően Tukey-féle Honestly Significant Difference poszt-hoc teszt és többszörös összehasonlításoknál a Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával végeztük. A hierarchikus klaszteranalízist a Morpheus online szoftverrel végeztük (<https://software.broadinstitute.org/morpheus/>). Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk tesztet vizsgáltuk.

A qRT-PCR mérések eredményeit Graphpad Prism Version 6 szoftverrel elemeztük. A szignifikánsan eltérő expressziójú miRNS-ek esetén – mind a felderítő, mind a validációs kohorszban – Cox-féle regressziós modellt használtunk egyváltozós és többváltozós analízishez, a miRNS-ek túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálatára.

A keringő miRNS expressziós vizsgálatunkban a vizsgálat kezdeti, explorációs szakaszában végzett NGS eredmények alapján egy online elérhető szoftver segítségével (<http://powerandsamplesize.com/Calculators/>) számoltam ki a validációs vizsgálatához szükséges mintaszámot, >80%-os statisztikai erő (power) és p érték <0,05 mellett. Az így kapott esetszámoknál minden csoport esetében nagyobb mintaszámot használtam. A csoportok közötti differenciáláshoz az eloszlástól és a csoportok számától függően kétmintás T-próbát vagy Mann-Whitney U tesztet és egyutas ANOVA-t követő Tukey-féle post-hoc tesztet használtunk. A hierarchikus cluster elemzéshez complete linkage módszert használtunk Kendall-féle Tau függvény alapján. A CgA-nak és a miRNS-eknek a csoportok közötti diszkriminációs erejét receiver-operator characteristic (ROC) analízissel mértük. Bináris logisztikus regressziós modellt alkalmaztunk a miRNS expresszió és a PPGL/pNET-ek incidenciája közötti összefüggés felderítésére és a legjobb modell azonosítására. A diagnosztikus pontosságot (accuracy) a következőképpen számoltuk: $(VP+VN)/(VP+VN+ÁP+ÁN)$ =a valós eredmények/összes kimenetel. (VP: valódi pozitív; VN: valódi negatív; ÁP: álpozitív; ÁN: álnegatív). Ebben a vizsgálatban a statisztikai számításokat az R statisztikai programmal végeztük.

Minden összehasonlításban $p < 0,05$ értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak.

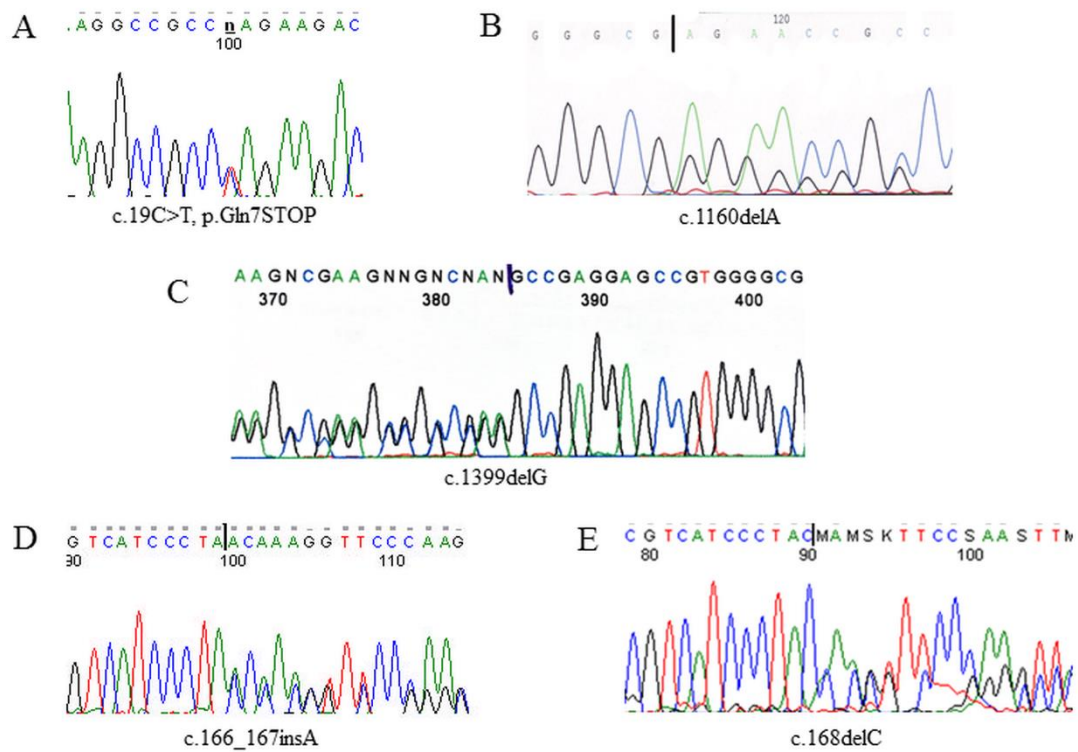
4. Eredmények

4.1. A hazai MEN1 adatbázis

4.1.1. Mutációt hordozó esetek. Új csírasejtes *MEN1* mutációk

134 független proband és 55 egyenesági családtag esetén, összesen 189 egyénben vizsgáltuk a *MEN1* gént, amióta Magyarországon is elérhető a *MEN1* genetikai vizsgálat (2001-2018 között). 27 probandban és 20 családtagban, összesen 47 betegben azonosítottunk csírasejtes *MEN1* mutációt. A családtagok az index beteggel azonos mutációt hordoztak. A 134 probandból 104 esetben (78 nő és 26 férfi) teljesültek a *MEN1* genetikai vizsgálat indikációs kritériumai, ezeket az eseteket tekintettük *MEN1* szindrómára gyanúsak. Nem találtunk mutációt azokban a betegekben, akiknél nem teljesültek a genetikai vizsgálat indikációjának feltételei. A részletes betegadatokat az 1. táblázatban találhatók.

A 104, klinikailag *MEN1*-gyanús esetből 27 (26%) mutáció-pozitívnak míg 77 (74%) mutáció-negatívnak bizonyult. A 27 index betegben 24 különböző *MEN1* mutációt találtunk. Három probandban igazoltuk a c.1546_1547insC frameshift mutációt a 10-es exonban, közülük két betegben 30 éves életkor alatt alakult ki pancreas NET, a harmadik beteg pedig metasztatikus pancreas NET-ben és bronchus NET-ben szenvedett. A 2-es exonban található c.202_206dupGCCCC mutációt két beteg hordozta. 10 mutációt kutatócsoportunk korábbi munkájában már leírtunk [144,158], másik 7 mutációt pedig már korábban közöltek a szakirodalomban. A 24 mutációból ötöt még nem írtak le, ezeket új mutációként tartjuk számon (c.19C>T, p.Gln7STOP a 2-es exonban; c.1160delA a 8-as exonban; c.1399delG a 10-es exonban; c.166_167insA a 2-es exonban és c.168delC a 2-es exonban) (a mutált szekvenciák chromatogramjai az 1. ábrán láthatók). 15 olyan mutáció-negatív esetet (19,2%) találtunk, amelyekben vagy mindhárom *MEN1*-daganat megtalálható, vagy két daganat alakult ki 40 éves életkor előtt. Ezekben az esetekben elvégeztük a *CDKN1B* gén szekvenálását és a *MEN1* gén MLPA analízisét; ezek közül egy esetben találtunk MLPA vizsgálatral nagy deléciót a *MEN1* 6-os exonjában. A fiatal nőbetegnél 40 éves kora előtt jelentkezett PHPT és hypophysis adenoma.



1. ábra: Az öt új mutáció chromatogramja. A) c.19C>T, p.Gln7STOP a 2-es exonban. B) c.1160delA a 8-as exonban. C) c.1399delG a 10-es exonban. D) c.166_167insC a 2-es exonban. E) c.168delC a 2-es exonban. A C jelű chromatogram a reverz szálát ábrázolja [159].

1. táblázat: A *MEN1* genetikai vizsgálatra küldött 104 mutáció-pozitív és -negatív proband részletes klinikai és genetikai adatai.

MEN1 = multiplex endokrin neoplasia 1, PHPT = primer hyperparathyreosis, PA = hypophysis adenoma, GEP-NET = gastroenteropancreaticus neuroendokrin tumor, NA = nincs adat, 0 = hiányzó manifesztáció, 1 = meglévő manifesztáció.

Proband	Nem	Életkor a <i>MEN1</i> gyanú fennállásakor (év)	A genetikai vizsgálat indikációja	Az utánkövetés alatt kialakult manifesztációk	PHPT	PA	GEP-NET	Familiáris/Sporadikus	Klinikai <i>MEN1</i> szindróma	Halalozás	Életkor az utánkövetés végén (év)	<i>MEN1</i> mutáció	Érintett exon	Mutáció típusa	<i>MEN1</i> mutáció (cDNS referencia szekvencia)	<i>MEN1</i> mutáció (LRG_509t2 referencia szekvencia)
1	N	16,2	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	36,16	1	2	missense	E2: c.83G>C, p.Gly28Ala	E2: c.193G>C, p.Gly28Ala
2	N	45,0	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	72,22	1	9	nonsense	E10: c.1378C>T, p.Arg460STOP	E10: c.1488C>T, p.Arg460STOP
3	N	70,4	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	72,48	0				
4	N	59,3	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	59,51	0				
5	F	20,0	PHPT 30 év alatt	GEP-NET	1	0	1	F	1	0	33,26	1	intron 9	intronikus splice régió	I9: c.1351-2A>C	I9: c.1461-2A>C
6	F	ND	PHPT + PA	0	1	1	0	F	1	1	76,12	1	2	missense	E2: c.272C>T, p.Ala91Val	E2: c.382C>T, p.Ala91Val
7	F	50,4	PHPT + GEP-NET	PA	1	1	1	S	1	0	61,30	0				
8	N	35,0	PHPT + GEP-NET	PA	1	1	1	N A	1	0	46,21	1	3	missense	E3: c.521A>C, p.His174Pro	E3: c.631A>C, p.His174Pro
9	N	17,5	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	19,61	0				
10	N	44,3	recidív PHPT	0	1	0	0	S	0	0	64,28	0				
11	N	46,8	multiplex PHPT	PA	1	1	0	F	1	0	53,27	1	6	missense	E6: c.902T>G, p.Leu301Arg	E6: c.1012T>G, p.Leu301Arg

Proband	Nem	Életkor a MEN1 gyanú fennállásakor (év)	A genetikai vizsgálat indikációja	Az utánkövetés alatt kialakult manifesztációk	PHPT	PA	GEP-NET	Familiáris/Sporadikus	Klinikai MEN1 szindróma	Halálozás	Életkor az utánkövetés végén (év)	MEN1 mutáció	Érintett exon	Mutáció típusa	MEN1 mutáció (cDNS referencia szekvencia)	MEN1 mutáció (LRG_509t2 referencia szekvencia)
12	N	30,0	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	44,29	0				
13	N	16,5	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	21,22	0				
14	F	51,3	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	57,61	0				
15	N	48,3	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	48,26	0				
16	N	27,5	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	37,83	1	6	nagy deléció	del exon 6	del exon 6
17	N	53,4	PHPT + GEP-NET		1	0	1	S	1	0	54,64	0				
18	N	54,5	multiplex PHPT	0	1	0	0	S	0	0	59,78	0				
19	F	48,9	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	49,31	0				
20	N	47,9	multiplex GEP- NET	PHPT	1	0	1	F	1	0	53,21	1	10	frameshift deléció	E10: c.1361delA	E10: c.1471delA
21	N	57,2	PHPT + GEP-NET	0	1	0	1	S	1	0	69,76	0				
22	N	35,9	PA + adrenalis adenoma	0	0	1	0	S	0	0	36,46	0				
23	N	41,3	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	43,92	0				
24	N	58,4	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	1	64,53	0				
25	N	26,7	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	26,72	0				
26	N	ND	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	1	62,77	0				
27	N	40,0	PHPT + GEP-NET	0	1	0	1	S	1	0	51,26	0				
28	N	16,9	PHPT + PA	GEP-NET	1	1	1	S	1	0	29,86	1	8	frameshift deléció	E8: c.1160delA	E8: c.1270delA

Proband	Nem	Életkor a MEN1 gyanú fennállásakor (év)	A genetikai vizsgálat indikációja	Az utánkövérés alatt kialakult manifesztációk	PHPT	PA	GEP-NET	Familialis/Sporadikus	Klinikai MEN1 szindróma	Halálozás	Életkor az utánkövérés végén (év)	MEN1 mutáció	Érintett exon	Mutáció típusa	MEN1 mutáció (cDNS referencia szekvencia)	MEN1 mutáció (LRG_509t2 referencia szekvencia)
29	F	14,1	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	14,13	0				
30	N	69,4	multiplex PHPT	0	1	0	0	S	0	0	77,46	0				
31	N	15,9	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	15,87	0				
32	N	53,1	multiplex PHPT	PA, GEP- NET	1	1	1	S	1	0	60,44	1	8	nonsense	E8: c.1177C>T, p.Gln393STOP	E8: c.1287C>T, p.Gln393STOP
33	F	21,7	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	22,16	0				
34	N	59,8	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	59,85	0				
35	N	44,8	PA + adrenalis adenoma	PHPT	1	1	0	S	1	0	58,49	0				
36	N	24,8	PHPT 30 év alatt	PA, GEP- NET	1	1	1	F	1	1	35,57	1	10	frameshift inzerció	E10: c.1546_1547insC	E10: c.1656_1657insC
37	F	47,0	PHPT + más NET	GEP-NET	1	0	1	S	1	0	51,64	1	10	frameshift inzerció	E10: c.1546_1547insC	E10: c.1656_1657insC
38	N	19,5	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	19,46	0				
39	N	29,3	PHPT 30 év alatt	GEP-NET	1	0	1	F	1	0	38,78	1	2	frameshift inzerció	E2: c.202_206dupGCCCC	E2: c.312_316dupGCCCC
40	N	ND	PHPT + PA + GEP-NET	0	1	1	1	S	1	0	59,36	0				
41	F	21,4	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	21,44	0				
42	N	52,3	PHPT + adrenalis adenoma	0	1	0	0	S	0	0	63,80	0				

Proband	Nem	Életkor a MEN1 gyanú fennállásakor (év)	A genetikai vizsgálat indikációja	Az utánkövérés alatt kialakult manifesztációk	PHPT	PA	GEP-NET	Familiáris/Sporadikus	Klinikai MEN1 szindróma	Halálozás	Életkor az utánkövérés végén (év)	MEN1 mutáció	Érintett exon	Mutáció típusa	MEN1 mutáció (cDNS referencia szekvencia)	MEN1 mutáció (LRG_509t2 referencia szekvencia)
43	F	67,5	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	84,59	0				
44	N	23,0	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	47,13	0				
45	N	57,0	gastrinoma	0	0	0	1	S	0	0	61,26	0				
46	N	54,7	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	65,69	0				
47	F	22,3	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	22,56	0				
48	N	31,0	multiplex PHPT	0	1	0	0	S	0	0	39,41	0				
49	N	29,5	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	33,19	0				
50	N	49,0	recidív PHPT	GEP-NET	1	0	1	S	1	0	77,88	0				
51	N	26,8	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	27,66	0				
52	N	26,8	PHPT + GEP-NET	0	1	0	1	S	1	0	37,87	0				
53	N	68,9	PHPT + GEP-NET	0	1	0	1	S	1	0	70,89	0				
54	N	22,7	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	25,74	0				
55	F	10,0	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	11,53	0				
56	N	32,6	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	36,64	0				
57	F	37,3	PHPT + PA	GEP-NET	1	1	1	S	1	0	46,29	1	2	nonsense	E2: c.19C>T, p.Gln7STOP	E2: c.129C>T, p.Gln7STOP
58	N	56,5	recidív PHPT	0	1	0	0	F	0	0	66,45	1	2	inframe deléción	E2: c.358_360delAAG	E2: c.468_470delAAG
59	N	54,5	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	54,47	0				

Proband	Nem	Életkor a MEN1 gyanú fennállásakor (év)	A genetikai vizsgálat indikációja	Az utánkövetés alatt kialakult manifesztációk	PHPT	PA	GEP-NET	Familiáris/Sporadikus	Klinikai MEN1 szindróma	Halálozás	Életkor az utánkövetés végén (év)	MEN1 mutáció	Érintett exon	Mutáció típusa	MEN1 mutáció (cDNS referencia szekvencia)	MEN1 mutáció (LRG_509t2 referencia szekvencia)
60	F	18,3	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	20,72	0				
61	N	29,0	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	31,01	0				
62	F	20,0	multiplex GEP- NET	0	0	0	1	S	0	0	29,27	0				
63	N	25,0	multiplex GEP- NET	PHPT	1	0	1	N A	1	0	39,55	1	8	nonsense	E8: c.1062C>A, p.Cys354STOP	E8: c.1172C>A, p.Cys354STOP
64	F	19,5	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	25,59	0				
65	N	13,8	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	13,76	0				
66	F	32,0	gastrinoma	PHPT	1	0	1	S	1	0	60,72	1	2	frameshift inzerció	E2: c.166_167insA	E2: c.276_277insA
67	N	64,2	PHPT + adrenalis adenoma	0	1	0	0	S	0	0	76,34	0				
68	N	27,9	PA + GEP-NET	PHPT	1	1	1	S	1	0	67,85	1	10	frameshift inzerció	E10: c.1546_1547insC	E10: c.1656_1657insC
69	N	67,8	PHPT + adrenalis adenoma	0	1	0	0	S	0	0	72,96	0				
70	N	20,4	PHPT + PA	0	1	1	0	F	1	0	30,88	1	2	nonsense	E2: c.76G>T, p.Glu26STOP	E2: c.186G>T, p.Glu26STOP
71	N	ND	PHPT + PA + GEP-NET	0	1	1	1	S	1	1	56,45	0				
72	N	61,4	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	73,79	0				
73	N	65,5	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	1	69,01	0				
74	F	40,0	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	44,91	0				

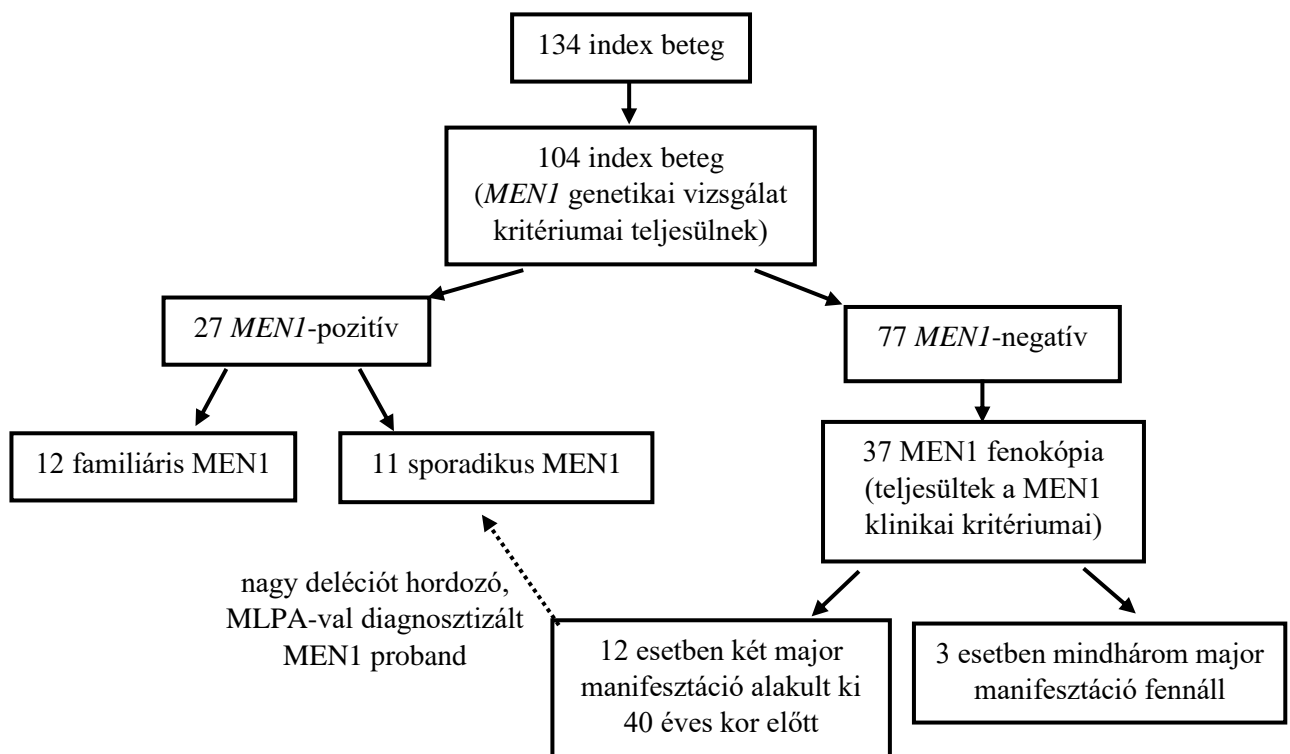
Proband	Nem	Életkor a MEN1 gyanú fennállásakor (év)	A genetikai vizsgálat indikációja	Az utánkövetés alatt kialakult manifesztációk	PHPT	PA	GEP-NET	Familialis/Sporadikus	Klinikai MEN1 szindróma	Halálozás	Életkor az utánkövetés végén (év)	MEN1 mutáció	Érintett exon	Mutáció típusa	MEN1 mutáció (cDNS referencia szekvencia)	MEN1 mutáció (LRG_509t2 referencia szekvencia)
75	N	26,8	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	26,96	0				
76	F	52,3	PHPT + adrenalis adenoma	0	1	0	0	S	0	0	57,89	0				
77	N	53,3	PHPT + adrenalis adenoma	0	1	0	0	S	0	0	53,26	0				
78	F	75,2	PHPT + GEP-NET	0	1	0	1	S	1	0	80,18	0				
79	N	34,0	PHPT + adrenalis adenoma	0	1	0	0	S	0	0	49,85	0				
80	F	19,6	PHPT + PA	0	1	1	0	N A	1	0	20,25	1	2	frameshift deléció	E2: c.249_252delGTCT	E2: c.359_362delGTCT
81	N	39,3	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	66,15	0				
82	F	47,7	gastrinoma	PHPT, PA	1	1	1	F	1	1	66,99	1	3	nonsense	E3: c.625C>T, p.Gln209STOP	E3: c.735C>T, p.Gln209STOP
83	N	26,8	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	37,23	0				
84	N	45,8	PHPT + GEP-NET	0	1	0	1	S	1	0	54,38	0				
85	N	20,4	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	29,25	0				
86	F	16,5	PA + GEP-NET	PHPT	1	1	1	S	1	0	16,46	1	2	frameshift inzericío	E2: c.202_206dupGCCCC	E2: c.312_316dupGCCCC
87	N	25,2	PHPT + PA	GEP-NET	1	1	1	F	1	1	44,69	1	2	nonsense	E2: c.231C>G, p.Tyr77STOP	E2: c.341C>G, p.Tyr77STOP
88	N	41,4	gastrinoma		0	0	1	S	0	1	48,45	0				
89	F	38,0	PHPT + GEP-NET	0	1	0	1	S	1	0	40,31	0				

Proband	Nem	Életkor a MEN1 gyanú fennállásakor (év)	A genetikai vizsgálat indikációja	Az utánkövetés alatt kialakult manifesztációk	PHPT	PA	GEP-NET	Familialis/Sporadikus	Klinikai MEN1 szindróma	Halálozás	Életkor az utánkövetés végén (év)	MEN1 mutáció	Érintett exon	Mutáció típusa	MEN1 mutáció (cDNS referencia szekvencia)	MEN1 mutáció (LRG_509t2 referencia szekvencia)
90	N	30,0	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	31,01	0				
91	N	42,0	multiplex GEP- NET	0	0	0	1	S	0	0	45,14	0				
92	F	37,4	multiplex GEP- NET	PHPT	1	0	1	F	1	0	47,06	1	10	frameshift deléció	E10: c.1399delG	E10: c.1509delG
93	N	53,1	recidív PHPT	0	1	0	0	S	0	0	54,34	0				
94	N	37,2	PA + GEP-NET	0	0	1	1	S	1	0	38,83	0				
95	N	33,0	PA + adrenalis adenoma	0	0	1	0	S	0	0	50,48	0				
96	N	15,0	PHPT 30 év alatt	0	1	0	0	S	0	0	16,13	0				
97	F	20,1	PA + GEP-NET	PHPT	1	1	1	N A	1	0	37,73	1	3	frameshift deléció	E3: c.628_631delACAG	E3: c.738_741delACAG
98	N	46,2	PA + GEP-NET	0	0	1	1	S	1	0	60,42	0				
99	N	18,1	multiplex GEP- NET	PHPT, PA	1	1	1	S	1	0	30,77	1	4	missense	E4: c.668T>C, p.Leu223Pro	E4: c.778T>C, p.Leu223Pro
100	N	22,4	PHPT + GEP-NET	PA	1	1	1	F	1	0	28,94	1	2	frameshift deléció	E2: c.168delC	E2: c.278delC
101	N	45,9	multiplex PHPT	0	1	0	0	S	0	0	46,77	0				
102	N	12,3	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	26,12	0				
103	N	49,0	multiplex PHPT	0	1	0	0	S	0	0	57,34	0				
104	N	61,8	PHPT + PA	0	1	1	0	S	1	0	63,06	0				

4.1.2. Mutáció-negatív esetek. MEN1 fenokópia

12 mutáció-pozitív index betegnél familiáris MEN1 szindróma állt fent, 11 esetben sporadikus MEN1 szindróma igazolódott (*de novo* mutáció alakult ki a probandban, a szülőknél nem találtunk csírasejtes mutációt). Négy esetben a rendelkezésre álló adatokból nem tudtuk meghatározni a familiáris vagy sporadikus eredetet. Az összes *MEN1*-negatív proband családi anamnézise negatív volt, ezért klinikailag sporadikusnak tartjuk őket.

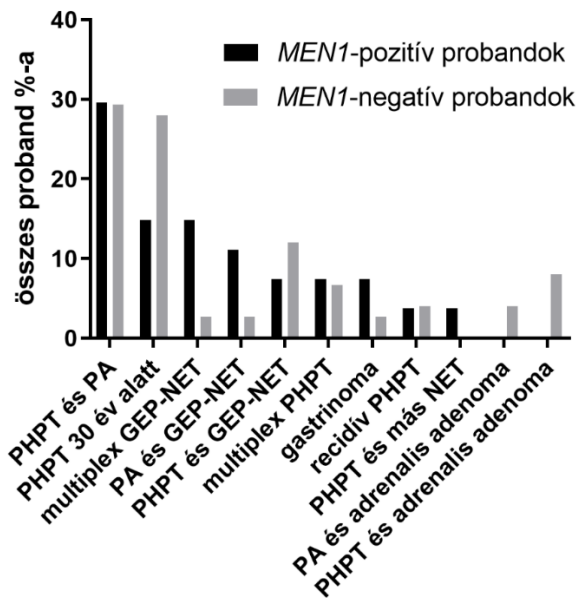
A 77 mutáció-negatív probandból 37 (48,1%) esetben teljesültek a MEN1 szindróma klinikai kritériumai, ezek közül 3 esetben mindhárom major manifesztáció kialakult (2. ábra). A manifesztációk a három fenti betegben a vártnak megfelelően későbbi életkorban alakultak ki: PHPT-k 48, 53 és 50 éves életkorban, a PA-k 49, 53 és 50 évesen, míg a GEP-NET-ek 47, 53 és 46 éves életkorukban. A MEN1 szindróma kritériumait teljesítő sporadikus esetek közül (11 *MEN1*-pozitív és 37 *MEN1*-negatív eset) 77,1%-ban alakult ki fenokópia (37/48).



2. ábra: a genetikai vizsgálatra küldött 134 beteg megoszlása. MEN1 = multiplex endokrin neoplasia 1, MLPA = multiplex ligációs próbaamplifikáció.

4.1.3. A genetikai vizsgálat indikációi

A mutáció-pozitív probandokban az első klinikai manifesztáció a PHPT és a GEP-NET volt, mindkét esetben a betegek 33,3%-ában; míg a PA 26%-ban volt az első daganat. Egy betegben bronchiális NET volt az első manifesztáció. *MEN1*-negatív betegekben a PHPT 49,4%-ban, a PA 27,3%-ban, a GEP-NET pedig 13%-ban volt az első daganat. Két mutáció-negatív betegben mellékvesekéreg adenoma alakult ki a PHPT-t megelőzően, 7,8%-ban pedig nem volt információ az első manifesztációt illetően. A 3. ábrán láthatók a *MEN1* genetikai vizsgálatának indikációi.



3. ábra: A *MEN1* mutációanalízis indikációi. A genetikai vizsgálat kritériumait az Endokrin Társaság 2012-ben megjelent, jelenleg is érvényes irányelve alapján határoztuk meg [6]. A multiplex GEP-NET csoportba soroltuk az egy betegben többszörösen jelentkező, azonos szövettani típusú, és az egy betegben jelentkező, különböző szövettani típusú GEP-NET eseteket is. Mutáció-pozitív probandok (n=27), fekete színnel, mutáció-negatív probandok (n=77), szürke színnel. *MEN1* = multiplex endokrin neoplasia 1, PHPT = primer hyperparathyreosis, PA = hypophysis adenoma, GEP-NET = gastroenteropancreatikus neuroendokrin tumor [159].

A leggyakoribb indikációk a PHPT és PA együttes fennállása és a 30 év alatt jelentkező PHPT voltak mind a *MEN1* mutációt hordozókban és a nem hordozókban egyaránt. Figyelemre méltó, hogy a multiplex formában jelentkező GEP-NET igen gyakran a betegség lefolyásának kezdetén alakult ki, a mutáció-pozitív eseteknél a genetikai vizsgálat harmadik leggyakoribb indikációja volt.

Az 55 egyenesági rokonból 20-nál találtunk *MEN1* mutációt, 6 hordozónak nem volt semmilyen *MEN1*-re utaló klinikai tünete. A legfiatalabb eset, akinél elvégeztük a *MEN1* genetikai vizsgálatot 6 éves volt, örökölte a mutációt.

4.1.4. GEP-NET-ek prediktív szerepe *MEN1* szindrómában

Az utánkövetés átlagos ideje 8,5 év volt. A mortalitási arány mutáció-hordozókban 14,8% (4/27), mutációt nem hordozókban 6,5% (5/77) volt, ez nem bizonyult statisztikailag szignifikáns különbségnek ($p=0,186$). A 4 *MEN1* szindrómás betegből 3 GEP-NET miatt hunyt el; életkoruk ekkor 35, 44 és 67 év volt; a diagnózis után 10, 19 és 19 évvel. Ezzel szemben az 5 mutáció-negatív betegből csak 2 esetben volt a halálozás oka GEP-NET; 44 és 56 éves korban, mindkét esetben 3 évvel a diagnózis után. A *MEN1* szindróma gyanúja szignifikánsan korábbi életkorban vetődött fel mutáció-pozitívokban, mint mutáció-negatívokban ($31,4 \pm 12,6$ és vs. $40,2 \pm 17,3$ év, $p = 0,019$, 2. táblázat). A GEP-NET incidenciája már a kezdetekor szignifikánsan magasabb volt hordozókban (44,4% vs. 20,8%, $p = 0,017$). Szignifikánsan gyakoribb volt a recidív PHPT (55,6% vs. 9,1%, $p < 0,001$), a PA (66,7% vs. 39,0%, $p = 0,013$), a GEP-NET (70,4% vs. 23,4%, $p < 0,001$) és a multiplex GEP-NET (29,6% vs. 3,9%, $p < 0,001$) mutáció-pozitívokban a mutáció-negatívokhoz képest (2. táblázat). A mutáns allél hordozása nemcsak a szignifikánsan gyakoribb GEP-NET-tel asszociált, hanem a GEP-NET szignifikánsan korábbi életkorban való kialakulásával is ($31,0 \pm 12,2$ év vs. $45,9 \pm 16,1$ év, $p = 0,004$). A mutáció hordozók több mint felében a GEP-NET 30 éves életkor alatt alakult ki, míg a nem hordozóknál csak 16,7%-ban ($p < 0,001$). A vártnak megfelelően a három major manifesztációból legalább 2 kombinációja szignifikánsan korrelált a hordozói státusszal. Bármelyik két, 30 éves életkor alatt kialakuló major manifesztáció magas prediktív értéket jelentett a *MEN1* mutációra (pozitív prediktív érték, PPV = 72,2%). Nem meglepő módon a legerősebb prediktív értéke *MEN1* mutációra a három major manifesztáció

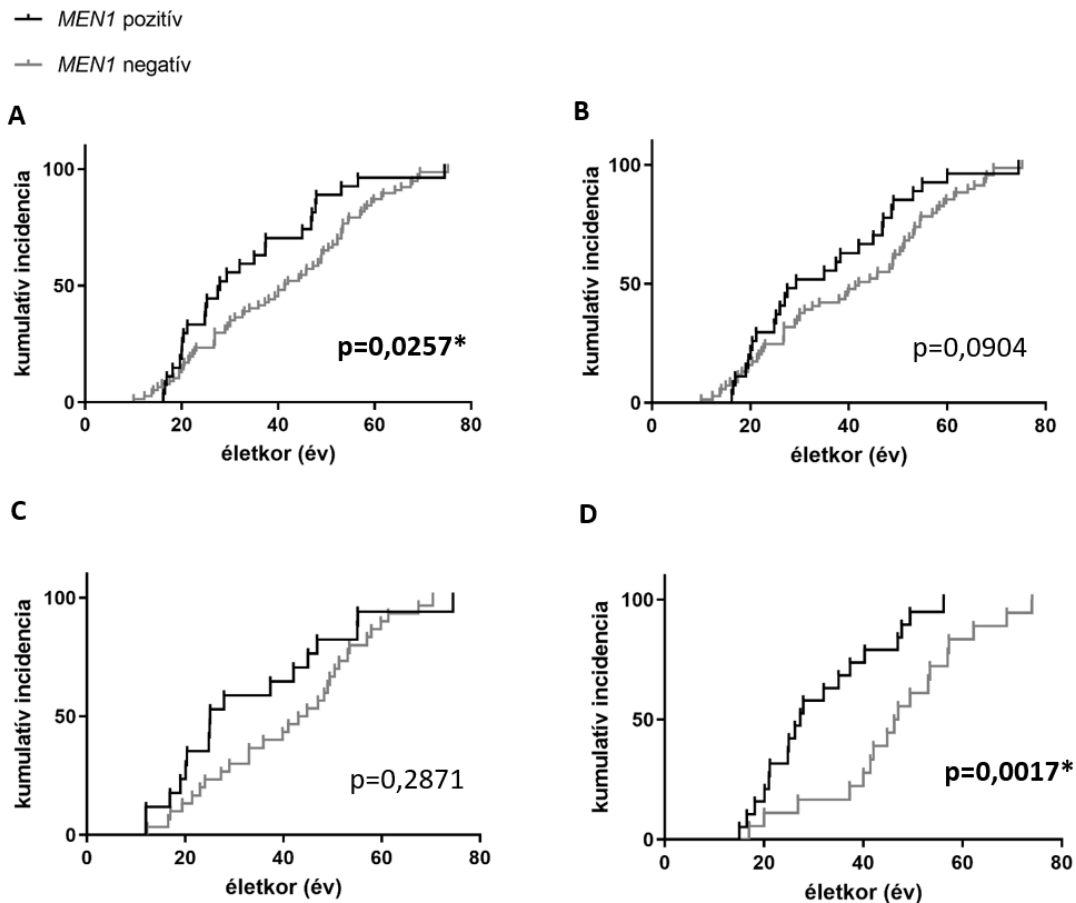
egyidejű fennállásának volt; ezt követte a 30 éves életkor előtt jelentkező GEP-NET, 78,6%-os pozitív prediktív értékkel.

2. táblázat: *MEN1* mutáció-pozitív és mutáció-negatív probandok klinikai jellemzőinek összehasonlítása. Az utolsó oszlop a pozitív prediktív értéket (PPV) mutatja: az adott manifesztációt hordozó mutáció-pozitív probandok aránya az összes probandhoz képest. A *-gal jelölt manifesztációknál találtam szignifikáns különbséget. A multiplex GEP-NET csoportba soroltuk az egy betegben többszörösen jelentkező, azonos szövettani típusú, és az egy betegben jelentkező, különböző szövettani típusú GEP-NET eseteket is. MEN1 = multiplex endokrin neoplasia 1, PHPT = primer hyperparathyreosis, PA = hypophysis adenoma, GEP-NET = gastroenteropancreaticus neuroendokrin tumor, PPV = pozitív prediktív érték, NA: nem értelmezhető.

	Mutáció-pozitív probandok (n=27)	Mutáció-negatív probandok (n=77)	p-érték	Mutáció-pozitív probandok aránya (PPV)
Életkor a MEN1 gyanú fennállásakor (év)*	31.4±12.6	40.2±17.3	0.019	NA
PHPT	27 (100.0%)	69 (89.6%)	0.082	27/96 (28.1%)
Recidív PHPT*	15 (55.6%)	7 (9.1%)	<0.001	15/22 (68.2%)
Életkor PHPT-nél (év)	33.4±13.7	40.3±17.9	0.082	NA
PHPT 30 év alatt	13 (48.2%)	26 (33.8%)	0.184	13/39 (33.3%)
PA*	18 (66.7%)	30 (39.0%)	0.013	18/48 (37.5%)
Életkor PA-nál (év)	29.8±14.2	39.5±16.5	0.053	NA
GEP-NET*	19 (70.4%)	18 (23.4%)	<0.001	19/37 (51.4%)
Multiplex GEP-NET*	8 (29.6%)	3 (3.9%)	<0.001	8/11 (72.7%)
Életkor GEP-NET-nél (év)*	31.0±12.2	45.9±16.1	0.004	NA
GEP-NET 30 év alatt (év)*	11 (40.7%)	3 (3.9%)	<0.001	11/14 (78.6%)
PHPT+PA*	18 (66.7%)	26 (33.8%)	0.003	18/44 (40.9%)
PHPT+GEP-NET*	19 (70.4%)	12 (15.6%)	<0.001	19/31 (61.3%)
PA+GEP-NET*	12 (44.4%)	5 (6.5%)	<0.001	12/17 (70.6%)
PHPT+PA+GEP-NET*	12 (44.4%)	3 (3.9%)	<0.001	12/15 (80.0%)

A MEN1 szindróma gyanú kialakulásának életkorfüggő penetranciája szignifikánsan eltért mutáció-pozitívokban a mutáció-negatívokhoz képest: hordozókban magasabb penetrancia-görbét kaptunk, azaz korábbi életkorban vetődött fel a MEN1 gyanú, mint

nem hordozókban (4. ábra); az 50%-os penetranciát 27,7 éves életkornál találtuk, szemben a 41,4 éves kornál nem hordozóknál. Az előzőhöz hasonlóan szignifikánsan magasabb életkorfüggő penetrancia görbe ábrázolódott a GEP-NET kialakulását illetően index betegekben: *MEN1*-pozitívokban az 50%-os penetrancia 26,8 éves életkornál volt, míg *MEN1*-negatívokban 46,2 éves korban.



4. ábra: Életkorfüggő penetrancia görbék *MEN1*-pozitív (fekete görbék) vs. *MEN1*-negatív (szürke görbék) probandokban: A) *MEN1* szindróma gyanú; B) PHPT; C) PA; D) GEP-NET. A *-gal jelölt p-értékek szignifikáns eltérést jeleznek a két csoport között. *MEN1* = multiplex endokrin neoplasia 1, PHPT = primer hyperparathyreosis, PA = hypophysis adenoma, GEP-NET = gastroenteropancreatikus neuroendokrin tumor [159].

4.1.5. A GEP-NET-ek szövettani típusai

A MEN1-asszociált GEP-NET-ek között a leggyakoribb szövettani típus az insulinoma volt (47,4%), amelyet a nem-funkcionáló PNET (31,6%) majd a gastrinoma (15,8%) követett; ezek penetranciája 33,3%, 22,2% és 11,1% volt. Egy betegnél alakult ki glucagonoma, és egy esetben diagnosztizáltak ACTH-termelő NET-et. Három mutáció hordozó betegnél más eredetű neuroendokrin daganat alakult ki: két esetben bronchiális, egy esetben thymus NET. A mutáció-pozitívakkal ellentétben mutáció-negatívokban az insulinoma csak 22,2%-ban fordult elő, a gastrinoma azonban gyakoribb volt (27,8%), a nem-funkcionáló NET-eknél pedig hasonló előfordulást találtunk (22,2%). Három mutáció-negatív beteg szenvedett ilealis carcinoidban (16,7%), egy glucagonomában és egy beteg VIPomában. Mutációt nem hordozókban nem találtunk bronchiális vagy thymus NET-et.

A hypophysis adenomák többsége mind mutáció-pozitív, mind -negatív betegekben hormonálisan aktív volt. Hordozó index betegekben a leggyakoribb PA a prolactinoma volt (66,7%). GH-PRL termelő (a PA-k 11,1%-a), GH termelő (a PA-k 5,6%-a) és FSH-LH (folliculus stimuláló/luteinizáló hormon) termelő (a PA-k 5,6%-a) adenomák ritkán fordultak elő. Az adenomák 11,1%-a nem-funkcionáló volt. A mutáció-negatív betegek hypophysis adenomáinak 33,3%-a volt GH-termelő; ennél ritkábbak voltak a prolactinoma, a nem hormontermelő adenoma (mindkettő 16,7%-ban fordult elő) és az ACTH-termelő adenoma (6,7%). A nem hordozó esetén 26,7%-ában nem volt elérhető adat a hormonális aktivitásról.

4.1.6. Genotípus-fenotípus összefüggések

Amint azt az 1.1.2. fejezetben említettem, egyes források különbséget találtak betegség lefolyásában, a kialakuló daganatok dignitásában azok között a betegek között, akik a menin fehérje szerkezetét jelentősen befolyásoló frame-shift, nonsense mutációkat és nagy deléciókat ("high-impact" mutációk); illetve a kereteltolódással nem járó missense mutációkat és in-frame deléciókat ("low-impact" mutációk) hordoznak. A mutációtípusok hatásának vizsgálatára a fentieknek megfelelően két csoportra bontottuk és összehasonlítottuk a mutáció-pozitív probandokat (3. táblázat). High-impact mutáció

közé tartozott 12 frame-shift mutáció (44,4%, hat deléció és hat inzerció), 7 nonsense mutáció (25,9%), egy intronikus splice-régiót érintő mutáció és egy nagy deléció. A low-impact mutációk közül 5 missense mutációt (18,5%) és egy in-frame deléciót találtunk. Szignifikánsan gyakrabban fordult elő GEP-NET a high-impact mutációt hordozókban (81,0%), mint a low-impact mutációt hordozókban (33,3%, $p = 0,044$).

Beteganyagunkban a *MEN1* mutációk leggyakoribb lokalizációja a 2. exonban volt (40,7%), ezt követte a 10. exon (18,5%). Nem találtunk mutációt az 5. és a 7. exonban. Nem találtunk szignifikáns összefüggést az érintett exonok és a klinikai manifesztációk között.

3. táblázat: MEN1 manifesztációk előfordulása "high-impact" és "low-impact" mutációt hordozókban. A *-gal jelölt manifesztációk szignifikánsan különböznek a két csoport között. A multiplex GEP-NET csoportba soroltuk az egy betegben többszörösen jelentkező, azonos szövettani típusú, és az egy betegben jelentkező, különböző szövettani típusú GEP-NET eseteket is. MEN1 = multiplex endokrin neoplasia 1, PHPT = primer hyperparathyreosis, PA = hypophysis adenoma, GEP-NET = gastroenteropancreaticus neuroendokrin tumor.

	"High-impact" mutáció hordozók (n=21)	"Low-impact" mutáció hordozók (n=6)	p-érték
Életkor a MEN1 gyanú fennállásakor (év)	30.6±11.6	34.5±17.6	0.543
PHPT	21 (100.0%)	6 (100.0%)	1.000
Recidív PHPT	12 (57.1%)	3 (50.0%)	0.557
Életkor PHPT-nél (év)	33.1±13.3	34.4±16.9	0.856
PHPT 30 év alatt	11 (52.4%)	2 (33.3%)	0.362
PA	14 (66.7%)	4 (66.7%)	0.677
Életkor PA-nál (év)	27.9±14.2	39.0±12.0	0.230
GEP-NET*	17 (81.0%)	2 (33.3%)	0.044
Multiplex GEP-NET	7 (33.3%)	1 (16.7%)	0.430
Életkor GEP-NET-nél (év)	31.5±11.9	26.6±12.5	0.602
GEP-NET 30 év alatt	10 (47.6%)	1 (16.7%)	0.189
PHPT+PA	14 (66.7%)	4 (66.7%)	0.677
PHPT+GEP-NET*	17 (81.0%)	2 (33.3%)	0.044
PA+GEP-NET	10 (47.6%)	2 (33.3%)	0.443
PHPT+PA+GEP-NET	10 (47.6%)	2 (33.3%)	0.443

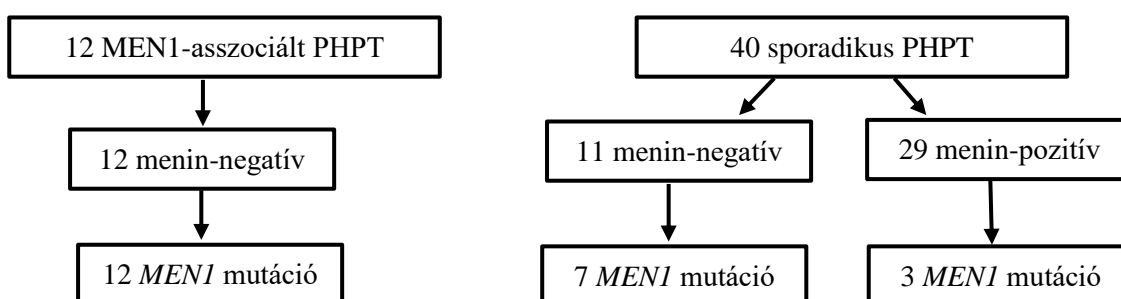
4.2. *MEN1* és miRNS expresszió PHPT szövetmintákban

4.2.1. Új csírasejtes *MEN1* mutációk

12 egymástól független családból 14 esetben találtunk a betegséget okozó csírasejtes *MEN1* mutációt (4. táblázat). A 12 mutációból kettőt még nem közöltek (c.168delC az 1-es exonban, és c.1160delA a 8-as exonban). Amint az várható volt, *MEN1*-asszociált PHPT-t szignifikánsan korábbi életkorban távolították el, mint a sporadikus, nem-szindrómás PHPT-eket (5. táblázat).

4.2.2. *MEN1* és *menin* expresszió összefüggése PHPT szövetekben

A nukleáris *menin* expresszió hiányát találtuk az összes *MEN1*-asszociált PHPT szövetben, valamint a sporadikus formák 27,5%-ában (40-ből 11 esetben) (6. ábra és 5. táblázat). A 40 sporadikus PHPT szövet közül 10 esetben (25%) találtunk szomatikus *MEN1* mutációt (4. táblázat és 5. ábra). Az összesen 23 (egymástól független) *menin*-negatív PHPT esetből (amelyből 12 *MEN1*-asszociált és 11 sporadikus) 19 esetben (12 *MEN1*-asszociált és 7 sporadikus) találtunk a PHPT szövetben szomatikus *MEN1* mutációt. Ugyanakkor a 29 *menin*-pozitív sporadikus PHPT szövetből 3 esetben mutattunk ki *MEN1* mutációt. Mindhárom esetben gyenge nukleáris *menin* festődés látszott. Mindezek alapján a *menin* immunohisztokémiai vizsgálatának szenzitivitása és specificitása a *MEN1* mutáció kimutatására 86,4% és 86,7% (4. táblázat).

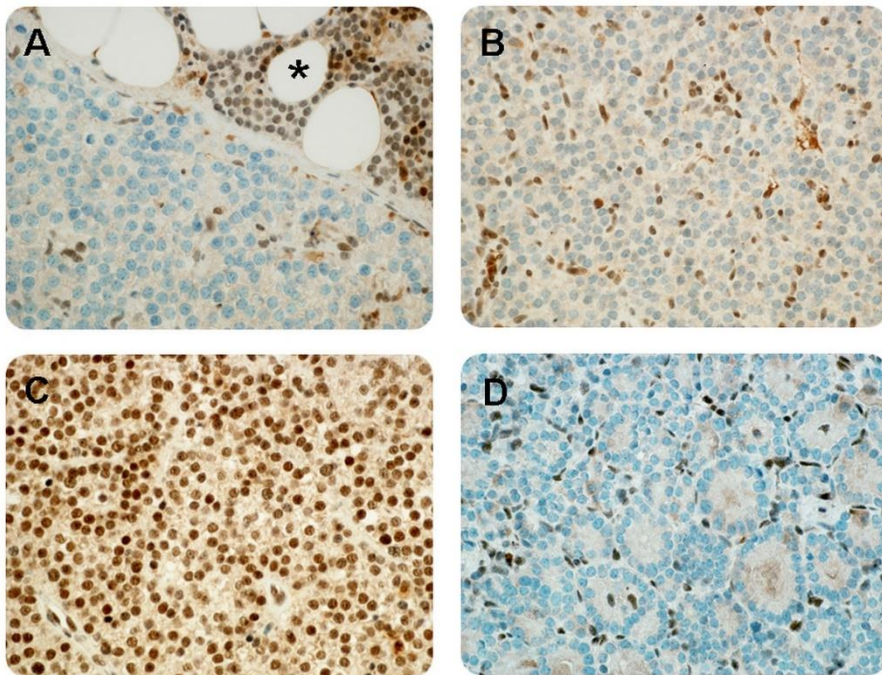


5. ábra: A *menin*-expresszió és szomatikus *MEN1*-mutációk eloszlása a betegcsoportokban. *MEN1* = multiplex endokrin neoplasia 1, PHPT = primer hyperparathyreosis.

4. táblázat: A vizsgálatban felhasznált MEN1-asszociált és sporadikus PHPT szövetek tulajdonságai, MEN1 mutációanalízis és menin immunhisztokémiai vizsgálat eredményei. MEN1 = multiplex endokrin neoplasia 1, PHPT = primer hyperparathyreosis.

Minta	Nem	Életkor (év)	MEN1-asszociált/ Sporadikus	Szöveti típus	Menin (citoplazma)	Menin (sejtmag)	MEN1 mutáció	Csírsejtes/ Szomatikus	Mutáció típusa
M1	N	18	MEN-1 asszociált	adenoma	0	0	E8: c.1160delA	csírsejtes	frameshift deléció
	N	22	MEN-1 asszociált	adenoma	1	0	E8: c.1160delA	csírsejtes	frameshift deléció
M2	N	47	MEN-1 asszociált	adenoma	1	0	E6: c.902C>G, p.Leu301Arg	csírsejtes	missense
M3	N	46	MEN-1 asszociált	adenoma	0	0	E6: c.902C>G, p.Leu301Arg	csírsejtes	missense
	N	52	MEN-1 asszociált	adenoma	0	0	E6: c.902C>G, p.Leu301Arg	csírsejtes	missense
M4	N	26	MEN-1 asszociált	adenoma	0	0	E10: c.1547_1548insC	csírsejtes	frameshift inzerció
M5	N	29	MEN-1 asszociált	adenoma	1	0	E10: c.1547_1548insC	csírsejtes	frameshift inzerció
M6	N	56	MEN-1 asszociált	adenoma	1	0	E2: c.358_360delAAG	csírsejtes	in-frame deléció
M7	N	33	MEN-1 asszociált	hyperplasia	2	0	E2: c.231C>A, p.Tyr77STOP	csírsejtes	nonsense
M8	F	20	MEN-1 asszociált	hyperplasia	1	0	E2: c.249_252delGTCT	csírsejtes	frameshift deléció
M9	F	57	MEN-1 asszociált	hyperplasia	1	0	E2: c.202_206dupGCCCC (5bp)	csírsejtes	frameshift inzerció
M10	N	28	MEN-1 asszociált	hyperplasia	0	0	E8: c1062C>A, p.Cys354STOP	csírsejtes	nonsense
M11	N	20	MEN-1 asszociált	adenoma	1	0	E4: c.668T>C, p.Leu223Pro	csírsejtes	missense
M12	N	23	MEN-1 asszociált	adenoma	0	0	E2: c.168delC	csírsejtes	frameshift deléció
M13	N	53	MEN-1 asszociált	hyperplasia	1	0	E9: c.1177C>T, p.Gln393Stop	csírsejtes	nonsense
M14	F	28	MEN-1 asszociált	adenoma	1	0	I9: c.1351-2A>C	csírsejtes	splice régió mutáció
P1	N	68	sporadikus	adenoma	1	0	E2: c.384 delC	szomatikus	frameshift deléció
P2	N	54	sporadikus	adenoma	0	0	vad típus		
P3	F	36	sporadikus	adenoma	0	0	E10: c.1381 C>T p.Arg461Cys	szomatikus	missense
P4	N	46	sporadikus	adenoma	0	0	E3: c.511C>T p.Gln171Stop	szomatikus	nonsense
P5	N	51	sporadikus	adenoma	2	0	vad típus		

Minta	Nem	Életkor (év)	MEN1-asszociált/ Sporadikus	Szöveti típus	Menin (citoplazma)	Menin (sejtmag)	MEN1 mutáció	Csírsejtes/ Szomatikus	Mutáció típusa
P6	N	42	sporadikus	adenoma	0	0	E9: c.1258 C>T p.Arg420Stop	szomatikus	nonsense
P7	F	40	sporadikus	adenoma	0	0	vad típus		
P8	F	62	sporadikus	adenoma	1	0	E6: c.848delT	szomatikus	frameshift deléció
P9	N	52	sporadikus	hyperplasia	1	0	E4: c.681insT	szomatikus	frameshift inzerció
P10	N	43	sporadikus	hyperplasia	1	0	E2: c.125 G>C p.Gly42Ala	szomatikus	missense
P11	N	64	sporadikus	hyperplasia	0	0	vad típus		
P12	N	74	sporadikus	adenoma	1	2	vad típus		
P13	F	43	sporadikus	adenoma	1	3	vad típus		
P14	N	71	sporadikus	adenoma	1	1	E2: c.46_148del102nt p.16_50del34codon	szomatikus	in-frame deléció
P15	F	32	sporadikus	adenoma	1	1	vad típus		
P16	N	29	sporadikus	adenoma	1	2	vad típus		
P17	F	21	sporadikus	adenoma	1	2	vad típus		
P18	F	52	sporadikus	adenoma	0	2	vad típus		
P19	N	23	sporadikus	adenoma	1	3	vad típus		
P20	N	47	sporadikus	adenoma	0	2	vad típus		
P21	N	53	sporadikus	adenoma	0	1	vad típus		
P22	N	21	sporadikus	adenoma	0	2	vad típus		
P23	N	62	sporadikus	adenoma	0	2	vad típus		
P24	N	63	sporadikus	adenoma	0	2	vad típus		
P25	N	73	sporadikus	hyperplasia	1	3	vad típus		
P26	N	70	sporadikus	hyperplasia	1	3	vad típus		
P27	N	64	sporadikus	hyperplasia	1	3	vad típus		
P28	N	64	sporadikus	hyperplasia	1	2	vad típus		
P29	N	69	sporadikus	hyperplasia	2	2	vad típus		
P30	N	55	sporadikus	hyperplasia	1	3	vad típus		
P31	N	51	sporadikus	hyperplasia	1	3	vad típus		
P32	N	41	sporadikus	hyperplasia	1	3	vad típus		
P33	N	66	sporadikus	hyperplasia	1	3	vad típus		
P34	N	80	sporadikus	hyperplasia	0	3	vad típus		
P35	N	66	sporadikus	hyperplasia	0	1	E9: c.1288G>A p.Glu425Lys	szomatikus	missense
P36	N	62	sporadikus	hyperplasia	0	1	E9: c. 1363 C>T p.Gln450STOP	szomatikus	nonsense
P37	N	52	sporadikus	hyperplasia	0	2	vad típus		
P38	N	56	sporadikus	hyperplasia	0	2	vad típus		
P39	N	58	sporadikus	hyperplasia	0	1	vad típus		
P40	N	77	sporadikus	hyperplasia	1	2	vad típus		



6. ábra: Menin immunhisztokémiai vizsgálat. Reprezentatív szövetminták MEN1-asszociált (A és B) és sporadikus (C és D) PHPT-re. A) MEN1 adenoma, a *-gal jelölt rész a szomszédos normál mellékpajzsmirigy szövetet jelzi. B) MEN1 hyperplasia. Mindkét MEN1-asszociált szövetben hiányzik a menin immunreaktivitás. C) Adenoma, intenzív nukleáris és gyenge cytoplasmatikus menin festődés. D) Adenoma, hiányzó nukleáris és cytoplasmatikus menin festődés. 600-szoros nagyítású felvételek. MEN1 = multiplex endokrin neoplasia 1, PHPT = primer hyperparathyreosis [160].

4.2.3. Magasabb miR-24 és miR-28 expresszió sporadikus PHPT szövetekben

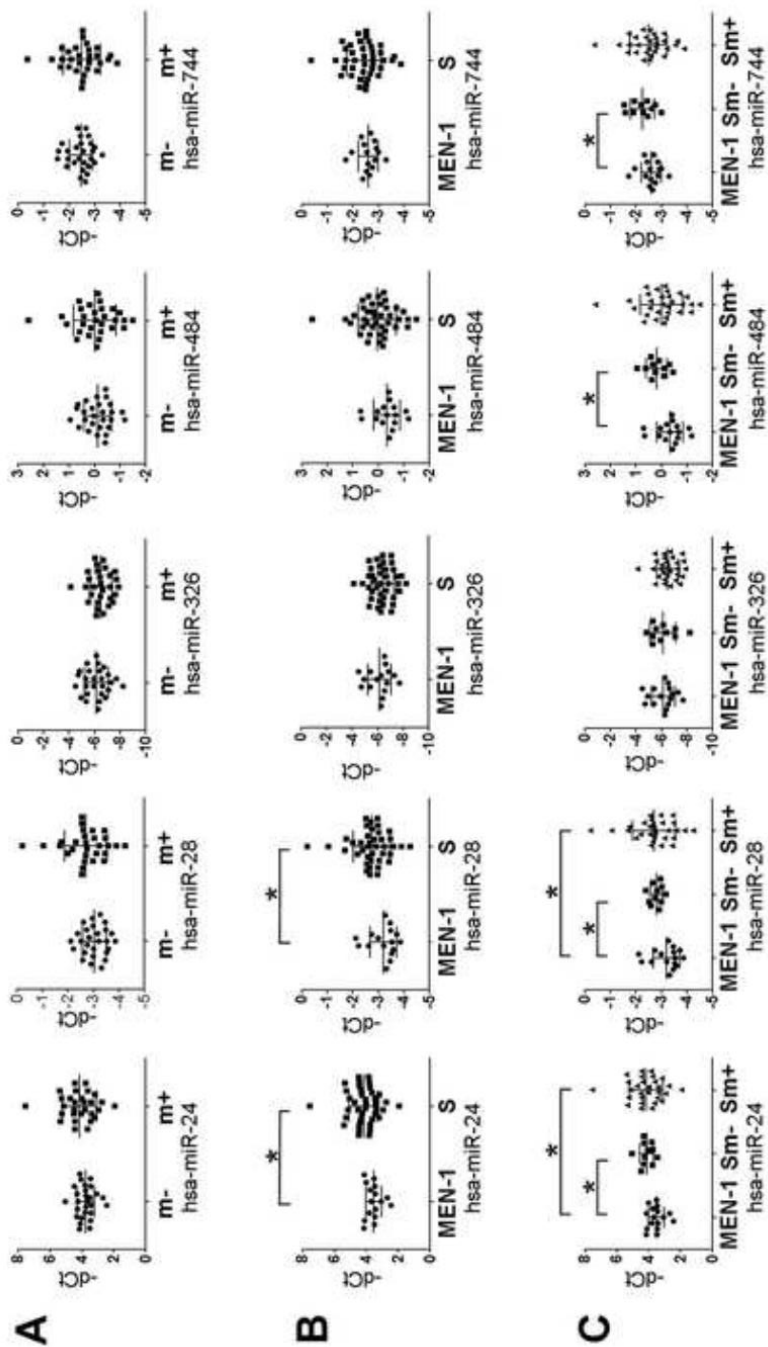
MiRNS targetpredikció segítségével 35 miRNS-t találtunk, amelyek a *MEN1* gén 3' UTR régiójához kötődnek, ebből 6 miRNS-t (hsa-miR-24, hsa-miR-28, hsa-miR-326, hsa-miR-484, hsa-miR-637, hsa-miR-744) legalább két targetpredikciós szoftver is megerősített, ezért ezeket választottuk további vizsgálatainkhoz.

qRT-PCR vizsgálattal a miR-24, miR-28, miR-326, miR-484 és miR-744 expresszálódott parathyroid szövetekben, míg a miR-637 expressziója a kimutathatóság határa alatt volt. Nem találtunk szignifikáns különbséget a miRNS expresszióban a menin-pozitív és

	MEN-1-asszociált PHPT (n=16)	Sporadikus, nem-szindrómás PHPT (n=40)	p-érték
Nem (nők, %)	81.3%	82.5%	1.000
Életkor (év)*	34.9 ± 3.58	53.8 ± 2.44	0.000
Legnagyobb átmérő (mm)	16.7 ± 2.0	20.6 ± 1.51	0.149
Mitózis (/10 HPF)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	NA
Ki-67 index (%)	0.5 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.358
Menin (citoplazma)	0.69 ± 0.15	0.60 ± 0.09	0.620
Menin (sejtmag)*	0.0 ± 0.0	1.6 ± 0.2	0.000
PTH (pg/ml)	131 ± 13.7	254 ± 57	0.258
Ca ²⁺ (mmol/l)	2.79 ± 0.06	2.83 ± 0.06	0.708

5. táblázat: MEN1-asszociált és sporadikus, nem-szindrómás PHPT esetek klinikai és patológiai jellemzőinek összehasonlítása. A *-gal jelölt paraméterek esetében szignifikáns különbség van a két csoport között. MEN1 = multiplex endokrin neoplasia 1, PHPT = primer hyperparathyreosis, PTH = parathormon, HPF = nagy nagyítású látótér, NA = nem értelmezhető.

menin-negatív PHPT szövetek között, a csírasejtes *MEN1* mutációtól függetlenül (7. ábra, A). Ugyanakkor a miR-24 és miR-28 magasabb expresszióját találtuk sporadikus, nem-szindrómás PHPT szövetekben a MEN1-asszociáltakhoz képest (7. ábra, B). Szignifikánsan magasabb maradt ezeknek a miR-eknek az expressziója akkor is, ha a sporadikus PHPT-k menin-pozitív és -negatív csoportját külön-külön hasonlítottuk össze a MEN1-asszociált PHPT szövetekkel (7. ábra, C), ami megerősíti ezeknek a miR-eknek a magasabb kifejeződését sporadikus PHPT-ban. A sporadikus, menin-negatív csoport *MEN1*-mutáns csoportját összehasonlítva a vad *MEN1* allélt hordozókkal (7 vs. 4 minta), szintén nem találtunk szignifikáns miRNS expressziós különbséget.



7. ábra: A potenciálisan *MEN1*-et targetáló miRNS-ek expressziója *MEN1*-asszociált és sporadikus PHPT szövetekben. A miRNS-ek $-\Delta\text{Ct}$ értékei A) menin-pozitív és menin-negatív PHPT szövetekben, függetlenül a csírsejtes *MEN1* mutációtól; B) *MEN1*-asszociált és sporadikus, nem-szindrómás PHPT szövetekben; C) *MEN1*-asszociált, sporadikus menin-negatív és sporadikus menin-pozitív PHPT szövetekben. A magasabb $-\Delta\text{Ct}$ érték magasabb miRNS expressziót jelent. *-gal jelöltük a statisztikailag szignifikáns eltéréseket. $-\text{dCt} = -\Delta\text{Ct}$, m- = menin-negatív PHPT szövet, m+ = menin-

pozitív PHPT szövet, S = sporadikus, nem szindrómás PHPT szövet, Sm- = sporadikus, menin negatív PHPT szövet, Sm+ = sporadikus, menin-pozitív PHPT szövet, MEN1 = multiplex endokrin neoplasia 1, PHPT = primer hyperparathyreosis [160].

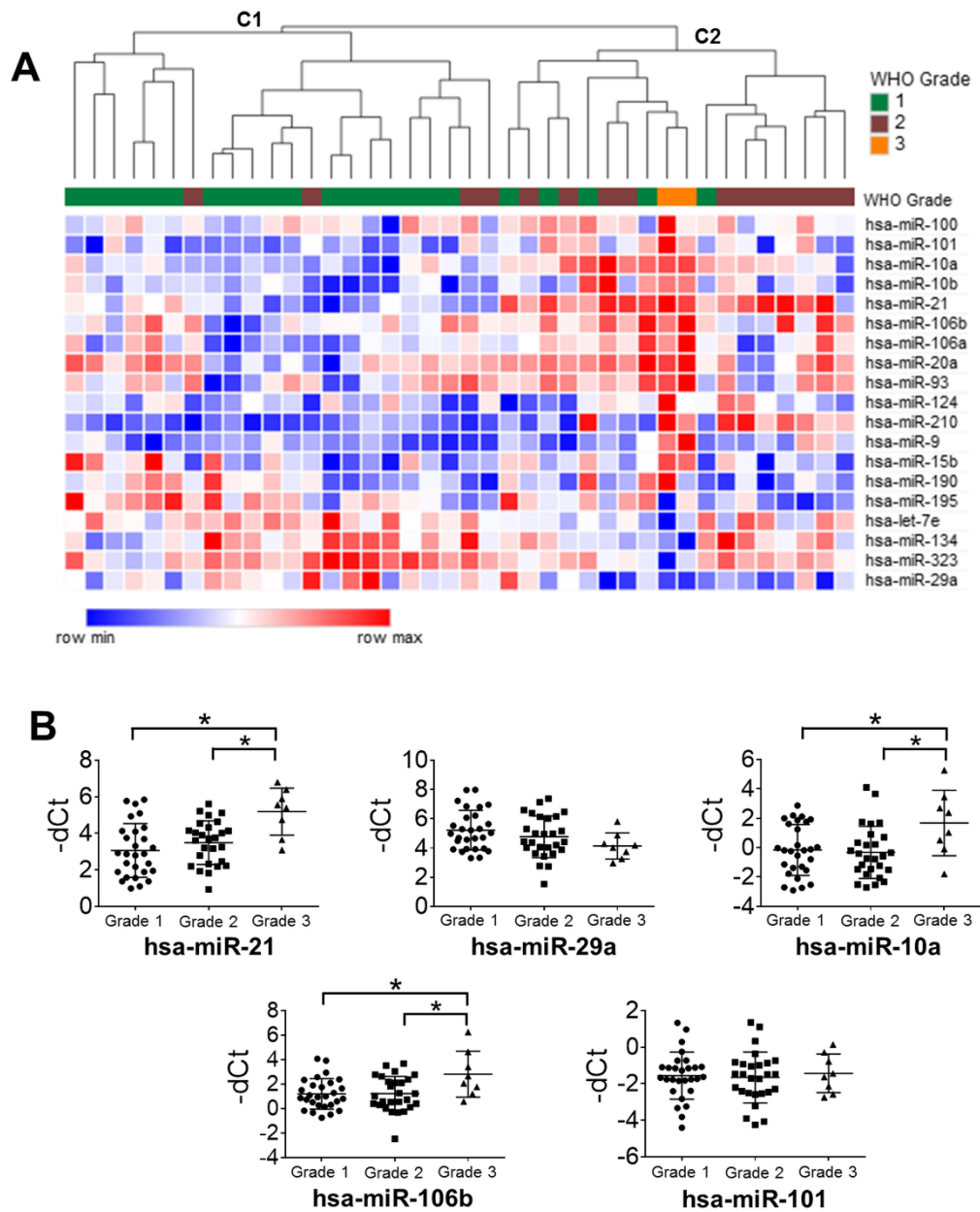
4.3. Prognosztikai jelentőségű miRNS-ek pancreas NET szövetekben

4.3.1. A szövettani grade-ek között szignifikánsan eltérő expressziójú miRNS-ek

A korábbi eredmények *in silico* reanalízisével a felderítő kohorszban (discovery cohort) 19 olyan miRNS-t találtunk, amelyek eltérő módon fejeződtek ki a pNET grádusokban (8. ábra, A). Az eltérő expressziójú miRNS-ek hierarchikus klaszteranalízise során két klaszterbe soroltuk a mintákat proliferatív tulajdonságuk szerint: a C1 klaszterbe tizenhét grade 1 és négy grade 2 tumor, míg a C2 klaszterbe öt grade 1, tizenegy grade 2 és két grade 3 tumor került (8. ábra, A).

Öt miRNS-t választottunk validálásra (miR-21, miR-29a, miR-10a, miR-106b és miR-101) egy huszonnyolc grade 1, huszonhét grade 2 és nyolc grade 3 mintából álló, független validációs kohorszban (7. táblázat). A 63 mintából 44 nem-funkcionáló NET, 17 insulinoma, egy gastrinoma és egy somatostatinoma volt. A 63 betegből 38 nő volt. Az átlag életkor $54,4 \pm 17,3$ volt. Az 5 miRNS-ből a miR-21, miR-10a és a miR-106b eltérő expresszióját igazoltuk, mindegyik felülexpresszált volt a magasabb proliferációjú pNET-ekben (8. ábra, B).

A validációs kohorszban 4 betegnek lokális nyirokcsomó- és májjáttéte is volt, 14 betegnek csak lokális nyirokcsomó metasztázisa (összesen 18 metasztatikus beteg), míg 41 betegnek nem volt áttéte a diagnóziskor. Összehasonlítottuk a fenti 3 miRNS expresszióját a metasztatikus és nem metasztatikus betegek között. A metasztatikus betegeknél magasabb miR-21 szintet találtunk a primer tumorban ($-\Delta\text{Ct}(\text{nem-metasztatikus}): 3,22 \pm 1,27$ vs. $-\Delta\text{Ct}(\text{metasztatikus}): 4,08 \pm 1,64$; $p=0,0346$); ugyanakkor nem találtunk szignifikáns különbséget a miR-10a ($-\Delta\text{Ct}(\text{nem-metasztatikus}): -0,35 \pm 1,57$ vs. $-\Delta\text{Ct}(\text{metasztatikus}): 0,47 \pm 2,30$; $p=0,1229$) és a miR-106b ($-\Delta\text{Ct}(\text{nem-metasztatikus}): 1,21 \pm 1,31$ vs. $-\Delta\text{Ct}(\text{metasztatikus}): 1,80 \pm 1,70$; $p=0,1630$) expressziója között.



8. ábra: Grade-ek szerint eltérően expresszálódó miRNS-ek felderítése és validálása PNET szövetmintákban. A) Roldo és munkatársai korábban publikált eredményeinek *in silico* reanalízise által kapott hőtércép és hierarchikus klaszteranalízis a grade-ek szerint eltérően expresszálódó miRNS-ekről. B) Az öt kiválasztott miRNS (miR-21, miR-29a, miR-10a, miR-106, miR-101) expressziójának validálása qRT-PCR-rel a validációs kohorszon. Magasabb $-\Delta\text{Ct}$ érték magasabb miRNS expressziót jelent. *-gal jelöltük a statisztikailag szignifikáns összefüggéseket [161].

4.3.2. Negatív prediktív jelentőségű miRNS-ek

49 beteg további kórlefordását tudtuk utánkövetni, $7,01 \pm 4,7$ évig. Egyváltozós varianciaanalízissel azt találtuk, hogy a miR-21, a miR-10a és a miR-106b negatív prediktorai a progressziómentes és teljes túlélésnek; ugyanakkor a többváltozós analízis csak a miR-21 független prognosztikus erejét erősítette meg pNET-ben (6. táblázat, A, B). A 49 betegből 33-nál történt progresszió az utánkövetés alatt (progresszió, tumor recidíva vagy halál). A progrediáló betegekben a miR-10a és a miR-106b szintje negatív prediktora volt a progresszióig eltelt időnek, ugyanakkor egyik miRNS sem bizonyult független prognosztikus faktornak (6. táblázat, C).

6. táblázat: Túlélés analízis a validációs kohorszban. Utánkövetési adatok 49 betegnél voltak elérhetőek. Cox proporcionális hazard regressziós modellt alkalmaztunk egyváltozós és többváltozós analízishez a miRNS-ek progressziómentes (A, n=49) és teljes (B, n=49) túlélésre gyakorolt hatásának vizsgálatára. A progressziót elszenvedett betegek esetén kiegészítő egyváltozós és többváltozós regressziós analízist végeztünk a miRNS-eknek a progresszióig eltelt időre való hatásának vizsgálatára (C, n=33). *-gal jelöltük a szignifikáns összefüggéseket. HR = hazard ratio, 95% CI = 95% konfidencia intervallum.

	Egyváltozós analízis		Többváltozós analízis	
	HR (95% CI)	p-érték	HR (95% CI)	p-érték
A				
miR-21	1.04 (1.02-1.06)	0,0002*	1.03 (1.01-1.05)	0,0120*
miR-10a	1.10 (1.04-1.16)	0,0006*	1.11 (0.89-1.38)	0,3556
miR-106b	1.04 (1.02-1.07)	0,0022*	0.97 (0.87-1.07)	0,5249
B				
miR-21	1.04 (1.02-1.05)	0,0001*	1.03 (1.00-1.05)	0,0313*
miR-10a	1.16 (1.05-1.28)	0,0023*	1.03 (0.80-1.34)	0,7997
miR-106b	1.07 (1.03-1.12)	0,0012*	1.03 (0.91-1.16)	0,6428
C				
miR-21	1.01 (1.00-1.03)	0,1665	1.00 (0.98-1.02)	0,8792
miR-10a	1.08 (1.02-1.14)	0,0049*	1.10 (0.82-1.46)	0,5246
miR-106b	1.04 (1.01-1.07)	0,0070*	0.99 (0.86-1.14)	0,8981

7. táblázat: A validációs kohorszba bevont minták klinikai és patológiai jellemzői. HPF = nagy nagyítású látótér.

Minta	Nem	Életkor (év)	Familiáris/Sporadikus	Tünetek a diagnóziskor	Klinikai diagnózis	Legnagyobb átmérő (mm)	Ki-67 index (%)	Mitózis (/10HPF)	WHO Grade	Metasztázis a diagnóziskor	Utánkövetés ideje (nap)	Beteg státusza a vizsgálat idejében
1	F	51	sporadikus	fogyás	nem-funkcionáló tumor	40	1	1	1		3988	tumormentes
2	N	60	sporadikus		nem-funkcionáló tumor	35	1	1	1	lokális nyirokcsomó és máj	5339	progresszió
3	N	45	sporadikus		nem-funkcionáló tumor	70	1	0	1			
4	F	66	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	40	1	1	1		1925	elhunyt
5	N	73	sporadikus	hasi fájdalom, fogyás	nem-funkcionáló tumor	14	2	1	1		1214	elhunyt
6	F	75	sporadikus	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	22	<0.5	0	1		4585	elhunyt
7	N	76	sporadikus		nem-funkcionáló tumor	34	1	1	1		8	elhunyt
8	F	58	sporadikus		insulinoma	10	1	0	1			
9	N	57	sporadikus	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	10	1	0	1		4880	tumormentes
10	N	37	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	60	1	1	1		4158	tumormentes
11	N	81	sporadikus	hypoglycaemia	insulinoma	12	2	1	1		736	elhunyt
12	F	56	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	35	1	0	1			
13	F	70	sporadikus		insulinoma	30	1	1	1		4150	elhunyt
14	F	49	sporadikus		insulinoma	16	1	0	1			
15	N	47	sporadikus	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	30	1	0	1		4826	tumormentes
16	F	65	sporadikus	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	18	2	0	1			
17	N	81	sporadikus	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	15	1	1	1		1800	tumormentes

Minta	Nem	Életkor (év)	Familiáris/ Sporadikus	Tünetek a diagnóziskor	Klinikai diagnózis	Legnagyobb átmérő (mm)	Ki-67 index (%)	Mitózis (/10HPF)	WHO Grade	Metasztázis a diagnóziskor	Utánkövetés ideje (nap)	Beteg státusza a vizsgálat idejében
18	F	87	sporadikus	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	15	1.5		1		871	elhunyt
19	N	24	sporadikus	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	15	1	0	1			
20	N	71	sporadikus	hasi fájdalom	nem-funkcionáló tumor	38	2	0	1			
21	N	46	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	30	1	1	1	lokális nyirokcsomó és máj	3252	progresszió
22	N	74	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	10	0.5	0	1		1572	tumormentes
23	F	56	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	45	<0.5		1		1368	tumormentes
24	N	50	sporadikus	hasi diszkomfort	nem-funkcionáló tumor		1.5		1		1273	tumormentes
25	N	26	MEN1- asszociált	hasi fájdalom	nem-funkcionáló tumor	110	<0.5		1		6677	tumor recidíva
26	N	24	MEN1- asszociált	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	30	1	1	1		1586	tumormentes
27	N	21	MEN1- asszociált	hypoglycaemia	insulinoma	15	1.5		1		2786	tumor recidíva
28	F	46	sporadikus	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	15	1	1	1			
29	F	77	sporadikus	fogyás	nem-funkcionáló tumor	35	15	1	2		1291	elhunyt
30	N	49	sporadikus		non-functioning tumor	135	3	6	2	lokális nyirokcsomó	4689	progresszió
31	F	55	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	26	1	2	2	lokális nyirokcsomó	4571	tumormentes
32	N	53	sporadikus		nem-funkcionáló tumor	50	5	4	2	NA	2530	elhunyt

Minta	Nem	Életkor (év)	Familiáris/ Sporadikus	Tünetek a diagnóziskor	Klinikai diagnózis	Legnagyobb átmérő (mm)	Ki-67 index (%)	Mitózis (/10HPF)	WHO Grade	Metasztázis a diagnóziskor	Utánkövetés ideje (nap)	Beteg státusza a vizsgálat idejében
33	N	36	sporadikus	hasi diszkomfort	somatostatinoma	50	5	1	2	lokális nyirokcsomó		
34	F	38	sporadikus		nem-funkcionáló tumor	130	15	2	2	lokális nyirokcsomó	4451	progresszió
35	F	55	sporadikus	incidentális	gastrinoma	40	7.5	1	2			
36	N	73	sporadikus	hasi diszkomfort	nem-funkcionáló tumor	28	10	3	2		3797	progresszió
37	N	39	sporadikus	hasi diszkomfort	nem-funkcionáló tumor	70	10	5	2			
38	N	70	sporadikus	hasi diszkomfort	nem-funkcionáló tumor	80	3	2	2	lokális nyirokcsomó	3179	elhunyt
39	N	62	sporadikus	hasi fájdalom	nem-funkcionáló tumor	40	4	2	2	lokális nyirokcsomó	2897	tumor recidíva
40	N	55	sporadikus	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	25	3	0	2		4624	tumormentes
41	N	70	sporadikus		nem-funkcionáló tumor	35	3	1	2		4510	tumormentes
42	F	51	sporadikus	hasmenés	nem-funkcionáló tumor	95	15	3	2		2973	progresszió
43	N	53	sporadikus	fogyás, hasmenés	nem-funkcionáló tumor	52	3	1	2		2644	progresszió
44	F	79	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	18	5	0	2		1415	elhunyt
45	N	19	MEN1- asszociált	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	18	4.5		2		3874	tumormentes
46	N	74	sporadikus	rekurrens hypoglycaemia	insulinoma	16	3	0	2		1051	elhunyt
47	N	40	sporadikus	fogyás, hasmenés	nem-funkcionáló tumor	28	1	3	2		5695	progresszió
48	F	66	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	60	9	1	2		1446	tumormentes

Minta	Nem	Életkor (év)	Familiáris/Sporadikus	Tünetek a diagnóziskor	Klinikai diagnózis	Legnagyobb átmérő (mm)	Ki-67 index (%)	Mitózis (/10HPF)	WHO Grade	Metasztázis a diagnóziskor	Utánkövetés ideje (nap)	Beteg státusza a vizsgálat idejében
49	N	56	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	30	4	0	2		2314	stabil betegség
50	N	59	sporadikus	hasi diszkomfort	nem-funkcionáló tumor	20	3	1	2		2058	tumormentes
51	N	52	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	40	10	1	2			
52	N	38	sporadikus	hasi fájdalom	nem-funkcionáló tumor	56	2	2	2		3268	progresszió
53	F	60	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor	37	7.5	2	2	lokális nyirokcsomó	1260	elhunyt
54	F	70	sporadikus	hasi fájdalom	nem-funkcionáló tumor	35	<0.5	5	2	lokális nyirokcsomó		
55	F	63	sporadikus	incidentális	nem-funkcionáló tumor		4	3	2	lokális nyirokcsomó és máj		
56	N	55	sporadikus		nem-funkcionáló tumor	10	80	52	3	lokális nyirokcsomó	250	elhunyt
57	F	74	sporadikus	hasi fájdalom, fogyás	nem-funkcionáló tumor	55	25	0	3	lokális nyirokcsomó	1238	elhunyt
58	F	68	sporadikus	hasi fájdalom, fogyás	nem-funkcionáló tumor	25	35		3	lokális nyirokcsomó	455	elhunyt
59	F	69	sporadikus	sárgaság	nem-funkcionáló tumor		70	23	3	lokális nyirokcsomó	329	elhunyt
60	N	71	sporadikus	fogyás, hányás	nem-funkcionáló tumor	70	25	12	3	lokális nyirokcsomó	569	elhunyt
61	N	71	sporadikus	sárgaság	nem-funkcionáló tumor	70	100	25	3	lokális nyirokcsomó	196	elhunyt
62	F	68	sporadikus	fogyás	nem-funkcionáló tumor		30		3	NA	616	elhunyt
63	N	59	sporadikus	fogyás, anorexia	nem-funkcionáló tumor	25	70	50	3	lokális nyirokcsomó és máj	352	elhunyt

4.4. Keringő miRNS biomarkerek pancreas NET-ben és phaeochromocytomában

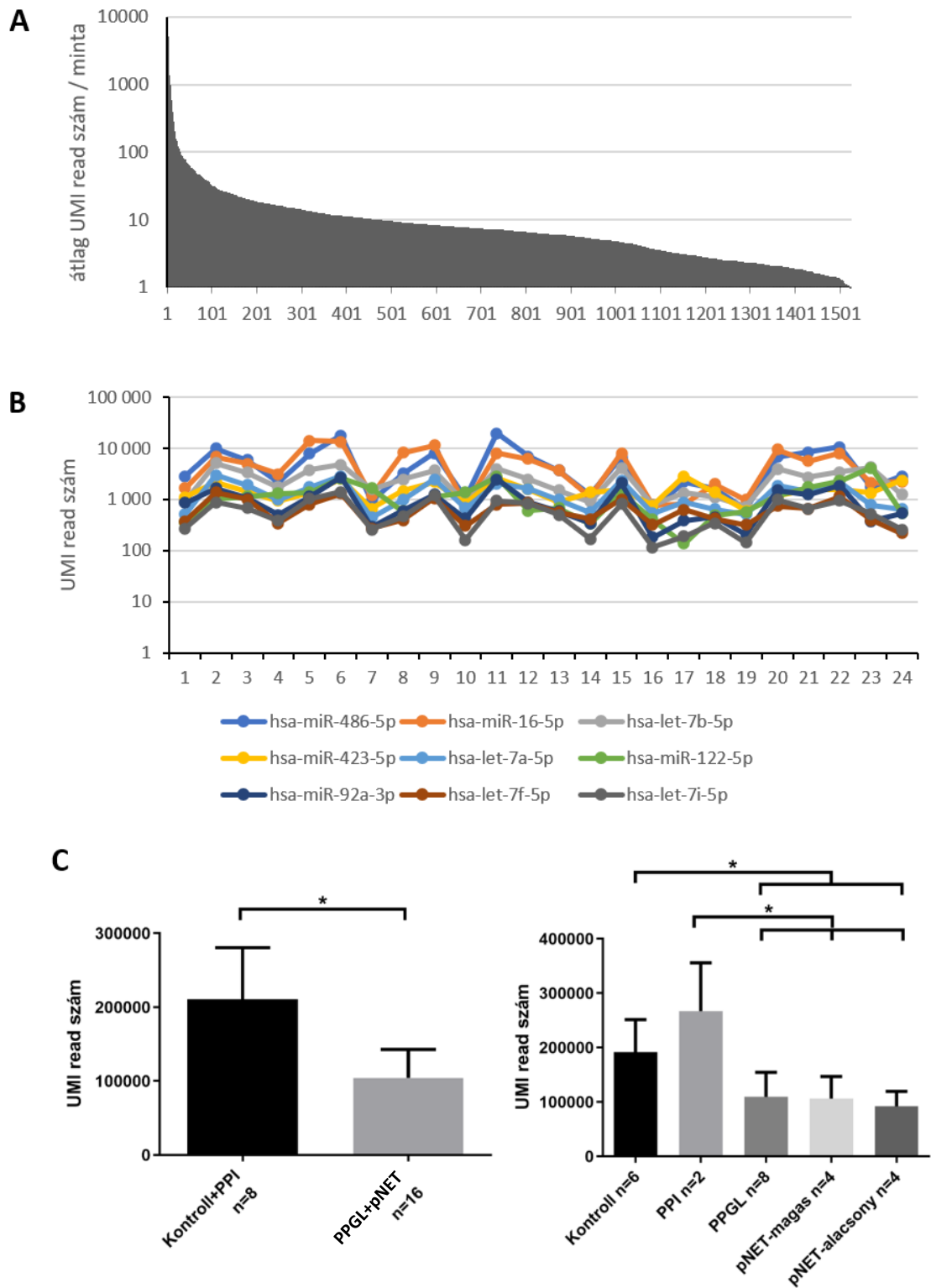
4.4.1. Sejtkontaminációt jelző miRNS-ek expressziójának vizsgálata

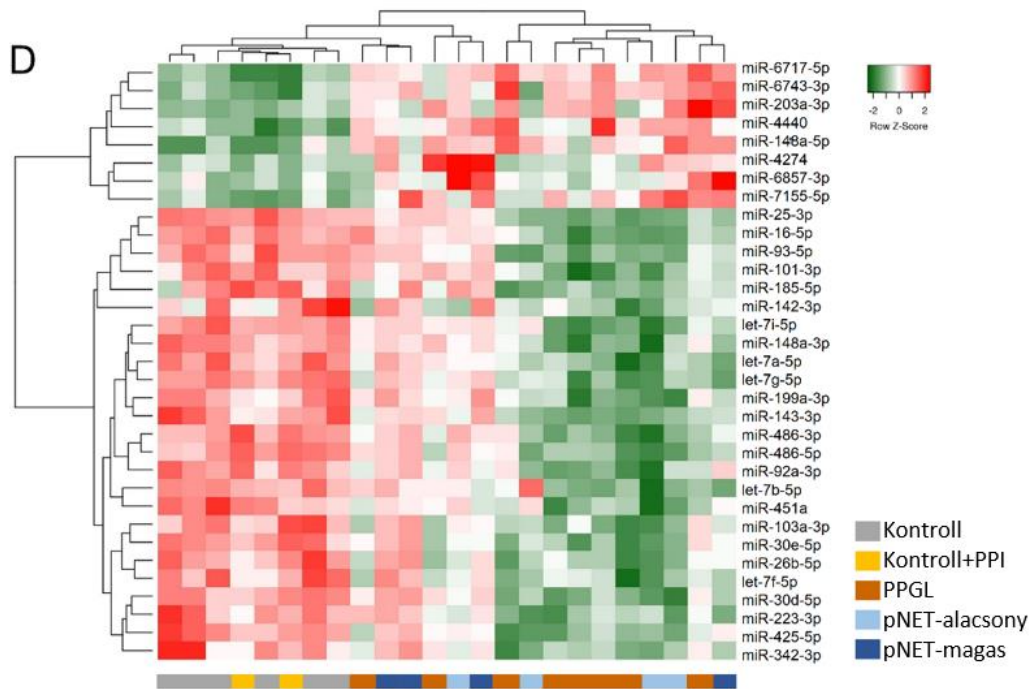
A miRNS-ek intracelluláris koncentrációja sokkal magasabb, mint a sejtmentes környezetben mért érték, ezért nagyon fontos a szérumminták sejtes (vörösvértestek, fehérvérsejtek, thrombocyták általi) kontaminációjának megelőzése. Első lépésében mintáinkon kizártuk ennek lehetőségét. A levett szérummintákon makroszkóposan hemolízis nem látszott. Shah és társai publikációja alapján a vörösvértestekben magas koncentrációban megtalálható miR-451a és a hemolízis által nem befolyásolt miR-23a-3p aránya bizonyult a hemolízis legszenzitívebb markerének, más hemoglobin-koncentrációt mérő eljárásokkal szemben [162]. A miR-451a és miR-23a-3p expressziójának aránya alapján az NGS-sel vizsgált felderítő kohorszunk egyik mintájában sem találtunk vörösvértest-kontaminációt. Más tanulmányok által talált vörösvértest- vagy thrombocyta-kontaminációt jelző miRNS-ek [163–165] expressziójában szintén alacsony varianciát találtunk (thrombocyta-kontaminációt jelző miR-142-3p varianciája a minták között 0,4; vörösvértest-kontaminációt jelző miR-451a/miR-23a-3p arány varianciája 0,3). Vizsgálatunkban csak nem kontaminált mintákat használtunk.

4.4.2. Keringő miRNS expressziós profil vizsgálata újgenerációs szekvenálással

Összesen 24 szérum mintát használtunk fel feltáró vizsgálatunkban: 8 pNET (4 alacsony, és 4 magas CgA szintű betegtől), 8 PPGL és 8 kontroll (6 független betegtől származó minta, ugyanis két beteg PPI terhelés utáni mintáját is felhasználtuk) mintát (12. táblázat). Újgenerációs szekvenálással összesen 1525 miRNS-t detektáltunk. Csupán 9 miRNS esetében, azaz a miRNS-ek 0,05%-ában találtunk mintánként >500 UMI read számot, ezek: hsa-miR-486-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-423-5p, hsa-let-7a-5p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-92a-3p, hsa-let-7f-5p, hsa-let-7i-5p. 20 miRNS esetén 100-499 UMI read/minta, 35 miRNS esetén 50-99 UMI read/minta számot találtunk. A miRNS-ek döntő többsége (1461, a miRNS-ek 95%-a) igen alacsony expressziós tartományban volt, 50 UMI read/minta alatt (9. ábra, A, B). A pNET és PPGL mintákban

a teljes miRNS expresszió szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a kontrollokhoz képest (104.415 vs. 210.573; $p=0,0030$) (9. ábra, C).





9. ábra: miRNS expresszió a vizsgálat felderítő szakaszában. A) miRNS abundancia a szérumban. A függőleges tengelyen a mintánkénti UMI read számot, a vízszintes tengelyen az UMI read szám szerint sorbarendezett miRNS-eket (sorszámokkal jelölve) ábrázoltuk. B) A 9 legabundánsabb miRNS expressziója a 24 szérummintában. C) Globális miRNS expresszió kontrollokban és pNET/PPGL mintákban. *-gal jelöltük a szignifikáns különbségeket. D) A csoportok között eltérően expresszált 33 miRNS elkülöníti a kontroll és a pNET/PPGL mintákat. A zöld szín alacsonyabb, míg a piros szín magasabb expressziót jelöl. PPI = protonpumpa inhibitor szedő kontrollok; PPGL = pheochromocytoma-paraganglioma, pNET = pancreas neuroendokrin tumor; pNET-magas/alacsony = pNET magas/alacsony CgA szinttel [166].

Az igen alacsony read-számú (<50 UMI read) miRNS-eket kizártuk a további analízisből, ugyanis korábbi vizsgálataink tapasztalata alapján ezeket később nem sikerült validálni qPCR vizsgálattal [167]. Hierarchikus cluster-analízissel 33 olyan miRNS-t találtunk, amelyek egyértelműen elkülönítették a pNET és PPGL betegeket az egészséges kontroll mintáktól, függetlenül a PPI szedéstől (8. táblázat, 9. ábra, D). A pNET mintákat 19 szignifikánsan alul- és 7 szignifikánsan felülexpresszált miRNS, míg a PPGL mintákat

25 szignifikánsan alul- és 6 szignifikánsan felülexpresszált minta különítette el az egészséges kontrolloktól (8. táblázat). Ugyanakkor a pNET és PPGL mintákat nem sikerült elkülöníteni egymástól miRNS mintázat alapján (9. ábra, D). Nem találtunk olyan miRNS-t sem, amely szignifikánsan eltérően expresszáldott volna az egészséges kontrollok PPI szedése előtt és után.

A miRNS expresszió és a CgA szérumszint korrelációját vizsgálva 19 miRNS expressziója korrelált szignifikánsan a CgA szinttel, ezek között a hsa-let-7g-5p esetében találtuk a legerősebb összefüggést ($R = -0,73$; $p = 0,03077$).

8. táblázat: 33 eltérően expresszált miRNS a kontrollok (PPI szedés után vagy anélkül) ill. a PPG és pNET csoportok között. Kontroll&PPI = minden kontroll, beleértve a PPI szedés utáni mintákat is. PPGL = phaeochromocytoma-paraganglioma, PPI = protonpumpa inhibitor kezelés, pNET = pancreas neuroendokrin tumor, log2FC = log2fold change, post-hoc p-érték = p-érték Tukey-féle post-hoc tesztet és Benjamini-Hochberg korrekciót követően.

miRNS	ANOVA p-érték	pNET vs. kontroll&PPI		PGGL vs. kontroll&PPI		pNET vs PPGL	
		log2FC	post-hoc p-érték	log2FC	post-hoc p-érték	log2FC	post-hoc p-érték
miR-223-3p	0.0015	-1.62	0.0304	-2.27	0.0235	0.65	1
miR-486-3p	0.0002	-1.56	0.0177	-2.51	0.0066	0.95	1
miR-451a	0.0003	-1.42	0.0257	-2.35	0.0058	0.93	1
miR-16-5p	0.0009	-1.48	0.0320	-2.00	0.0139	0.52	1
miR-25-3p	0.0001	-1.48	0.0153	-2.10	0.0054	0.62	1
miR-143-3p	0.0001	-1.35	0.0240	-2.34	0.0031	1.00	1
miR-101-3p	0.0040	-1.31	0.0823	-1.90	0.0273	0.60	1
miR-486-5p	0.0005	-1.27	0.0413	-2.50	0.0066	1.23	1
miR-425-5p	0.0000	-1.23	0.0178	-2.23	0.0024	0.99	1
miR-148a-3p	0.0010	-1.25	0.0322	-1.82	0.0146	0.57	1
miR-93-5p	0.0003	-1.29	0.0240	-1.97	0.0066	0.68	1
let-7g-5p	0.0000	-1.14	0.0178	-2.20	0.0024	1.06	1
let-7i-5p	0.0003	-1.06	0.0316	-1.89	0.0055	0.83	1
miR-92a-3p	0.0004	-1.05	0.0440	-2.05	0.0060	1.01	1
let-7a-5p	0.0003	-1.00	0.0235	-1.66	0.0064	0.66	1
miR-185-5p	0.0008	-1.02	0.0859	-2.23	0.0079	1.22	1
miR-342-3p	0.0029	-0.97	0.0624	-1.63	0.0249	0.66	1
miR-30e-5p	0.0001	-0.93	0.0295	-1.77	0.0031	0.84	1
miR-142-3p	0.0055	-0.85	0.1610	-1.71	0.0287	0.86	1
miR-30d-5p	0.0015	-0.88	0.0432	-1.57	0.0165	0.69	1

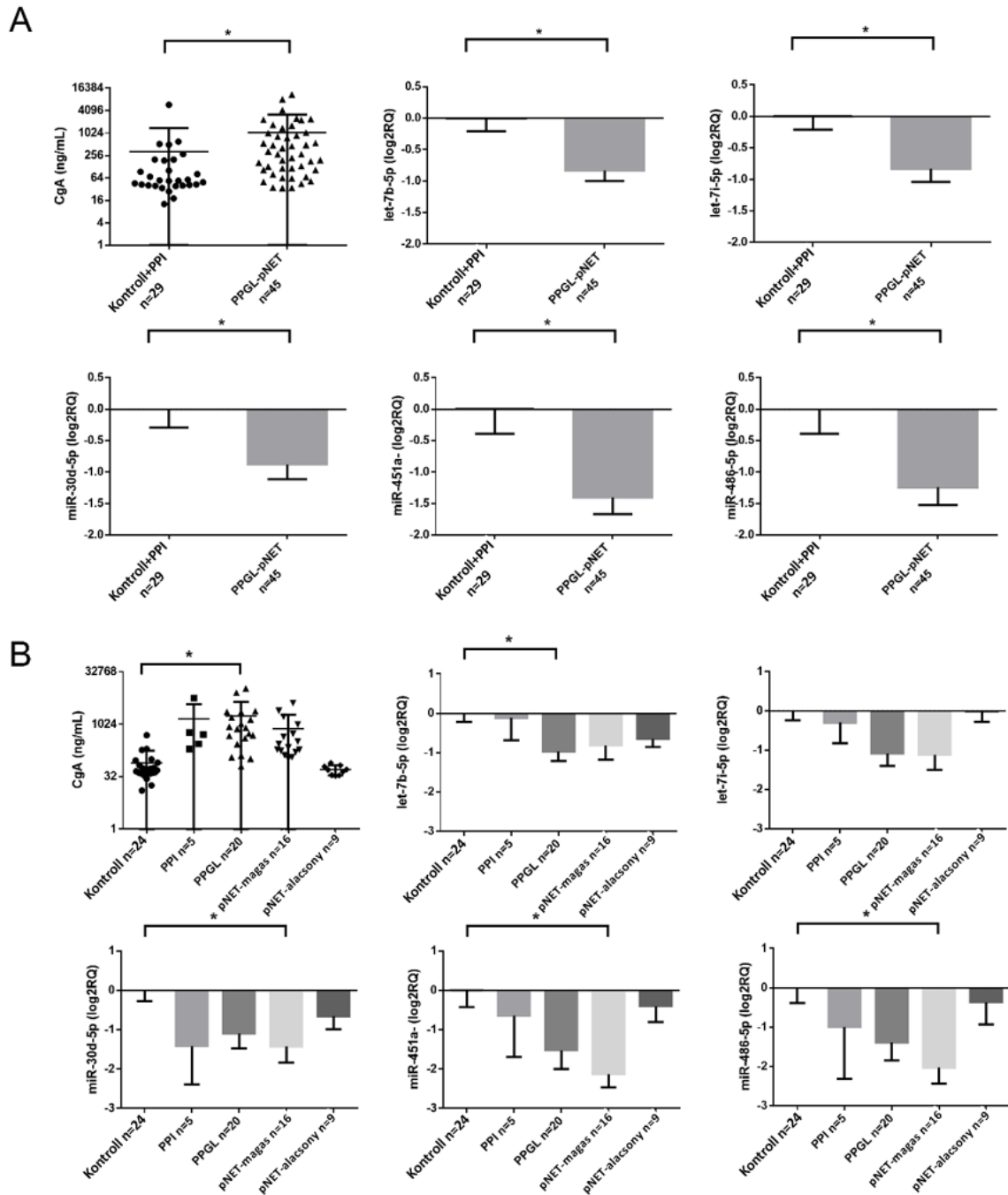
let-7b-5p	0.0029	-0.84	0.0539	-1.51	0.0261	0.67	1
let-7f-5p	0.0007	-0.75	0.0475	-1.41	0.0081	0.66	1
miR-199a-3p	0.0069	-0.77	0.1009	-1.47	0.0375	0.70	1
miR-103a-3p	0.0003	-0.74	0.0371	-1.38	0.0055	0.63	1
miR-26b-5p	0.0003	-0.65	0.0424	-1.31	0.0054	0.66	1
miR-6743-3p	0.0002	0.61	0.0179	0.45	0.0054	0.15	1
miR-4440	0.0000	0.65	0.0107	0.54	0.0031	0.11	1
miR-6717-5p	0.0000	0.66	0.0009	0.43	0.0007	0.23	1
miR-148a-5p	0.0000	0.89	0.0067	0.59	0.0054	0.30	1
miR-7155-5p	0.0002	0.96	0.0071	0.31	0.0358	0.65	1
miR-203a-3p	0.0006	1.54	0.0716	2.07	0.0066	-0.54	1
miR-6857-3p	0.0071	2.67	0.0316	0.49	0.6878	2.18	1
miR-4274	0.0055	3.09	0.0279	1.23	0.6318	1.86	1

4.4.3. A kiválasztott miRNS-ek validálása

A validálást nagyobb mintaszámon végeztük el: 25 pNET és 20 PPGL mintát, valamint 29 kontroll mintát (5 PPI szedés utáni és 24 PPI szedés nélküli minta) használtunk, a feltárási vizsgálatban használt mintákkal együtt (12. táblázat).

Az újgenerációs szekvenálással kapott miRNS abundancia alapján választottunk ki miRNS-eket validálásra. A nyers UMI read számokat, a cel-miR-39-3p-re normalizált és a TMM normalizált eredményeket összevetve kiválasztottunk 6 miRNS-t validálásra, amelyek a pNET/PPGL mintákban alulexpresszáltak voltak: let-7b-5p; let-7i-5p; miR-143-3p; miR-30d-5p; miR-451a; miR-486-5p. Az alacsony read-számok ellenére (átlagosan 68 UMI read pNET/PPGL mintákban vs. 19 UMI read kontrollokban) a leginkább felulexpresszált miR-203a-3p-t is vizsgáltuk a validálás során.

Mind a 6 kiválasztott miRNS alulexpresszióját igazolni tudtuk RT-qPCR validációs vizsgálattal (10. ábra, A). Szignifikánsan alulexpresszáltak volt a miR-30d-5p, miR-451a és miR-486-5p alacsony CgA szintű pNET betegekben, valamint a let-7b-5p PPGL betegekben a kontrollokhoz képest (PPI szedés nélkül) (10. ábra, B). A miR-203a-3p felulexpresszióját nem tudtuk RT-qPCR vizsgálattal validálni, egyedül egy olyan pNET beteg mintájában, akinél igen magas CgA szintet mértünk (CgA 2490,8 ng/mL).



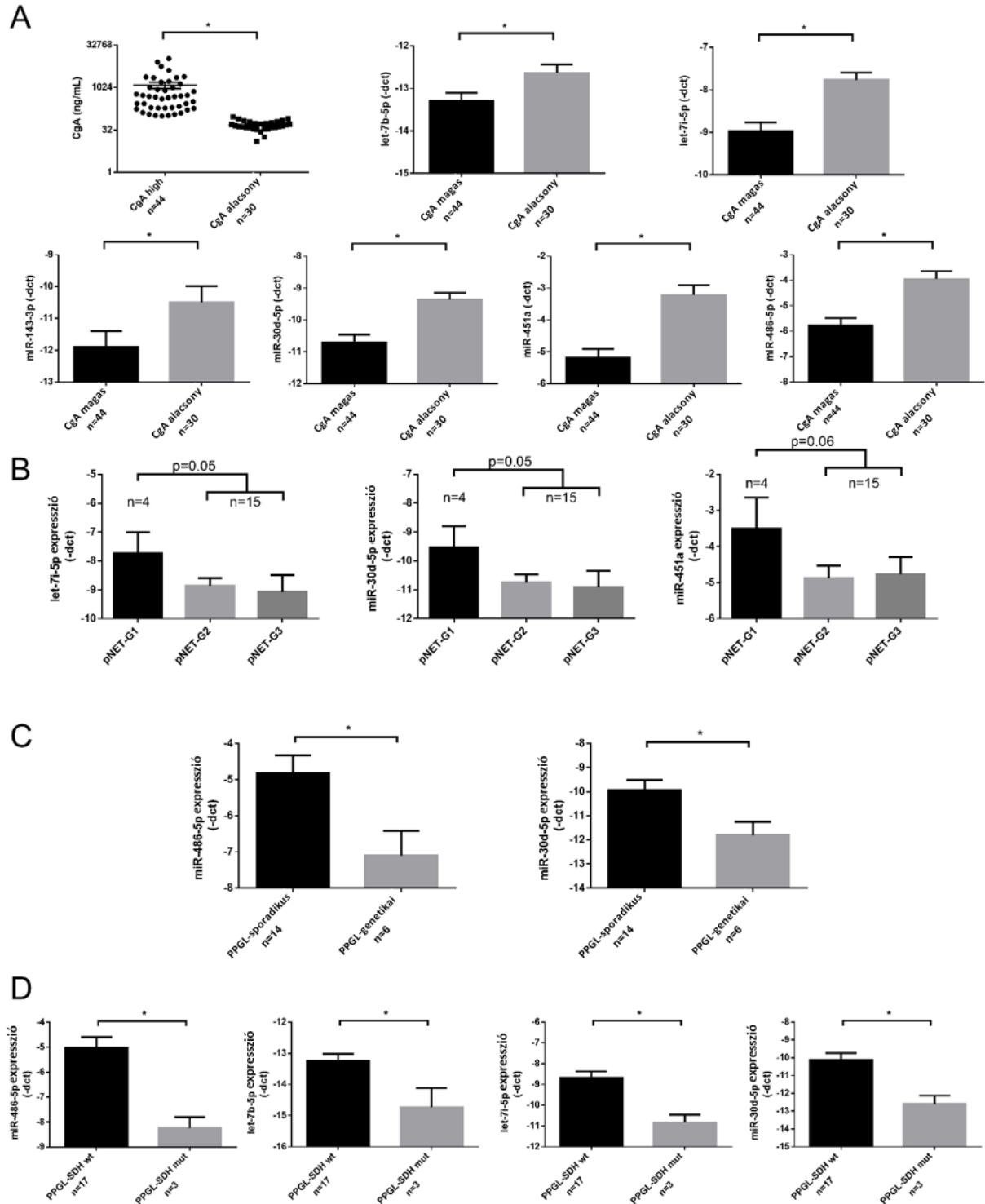
10. ábra: CgA szint és miRNS expresszió összehasonlítása kontroll és pNET/PPGL csoportokban: A) két csoport összehasonlításával, B) 5 csoport összehasonlításával. * - gal jelöltük a szignifikáns különbségeket. CgA = chromogranin A, PPI = protonpumpa inhibitor, PPGL = pheochromocytoma-paraganglioma, pNET = pancreas neuroendokrin tumor, pNET-magas/alacsony = pNET magas/alacsony CgA szinttel [166].

4.4.4. Összefüggések a miRNS-ek expressziója és a kliniko-patológiai paraméterek között

Nem találtunk különbséget a pNET/PPGL és a PPI-t szedő kontrollok miRNS expressziója között. Ugyanakkor az összes minta egyidejű elemzésekor azt találtuk, hogy a let-7b-5p, let-7i-5p, miR-143-3p, miR-30d-5p, miR-451a és a miR-486-5p expressziója alacsonyabb volt a magas (>100 ng/mL) CgA szintű mintákban a normál CgA szintű (<100 ng/mL) mintákhoz képest (11. ábra, A). Mind a 6 miRNS expressziója negatívan korrelált a szérumban CgA szinttel. Ez a negatív korreláció az egyes betegcsoportokban vizsgálva egyedül a kontroll csoportban áll fenn, a pNET vagy PPGL mintákban nem (9. táblázat).

A tumor grade és a miRNS-ek vizsgálatakor a pNET csoportban inverz korrelációra jellemző tendenciát találtunk a let-7i-5p, miR-30d-5p és a miR-451a expressziója és a grade között (11. ábra, B).

A PPGL betegek mintáiban csak a miR-486-5p esetében találtunk inverz korrelációt a CgA szintjével (9. táblázat). Korábbi tanulmányokban, köztük munkacsoportunk közleményében különböző miRNS mintázatokról számoltak be malignus vs. benignus [140] és sporadikus vs. öröklődő PPGL [138] esetekben. Munkánkban ezért megvizsgáltuk ezek összefüggését a mintáink miRNS profiljával. A csírasejtes mutációt (*SDHB*, *RET*, *VHL*, *NFI*) hordozó PPGL mintákban alacsony miR-486-5p és miR-30d-5p expressziót találtunk a sporadikus PPGL esetekhez képest (11. ábra, C). A csírasejtes *SDHB* mutációt hordozó betegekben a miR-486-5p és miR-30d-5p miR-eken kívül a let-7b-5p és a let-7i-5p is alulexpresszált volt a vad típusú *SDHB* hordozókhoz képest (11. ábra, D).



11. ábra: A miRNAs expresszió validálása qPCR-rel A) magas vs. alacsony CgA szintű mintákban, B) különböző grádusú pNET-ekben, C) sporadikus vs. csírasejtes mutáció okozta PPGL-ben, D) *SDHB* mutáció asszociált vs. nem asszociált PPGL-ben. *-gal jelöltük a szignifikáns összefüggéseket. PPGL = pheochromocytoma-paraganglioma,

pNET = pancreas neuroendokrin tumor, PPGL-SDH wt = vad típusú *SDH* allélt hordozó, PPGL-SDH mut = mutáns *SDH* allélt hordozó [166].

9. táblázat: CgA és miRNS expresszió korrelációja a validációs kohorszban (CgA vs. -dct).

Összes minta (n=74)		
Korreláció	Spearman	p-érték
CgA & let-7b-5p	-0.29	0.0125
CgA & let-7i-5p	-0.46	0.0000
CgA & miR-143-3p	-0.34	0.0029
CgA & miR-30d-5p	-0.39	0.0007
CgA & miR-451a	-0.50	0.0000
CgA & miR-486-5p	-0.39	0.0006
Kontroll&PPI (n=29)		
Korreláció	Spearman	p-érték
CgA & let-7b-5p	-0.27	0.1599
CgA & let-7i-5p	-0.42	0.0249
CgA & miR-143-3p	-0.40	0.0293
CgA & miR-30d-5p	-0.39	0.0377
CgA & miR-451a	-0.40	0.0334
CgA & miR-486-5p	-0.17	0.3852
PPGL (n=20)		
Korreláció	Spearman	p-érték
CgA & let-7b-5p	-0.05	0.8256
CgA & let-7i-5p	-0.42	0.0655
CgA & miR-143-3p	-0.37	0.1069
CgA & miR-30d-5p	-0.35	0.1317
CgA & miR-451a	-0.38	0.1009
CgA & miR-486-5p	-0.45	0.0451
pNET (n=25)		
Korreláció	Spearman	p-érték
CgA & let-7b-5p	-0.04	0.8380
CgA & let-7i-5p	-0.22	0.2838
CgA & miR-143-3p	-0.14	0.5116
CgA & miR-30d-5p	-0.02	0.9157
CgA & miR-451a	-0.32	0.1198
CgA & miR-486-5p	-0.18	0.3892

4.4.5. A keringő miRNS-ek diagnosztikus értéke PPGL/pNET esetekben

A CgA-nak és az egyes miRNS-eknek azt a képességét, hogy mennyire tudják egymástól elkülöníteni a pNET és PPGL betegeket a kontrolloktól, receiver-operator characteristic (ROC) analízissel vizsgáltuk. Bináris logisztikus regressziós modelleket használtunk, amelyekben a különböző miRNS-eket egymással illetve a CgA-t és az egyes miRNS-eket kombináltuk. Összesen 6 miRNS-t vizsgáltunk egyenként és kombinációkban (let-7b-5p, let-7i-5p, miR-143-3p, miR-30d-5p, miR-451a, és miR-486-5p) (10. táblázat).

A pNET csoportban a ROC analízis során a let-7b-5p, miR-30d-5p, miR-451a, és miR-486-5p miRNS-ek önmagukban jobb diszkriminációs erővel rendelkeztek, mint a CgA önmagában. A CgA és 4 miRNS-ből (let-7b-5p, let-7i-5p, hsa-miR-143-3p, miR-30d-5p) álló kombináció elkülönítő ereje bizonyult a legjobbnak a pNET és a kontroll csoport diszkriminációjára, 72,2%-os diagnosztikus pontossággal (AUC: 0,752; szenzitivitás: 78,8%, specificitás 68%) (10. táblázat).

A klinikai gyakorlatban nehézséget jelentenek azok a pNET-ben szenvedő betegek, akiknél alacsony CgA szintet (<100 ng/mL) mérünk. A miRNS profilozás ezért különösen érdekes lehet ezekben az esetekben. A let-7b-5p és a miR-143-3p expressziója külön-külön jobban elkülönítette ezeket a betegeket a kontrolloktól a CgA-hoz képest (10. táblázat). A CgA és 5 miRNS kombinációja diszkriminálta a legjobban az alacsony CgA szintű pNET mintákat a kontrollokhoz képest (CgA szinttől függetlenül) egy logisztikus regressziós modellben; 89,4%-os diagnosztikus pontossággal (AUC: 0,904; szenzitivitás: 66,6%; specificitás: 96,5%) (10. táblázat).

Az általunk vizsgált PPGL minták közül mindegyik esetben emelkedett CgA szintet találtunk, ezzel összefüggésben a CgA elkülönítő ereje bizonyult a legerősebbnek; diagnosztikus pontossága 81,6% volt (AUC: 0,890; szenzitivitás 95%; specificitás 72,4%; $p < 0,0001$). Bináris regressziós modell segítségével igazoltuk, hogy a PPGL és kontroll minták elkülönítésében a CgA és 3 miRNS (let-7b-5p, miR-143-3p és miR-486-5p) kombinációja magasabb specificitást eredményezett, mint a CgA önmagában, 83,6%-os diagnosztikus pontossággal, bár alacsonyabb szenzitivitással (AUC: 0,862; szenzitivitás 85%; specificitás 82,7%) (10. táblázat).

10. táblázat: A CgA, az egyes miRNS-ek és ezek kombinációjának diagnosztikus pontossága az egyes csoportokban. A legjobb kombinációkat bináris regressziós modell segítségével határoztuk meg. Cut-off* = cut-off érték a CgA esetében ng/mL-ben, miRNS-ek esetén dCt-ben. Cut-off** = cut-off a bináris regressziós modellben. AUC = area under curve (görbe alatti terület).

PPGL vs. kontroll&PPI	AUC	Cut-off *	Szenzitivitás %	Specifititás %	p-érték
CgA	0,890	>102,3	95,0	72,4	<0,0001
let-7b-5p	0,707	>12,5	90,0	48,3	0,0147
let-7i-5p	0,710	>5,7	100,0	3,4	0,0135
miR-143-3p	0,598	>7,7	100,0	27,6	0,2463
miR-30d-5p	0,643	>9,9	65,0	65,5	0,0914
miR-451a	0,678	>5,8	45,0	86,2	0,0353
miR-486-5p	0,660	>7,3	30,0	96,6	0,0586
Legjobb kombináció:	AUC	Cut-off **	Szenzitivitás %	Specifititás %	p-érték
CgA+let-7b-5p+miR-143-3p +miR-486-5p	0,862	0,4	85,0	82,8	0,0085
pNET vs. kontroll&PPI	AUC	Cut-off *	Szenzitivitás %	Specifititás %	p-érték
CgA	0,672	>102,5	64,0	72,4	0,0308
let-7b-5p	0,702	>12,9	80,0	62,1	0,0111
let-7i-5p	0,661	>7,9	80,0	51,7	0,0433
miR-143-3p	0,661	>9,0	100,0	41,4	0,0433
miR-30d-5p	0,675	>9,7	76,0	62,1	0,0276
miR-451a	0,692	>2,9	96,0	41,4	0,0159
miR-486-5p	0,712	>4,2	88,0	58,6	0,0078
Legjobb kombináció:	AUC	Cut-off **	Szenzitivitás %	Specifititás %	p-érték
CgA+let-7b-5p+let-7i-5p+miR-143-3p +miR-30d-5p	0,752	0,5	75,9	68,0	0,0351
Alacsony CgA pNET vs. kontroll&PPI	AUC	Cut-off *	Szenzitivitás %	Specifititás %	p-érték
CgA	0,613	<79,6	100,0	37,9	0,3112
let-7b-5p	0,651	>12,9	77,8	62,1	0,1751
let-7i-5p	0,517	<8,8	100,0	20,7	0,8772
miR-143-3p	0,646	>9,9	100,0	48,3	0,1920
miR-30d-5p	0,577	>9,4	77,8	55,2	0,4923
miR-451a	0,527	>2,9	88,9	41,4	0,8101
miR-486-5p	0,561	>4,2	66,7	58,6	0,5828
Legjobb kombináció:	AUC	Cut-off **	Szenzitivitás %	Specifititás %	p-érték
CgA+let-7b-5p+let-7i-5p+miR-143-3p +miR-30d-5p+miR-486-5p	0,904	0,55	66,7	96,6	0,0342

4.4.6. Deregulált pNET/PPGL szöveti miRNS-ek vizsgálata szérumban

A keringő miRNS-ek potenciális eredetének vizsgálatára összegyűjtöttük 12 tanulmányból származó adatokat, amelyek pNET [130–132,134,154–156] és PPGL [138–141,157] betegek szöveti miRNS mintázatát elemezték. Ezek eredményeit összevetettük az általunk talált eltérően expresszálódó miRNS-ekkel; így pNET

esetekben 9, PPGL esetekben 3 olyan miRNS-t találtunk, amelyek szövetben és szérumban is dereguláltak voltak (11. táblázat). Ezek közül csak a miR-203-3p volt felülexpresszáva mind pNET szövetben, mind szérumban. A többi miRNS mindegyike felülexpresszált volt pNET szövetben, míg alulexpresszált pNET szérumban. A miR-101-3p felülexpresszált volt malignus PPGL szövetben a benignushoz képest; míg szérumban alulexpresszált volt a kontrollokhoz képest. A miR-16-5p és a miR-451a, mint lehetséges tumorszuppresszor miRNS-ek, alulexpresszáltak volt a PPGL szövetben és szérumban is (11. táblázat).

11. táblázat: Eltérően expresszált miRNS-ek összehasonlítása szérumban vs. pNET/PPGL szövetben. A táblázatban a szérumban és szövetben egyaránt leírt miRNS-eket tüntettük fel. PACC = pancreas acináris sejtes carcinoma, GEP-NET = gastroenteropancreaticus neuroendokrin tumor, INS = insulinoma, NF-pNET = nem-funkcionáló pancreas neuroendokrin tumor, PCC = phaeochromocytoma, SDHD = szukcinát dehidrogenáz D alegységét kódoló gén.

pNET					
miRNS	Korrigált p-érték	Kontroll átlag UMI read szám	pNET		Referencia
miR-103a-3p	0,0371	109	65	Roldo és mtsai 2006 [**]	felülexpresszált pNET+PACC-ben vs. NP
miR-26b-5p	0,0423	115	73	Zimmermann és mtsai 2018 [**]	negatív korreláció Ki-67-tel GEP-NET-ben
miR-143-3p	0,0240	110	43	Roldo és mtsai 2006 [**]	felülexpresszált pNET+PACC-ben vs. NP
miR-451a	0,0257	198	74	Jiang és mtsai 2015 [**]	felülexpresszált INS-ban vs. pancreas sziget
miR-25	0,0153	383	138	Jiang és mtsai 2015 [**]	felülexpresszált INS-ban vs. pancreas sziget
miR-425-5p	0,01781	111	47	Zimmermann és mtsai 2018 [**]	felülexpresszált nyecs met-ben vs. primer GEP-NET-ben
miR-93-5p	0,0240	286	117	Zimmermann és mtsai 2018 [**]	felülexpresszált nyecs met-ben vs. primer GEP-NET-ben
miR-16-5p	0,0320	9670	3475	Grolmusz és mtsai 2018 [**]	magasabb expresszió magasabb grádusú pNET-ben
miR-203a-3p	0,0715	19	56	Zimmermann és mtsai 2018 [**]	negatív korreláció Ki-67-tel GEP-NET-ben
				Roldo és mtsai 2006 [**]	felülexpresszált INS-ban vs NF-pNET
PPGL					
miRNA	Korrigált p-érték	Kontroll átlag UMI read szám	PPGL		Referencia
miR-101-3p	0,0273	209	56	Zong és mtsai.2015 [**]	magasabb expresszió malignus vs. benignus PCC-ben
				Patterson és mtsai 2012 [**]	magasabb expresszió malignus vs. benignus PCC-ben
miR-16-5p	0,0139	9 670	2 423	Meyer-Rochow és mtsai 2010 [**]	alulexpresszált malignus vs. benignus PCC-ben
miR-451a	0,005	198	39	Meyer-Rochow és mtsai 2010 [**]	alulexpresszált malignus vs. benignus PCC-ben

12. táblázat: A keringő miRNS vizsgálatba bevont pNET, PPGL és kontroll betegek.

A következő párosított minták ugyanattól az egészséges kontrolltól származnak PPI kezelés előtt és után: 45+46; 47+48; 67+68; 33+49; 69+70. PPGL = phaeochromocytoma-paraganlioma, PCC = phaeochromocytoma, PGL = paraganglioma, SDHB = szukcinát dehidrogenáz B alegység génje, VHL = von Hippel Lindau gén, NF1 = neurofibromatosis 1 gén, pNET = pancreas neuroendokrin tumor, rec = recidíva, met = metasztázis, G1-G2-G3 = grade 1-2-3, PPI = protonpumpa inhibitor, NA = nincs adat.

Minta	Nem	Életkor	Csoport	CgA (ng/mL; Ref: 19,4-98,1)	PPGL: benignus/malignus, pNET: grade G1- G2-G3	Vizsgálat
51	N	12	PPGL (PCC)	548,6	benignus (pr)	NGS&qPCR
52	F	41	PPGL (PCC)	10870	benignus (pr)	NGS&qPCR
53	F	51	PPGL (SDHB mutáció-asszociált PCC; nincs más tu.)	863,4	benignus (pr)	NGS&qPCR
18	N	47	PPGL (MEN2 asszociált PCC)	402,9	malignus (rec&met)	qPCR
19	N	45	PPGL (PCC)	128,1	malignus (rec)	qPCR
23	N	67	PPGL (PCC)	749,6	benignus (pr)	qPCR
20	F	56	PPGL (PGL)	8166	malignus (rec&met)	qPCR
56	F	40	PPGL (SDHB mutáció-asszociált PGL)	2265	malignus (rec&met)	NGS&qPCR
57	N	69	PPGL (PCC)	1375	malignus (rec&met)	NGS&qPCR
21	N	44	PPGL (PGL)	273	malignus (rec&met)	qPCR
62	N	48	PPGL (PCC)	2409	benignus (pr)	NGS&qPCR
28	F	20	PPGL (PCC)	809,5	NA	qPCR
22	N	35	PPGL (NF1 mutáció-asszociált PCC; nincs más tu.)	1602	malignus (rec&met)	qPCR
64	N	35	PPGL (PCC)	487,9	benignus (pr)	NGS&qPCR
26	F	24	PPGL (VHL mutáció-asszociált PCC; nincs más tu.)	63,2	malignus (bilaterális)	qPCR
24	N	69	PPGL (PCC)	2295	malignus (rec&met)	qPCR
29	F	21	PPGL (PCC)	104,1	benignus (pr)	qPCR
27	N	62	PPGL (PCC)	115	benignus (pr)	qPCR
66	N	15	PPGL (SDHB mutáció-asszociált PCC)	470,8	malignus (rec&met)	NGS&qPCR
25	F	36	PPGL (PCC)	1037,4	malignus (rec&met)	qPCR
1	F	75	pNET	34,2	G1	qPCR
54	N	58	pNET	191,5	NA	NGS&qPCR
55	F	67	pNET	176,6	G3	NGS&qPCR
2	F	57	pNET	35,2	G2	qPCR
3	N	62	pNET	62,2	G2	qPCR
4	F	77	pNET	67,9	G2	qPCR
58	N	66	pNET	162,7	NA	NGS&qPCR
59	F	52	pNET	448,5	G2	NGS&qPCR
5	N	62	pNET	44,2	G2	qPCR
60	F	72	pNET	1679	G2	NGS&qPCR
61	N	61	pNET	543,6	G2	NGS&qPCR
6	F	39	pNET	327,4	G3	qPCR
63	N	47	pNET	1009	G2	NGS&qPCR
7	F	68	pNET	219,2	G2	qPCR
65	F	74	pNET	104,5	G1	NGS&qPCR
8	F	42	pNET	190,1	G3	qPCR
9	N	48	pNET	115,4	NA	qPCR
10	N	82	pNET	79,1	G1	qPCR
11	N	76	pNET	132	G2	qPCR
12	N	58	pNET	51,5	G1	qPCR

13	F	75	pNET	2490,8	NA	qPCR
14	N	64	pNET	4163	G2	qPCR
15	N	59	pNET	275,7	NA	qPCR
16	F	72	pNET	49,8	G2	qPCR
17	F	73	pNET	34,4	NA	qPCR
74	F	77	kontroll	38,5		qPCR
38	F	71	kontroll	53,7		qPCR
40	N	49	kontroll	12,7		qPCR
31	F	49	kontroll	41,5		qPCR
76	F	44	kontroll	39,8		NGS&qPCR
36	N	68	kontroll	100,4		qPCR
30	N	13	kontroll	18		qPCR
34	F	40	kontroll	40,2		qPCR
35	N	69	kontroll	48,7		qPCR
41	N	47	kontroll	93		qPCR
39	N	63	kontroll	55		qPCR
75	F	65	kontroll	39		qPCR
37	F	55	kontroll	57,2		qPCR
73	F	47	kontroll	34		NGS&qPCR
43	N	16	kontroll	52,6		qPCR
42	N	33	kontroll	68,4		qPCR
72	N	46	kontroll	42,8		NGS&qPCR
32	N	58	kontroll	80,2		qPCR
71	F	37	kontroll	27,7		NGS&qPCR
45	N	72	egészséges kontroll PPI nélkül	494		qPCR
46	N	72	egészséges kontroll PPI után	5775		qPCR
47	N	62	egészséges kontroll PPI nélkül	198,9		qPCR
48	N	62	egészséges kontroll PPI után	516		qPCR
67	N	39	egészséges kontroll PPI nélkül	42,3		NGS&qPCR
68	N	39	egészséges kontroll PPI után	197,8		NGS&qPCR
33	F	64	egészséges kontroll PPI nélkül	186,7		qPCR
49	F	64	egészséges kontroll PPI után	595,4		qPCR
69	N	46	egészséges kontroll PPI nélkül	45,6		NGS&qPCR
70	N	46	egészséges kontroll PPI után	278		NGS&qPCR

5. Megbeszélés

5.1. A hazai MEN1 adatbázis elemzése, genotípus-fenotípus összefüggései

Vizsgálatunkban összegyűjtöttük az összes, 2001-2017 között Magyarországon *MEN1* genetikai vizsgálaton átesett beteg adatait. Eredményeink alapján a *MEN1* mutációk becsült frekvenciája Magyarországon 0,48/100.000 fő, amely a szakirodalomban közölt adatokhoz képest kissé alacsonyabb [6]. Ugyanakkor az elmúlt években közölt olasz [50], svéd [168] és francia [29] multicentrikus, közel a teljes populációt felölelő vizsgálatok eredményeihez képest a *MEN1* mutáció frekvenciája valamint az érintett családok relatív száma a populációhoz képest Magyarországon hasonló. A mutáció detektálási ráta (a mutáció-pozitívak aránya az összes index beteg között) vizsgálatunkban 26% volt, a svéd *MEN1* kohorszhoz hasonlóan [168]. A 24 különböző *MEN1* mutációból ötöt közleményünk megjelenésének idejében legjobb tudomásunk szerint még nem közöltek.

A 27 genetikailag igazolt *MEN1* szindrómás index betegen kívül 77 független, *MEN1*-re utaló klinikumú (*MEN1* gyanús) index beteget referáltak Endokrin Genetikai Laboratóriumunkba; ez utóbbiak között nem találtunk *MEN1* mutációt. A 77 beteg mindegyike teljesítette a *MEN1* genetikai vizsgálat indikációit, azonban nem mindegyiknél volt kimondható a *MEN1* szindróma diagnózisa (*MEN1* gyanús betegek). A *MEN1* szindrómás betegek között a fenokópia aránya 77,1% volt (37 mutáció-negatív és 11 mutáció-pozitív eset, összesen 48 sporadikus *MEN1* szindrómás eset), ez a korábban publikált becsléseknél magasabb. Kevés a rendelkezésre álló ismeret a *MEN1* fenokópia arányáról, különösen a familiáris és sporadikus esetek elkülönítésének tekintetében. Sporadikus esetekben a *MEN1* mutációk előfordulása sokkal alacsonyabb, 33-65% körüli [169]. A fő *MEN1*-asszociált endokrin tumorok sporadikus együttes előfordulása egy egyénen belül (koincidencia) ugyanakkor sokkal gyakoribb, mint korábban feltételeztük [54].

A *MEN1* genetikai vizsgálatának leggyakoribb indikációja a PHPT és a PA kombinációja. Mindkét daganat a gyakori endokrin betegségek közé tartozik az átlag populációban, így ezek koegzisztenciája nem elhanyagolható gyakoriságú. Legjobb tudomásunk szerint a két sporadikus daganat együttes előfordulásának pontos frekvenciája nem ismert. Korábbi közlemények alapján a koincidencia durván 0,8-

5,3/10.000 főre becsülhető. Megjegyezzük, hogy az Orphanet kritériumok alapján ez még ritkának számít (<http://www.orpha.net>).

Tekintettel a *MEN1* mutációk alacsony frekvenciájára és a fenokópia magas arányára ebben a populációban, vizsgálatunk egyik célja az volt, hogy mutáció-pozitív és -negatív betegek közti különbségek vizsgálatával azonosítsuk azokat a tényezőket, amelyek prediszponálnak a pozitív genetikai vizsgálatra. Az eredmények segíthetnek azonosítani azokat a betegeket, akik nagy valószínűséggel *MEN1* mutációt hordoznak.

A mutáció-pozitív probandoknál szignifikánsan fiatalabb életkorban alakult ki a MEN1 szindróma gyanúja és a *MEN1* genetikai vizsgálatának indikációja, mint a mutáció-negatívknál, így megerősítettük a korábban közölt összefüggést, hogy az életkor egy prediszponáló faktor *MEN1* mutáció hordozásra [7]. Bármely két major manifesztáció 30 éves életkor alatti betegben erősen prediktív volt *MEN1* mutációra. Mind a *MEN1*-pozitív, mind a -negatív betegek jelentős részében találtunk 30 éves életkor alatt kialakuló PHPT-t, valamint a PHPT és PA koegzisztenciáját. Ez tükrözi a két sporadikus daganat magas prevalenciáját és a koincidencia gyakoriságát, amely fenokópiát eredményezhet [11]; és felveti a kérdést, hogy vajon a 30 év alatt jelentkező PHPT megfelelő indikációja-e a *MEN1* genetikai vizsgálatnak.

A GEP-NET jelentette a legerősebb prediszponáló faktort *MEN1* mutáció pozitívításra, már a klinikai kép kezdetekor is. A MEN1-asszociált GEP-NET-ek ráadásul 15 évvel korábban alakultak ki, mint sporadikus esetben. A MEN1 probandok harmadában a GEP-NET volt az első klinikai megnyilvánulása a MEN1 szindrómának. Összességében a MEN1 manifesztációi közül a 30 év alatt kialakult GEP-NET volt a legerősebb előrejelzője a csírasejtes *MEN1* mutáció hordozásának. Ezzel összhangban Jensen és munkatársai azt találták, hogy a MEN1-hez társuló pancreatoduodenális endokrin tumorokat (PDET) általában egy évtizeddel korábban diagnosztizálják, mint azok sporadikus megfelelőit [28]. A PDET-k gyakran vezettek a MEN1 diagnózisához korábbi közleményekben [170]. Az ENETS (European Neuroendocrine Tumor Society) konszenzus irányelvekben már javaslatot tettek *MEN1* genetikai vizsgálatra 20 éves életkor alatti insulinomában szenvedő betegeknél [171]. De Laat és munkatársai szerint a mutációanalízis indikációját szükséges lenne kiterjeszteni az összes pancreas NET-ben szenvedő 20 évnél fiatalabb betegekre is [54]. Vizsgálatunkban, bár korlátozott

esetszámmal, elsőként támasztottuk alá a fenti iránymutatásokat: a 30 év alatt jelentkező GEP-NET esetek felvételének szükségességét a *MEN1* genetikai vizsgálat indikációs kritériumai közé. Eredményünk nagyobb esetszámú vizsgálattal való megerősítésre vár.

1997 és 2015 között 576 különböző csírasejtes *MEN1* mutációt rögzítettek [48,49]. Concolino és munkatársai [48] 66,5% frame-shift, nonsense vagy splice régiót érintő mutációt közölt, míg két másik vizsgálatban a mi eredményeinkkel szinte egyező arányokról számoltak be (73% és 74%) [49,172]. Több munkacsoport keresett genotípus-fenotípus összefüggéseket *MEN1* szindrómában. A *MEN1* mutációk hatásait széles körben vizsgálták. Egy feltételezés szerint az ún. csonkító (truncating) mutációk (frame-shift, nonsense) a menin fehérje funkcionális doménjeinek elvesztéséhez vezethetnek; míg a nem csonkító mutációk (missense) funkcionálisan kritikus szekvenciák inaktiválódását okozhatják [49]. Néhány közleményben beszámoltak a frame-shift mutációk és a pNET tumorok közti összefüggésről [6,173]. Machens és munkatársai azonban nem találtak korrelációt a mutációk típusa és a klinikai kép között [174]. Az American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) ajánlása nyomán [175] és vizsgálatunk eredményei alapján a *MEN1* genetikai variánsokat besorolhatjuk "high-impact" és "low-impact" kategóriákba, utalva a két csoport közti (az esetszám miatt korlátozott értékű) prognosztikus különbségre. Vizsgálatunkban 12 frame-shift *MEN1* mutációt hordozó betegből 11-nél diagnosztizáltak GEP-NET-et. High-impact mutációt hordozó betegeknél nagyobb valószínűséggel alakul ki GEP-NET, mint low-impact mutációt hordozóknál. Ez a genotípus-fenotípus összefüggés fontos lehet a genetikai tanácsadás során és a *MEN1* szindróma prognózisában.

Vizsgálatunk legfőbb korlátja a kis esetszám. Bizonyos esetekben hiányos volt a rendelkezésre álló klinikai információ; a változó utánkövetési idő pedig nem tette lehetővé, hogy megfelelően alátámasztott következtetéseket vonjunk le a betegség hosszú távú lefolyására vonatkozóan. A tünetek hiánya és az érzékeny képalkotó eljárásokhoz való korlátozott hozzáférés miatt feltehetően alábecsültük a nem-funkcionáló GEP-NET-ek arányát a betegpopulációnkban. Nem volt lehetőségünk minden betegnél elvégezni a nagy deléciók vizsgálatára szolgáló MLPA analízist és a *CDKN1B* mutációk vizsgálatát, így elképzelhető, hogy néhány ilyen eset rejtve maradt.

5.2. *MEN1* mutációk és *MEN1*-et célzó miRNS-ek jelentősége a PHPT patogenezisében

A menin különböző multiprotein komplexek részeként befolyásolja a DNS hibajavítást; egyes esetekben serkentő, másokban gátló hatással van a géntranszkripcióra; a chromatin struktúráját befolyásoló enzimkomplekre való hatása által az epigenetikai regulációban is részt vesz [176,177]. A menin-mediálta szabályozó mechanizmusok hiánya hozzájárul a daganatképződéshez endokrin és nem endokrin szövetekben, alátámasztva a menin tumorsuppresszor szerepét [178]. Bár a menin széles körben expresszált a szervezetben, szelektivitásának oka az endokrin szövetekben zajló tumorigenezisben nem világos [176]. Korábbi tanulmányok már igazoltak miRNS expressziós eltéréseket szindrómás és sporadikus daganatok között [179,180]. Nem hasonlították még össze azonban a *MEN1*-asszociált és sporadikus PHPT-k miRNS expressziós profilját.

Vizsgálatunkban először csírasejtes *MEN1* mutációt kerestünk azokban a betegekben, akikben a klinikum felvetette a *MEN1* szindróma valószínűségét és fennálltak a kritériumok a genetikai vizsgálatra [11]. Két új mutációt találtunk: a c.1160delA és c.168delC mutációk kereteltolódáshoz és korai stop kodonhoz vezetnek, következményesen sérült menin fehérje expresszióval. Bár pancreas neuroendokrin tumorokban már vizsgálták a menin expressziót [181], vizsgálatunk az első az irodalomban, amelyben összehasonlították a menin kifejeződést a *MEN1*-asszociált és sporadikus PHPT szövetekben. A vártaknak megfelelően, a *MEN1* szindrómához asszociált PHPT szövetekben immunohisztokémiai vizsgálattal nem detektáltunk nukleáris menin fehérjét. Meglepő módon csírasejtes missense mutációk esetén is hiányzott a menin festődés. Feltételezzük, hogy ezek a mutációk olyan fehérjék eredményeztek, amelyek degradálódtak vagy nem transzportálódtak megfelelően a sejtmagba a nukleáris lokalizációs szignál hibája miatt. Elképzelhető, hogy a missense mutációk a menin fehérje szerkezetét változtatták meg, különösképpen azt az epitópot, amelyhez a festés során használt poliklonális antitest kapcsolódik.

Csírasejtes mutációkon kívül szomatikus mutációk is okozhatják a menin kifejeződés hiányát. PHPT-kben, pancreas neuroendokrin tumorokban, sőt, tüdő carcinoidokban is gyakran találunk szomatikus mutációt a *MEN1* génben [67,68,181]. Ezért következő lépésben a szomatikus *MEN1* mutációanalízist végeztünk minden menin-negatív,

sporadikus, nem-szindrómás PHPT szövetben. 11-ből 7 esetben (63,6%) igazoltunk szomatikus mutációt, amely a menin hiányért felel. A 4 *MEN1*-mutáció nélküli menin-negatív esetet okozhatták a *MEN1* gén nem-kódoló, szabályozó régiójában levő mutációk, amelyeket a primereink általi szekvenálás nem fedett le; illetve más, instabil menin fehérjét eredményező tényezők is.

A 23 menin-negatív (12 *MEN1*-asszociált és 11 sporadikus) PHPT esetből 19-ben (12 *MEN1*-asszociált és 7 sporadikus) találtunk csírasejtes vagy sporadikus *MEN1* mutációt (82,6%). A nukleáris menin-negativitás jelentős része tehát *MEN1* mutáció következménye. A sporadikus csoportban 3 menin-pozitív betegnél találtunk *MEN1* mutációt. Az ezekben az esetekben talált gyenge nukleáris menin festődést okozhatták a vad típusú *MEN1* szekvenciák, amelyet a tumor heterogenitása eredményezhetett. A menin immunoreaktivitástól függetlenül a 40-ből 10 sporadikus PHPT esetben (25%) találtunk szomatikus *MEN1* mutációt, amely az irodalomban talált korábbi közlések eredményeihez hasonló [67,69]. A fentiek alapján a menin immunohisztokémiai vizsgálatának szenzitivitása 86,4%, specificitása 86,7% a *MEN1* mutáció jelenlétére.

Munkánkban elsőként hasonlítottuk össze *MEN1*-asszociált és sporadikus szövetek *MEN1*-et targetáló miRNS-einek expresszióját. *In silico* analízissel 35, a *MEN1* 3' UTR régióját célzó miRNS-t találtunk, ezekből azt a 6 miRNS-t választottuk további validációra, amelyeket legalább 2 predikációs szoftver megerősített. A miR-24 és miR-28 expressziója szignifikánsan magasabb volt sporadikus PHPT szövetekben a *MEN1*-asszociáltakhoz képest, függetlenül a sporadikus szövetek menin immunoreaktivitásától. Ugyanakkor nem találtunk szignifikáns különbséget a miRNS expresszióban sem a menin-negatív vs. -pozitív szövetek, sem a menin-negatív *MEN1* mutáns vs. *MEN1* vad típust hordozó PHPT-k között; tehát eredményeink nem igazoltak összefüggést a menin expresszió és a vizsgált miRNS-ek között.

Az általunk vizsgált miRNS-ek közül a miR-24 esetén igazoltak interakciót a menin expressziójával a mellékpajzsmirigyben és az endokrin pancreasban [45,182]. Ugyanakkor a menin stimulálja a miR-24 kifejeződését, ezáltal bezárva a visszacsatolási rendszert [45,182,183]. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a *MEN1* szindrómás betegekben az egy funkcionáló *MEN1* allél miatt alacsonyabb menin expresszió csökkenti a menin transzkripció targetjeinek, így a miR-24-nek is az expresszióját.

A miR-24 direkt hatással szupprimálja a *CDKN1B* expresszióját különböző daganatsejtekben [184]. A *CDKN1B* inaktíváló csírsejtes mutációi okozzák a MEN1 szindrómához hasonló MEN4 daganatszindrómát [185,186]. A miR-24 upregulációja MEN1 célszervekben különböző tumor szuppresszor gének csendesítéséhez vezethet, ezáltal jelentősége lehet a tumorigenezisben. Ennek bizonyításához további, nagyobb esetszámú vizsgálatok szükségesek. Nem állíthatjuk biztonsággal, hogy a potenciálisan *MEN1*-et targetáló miR-24 és miR-28 magasabb szintje a *menin* csendesítésén keresztül fejtik ki hatásukat, emelkedett expressziójuk azonban valószínűleg fontos génexpressziós változásokat okoz a sporadikus PHPT-k patogenezisében.

5.3. Prognosztikus jelentőségű miRNS-ek pancreas NET-ekben

Bár a miRNS biomarkerek intenzív kutatás tárgyai különböző daganatokban, csak kevés vizsgálat irányult a pNET-ek miRNS expressziójának vizsgálatára [130,131,134], és egyedül a miR-196a-t igazolták prognosztikus jelentőségűnek [134]. Ezért célunk az volt, hogy újraelemezzük Roldo és munkatársai korábban közölt és elérhető eredményeit [130] és validáljuk eredményeinket az eddig legnagyobb esetszámú, pNET miRNS expressziós vizsgálatban, különös tekintettel potenciálisan prognosztikus faktorok felderítésére.

In silico reanalízisünkkel 19, a pNET tumor grádusoknak megfelelően eltérően expresszálódó miRNS-t találtunk. Ezek közül a miR-20a és miR21 megváltozott kifejeződését pNET-ben korábban már igazolták [131]. Hierarchikus klaszteranalízissel a 19 miRNS expressziós profilja alapján két klaszter jött létre: egy kevésbé proliferatív C1 és egy erősen proliferatív C2. Egy nagyobb független validációs kohorszon qRT-PCR validációval három miRNS-ről (miR-21, miR-10a, miR-106b) sikerült igazolni a szignifikánsan magasabb expressziót az erősen proliferatív csoportban, ezzel igazolva az *in silico* analízisünk biológiai relevanciáját.

A validációs kohorszban a miR-21 esetén találtuk a legnagyobb különbséget a grade-ek között, magasabb expressziót mutatott a grade 3 daganatokban. Ezen eredményünk megerősíti a két korábbi, nagy esetszámú vizsgálatban közölt összefüggést a miR-21 expresszió és pNET kialakulása és agresszívabb lefolyása között [130,131]; tehát a miR-21 esetén találták ezidáig a legerősebb kapcsolatot a pNET tumorigenezissel. Egy 320

eset tumor és plazma miRNS profilját vizsgáló közleményben a fentiekhez hasonlóan magasabb miR-21 expressziót írtak le metasztatikus vékonybél neuroendokrin dagnatos betegekben egészséges kontrollokhoz képest. Emellett a miR-21 magas szintje összefüggött a rövidebb teljes túléléssel [187]. A korábbi közlemények eredményeit megerősítve [130,187] azt találtuk, hogy a magasabb miR-21 szint a primer tumorban korrelált a metasztatikus betegséggel.

A miR-21 mint onco-miR jelentőségét már több daganattípusban leírták, emellett a targetjeit is azonosították [188]. Roldo és munkatársai leírták a miR-21 negatív korrelációját a *PDCD4* génnel (programmed cell death 4) [130]. A miR-21 célpontjaként igazolták a tumorszuppresszor *PDCD4* fehérjét emlőrák sejtekben [189], illetve más fontos proapoptotikus faktorokat (FasL és PTEN) [190]. Ennek az útvonalnak a gátlása hozzájárulhat a sejtek túléléséhez és proliferációjához. A miR-21 downregulálta a tumorszuppresszor *PTEN* gént, ezáltal sejtproliferációhoz vezetett cervix [191] és colorectalis [192] daganatsejtekben. Emellett a *VHL* gént célozva a miR-21 elősegítette a metasztatizálást cervix carcinomában [193]. Pancreas carcinomában gemcitabin együttadása anti-miR-21 oligonukleotiddal szinergista daganatellenes hatású volt, ezzel utat mutatott a miR-21-céltelt kezelések lehetőségének [194].

A miR-106b emelkedett szintjének proto-onkogén következményeit figyelték meg gyomorrákban [195] és melanoma malignumban [196]. Ugyanakkor a miR-106b a fontos ciklin-dependens kináz-inhibitor p21 fehérjét célozza [195,196], míg csökkent expressziója a G1 fázis leállítását okozza [196]. A miR-10a magasabb szintjét találták nem-kissejtes tüdőrákban (NSCLC); szintén direkt célozva a tumorszuppresszor *PTEN* gént hozzájárul az agresszívebb fenotípus kialakulásához [197].

5.4. Keringő miRNS-ek diagnosztikus értéke hormonálisan inaktív pancreas NET-ekben

A neuroendokrin rendszer daganatai ritkák, de jelentős diagnosztikus és terápiás kihívást jelentenek. Különösen abban az esetben, ha hormonálisan inaktívak, a diagnózis specifikus keringő biomarker hiányában általában késik. A késői diagnózis pedig befolyásolja a prognózist és a túlélést [72]. Szükség van tehát keringő biomarkerekre.

Tudomásunk szerint nem született még közlemény a keringő miRNS-ek diagnosztikus pontosságának megítélésére neuroendokrin tumorokban a CgA-val összefüggésben.

Adataink alapján a pNET/PPGL betegek szérumban alacsony a miRNS expresszió egészséges kontrollokhoz képest. Ezt a jelenséget figyeltük meg munkacsoportunk másik munkájában, hypophysis adenomás betegek vérmintáiban is [167]. Hasonló globális miRNS alulexpressziót figyeltek meg tumorszövetekben a normál szövetekhez képest, amely felveti tumorszuppresszor tulajdonságukat [198]. Mitchell és munkatársai [113] közleménye alapján egy daganat jelenléte nem okoz globális keringő miRNS-felülexpressziót. Ugyanakkor egyes egyedi, tumorból származó miRNS-ek felülexpresszáltak lehetnek a keringésben. Az újgenerációs szekvenálás (NGS) fejlődésével a teljes miRNS expresszió könnyebben és pontosabban meghatározható, mint a korábbi platformokkal (pl. microarray). Az endokrin daganatok esetén megfigyelt alacsony globális keringő miRNS expresszió oka és jelentősége ugyanakkor tisztázásra vár.

A keringő miRNS-ek eredete továbbra sem egyértelmű [110]. A magas abundanciájú keringő miRNS-ek elsősorban a vér sejtjes elemeiből és endothelialis sejtekből származnak, míg a tumorból származó miRNS-ek alacsony-közepes expressziójúak, ami miatt különösen fontos ezeknek a pontos detektálása [110,113,163]. A felülexpresszált miRNS-ek származhatnak közvetlenül a tumorszövetekből [113]. Eredményeinket összevetve más közleményekben vizsgált szöveti miRNS-ekkel, 3 olyan miRNS-t találunk, amely szérumban és szövetben is hasonlóan deregulált volt. A miR-203-3p pNET szövetben és pNET-ben szenvedő betegek vérében is felülexpresszált volt. Ehhez hasonlóan korábbi tanulmányokban felülexpresszáltak találták a miR-203-3p-t emlődaganatos betegek tumorszövetében és a tumorsejtekből szecernált exoszómákban is [199,200]. Colorectalis és emlődaganatban onkogén hatását figyelték meg, ezen túl a MYC-en keresztül befolyásolta a taxánok iránti érzékenységet [199,201,202]. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a miR-203-3p feltehetően tumorsejtekből ered és oncomiR-ként funkcionál. Alacsony expressziója neuroendokrin daganatos betegekben azonban limitálja a tumormarkerként való széleskörű klinikai alkalmazását. Az alulexpresszált miRNS-ek közül a miR-16-5p és a miR-451a mind PPGL szövetben, mind PPGL betegek szérumban downreguláltak voltak, ami potenciális tumorszuppresszor szerepüket támasztja alá, ahogy azt már egyéb daganatoknál megállapították [203,204].

A 33 eltérően expresszálódó keringő miRNS profilja alapján elkülönítettük a pNET/PPGL betegeket a kontrolloktól (PPI szedés utáni mintákkal együtt). Nem tudtunk azonban különbséget tenni a miRNS profil alapján a pNET és PPGL minták között. Ennek egyik oka lehet ezeknek a daganatoknak a közös enterochromaffin eredete [205].

NGS eredményeink alapján több miRNS mutatott – többnyire inverz – korrelációt a szérumban CgA szinttel. Nagyobb mintaszámon történt validáció alapján azonban a korreláció egyedül kontroll minták esetén maradt szignifikáns, pNET vagy PPGL esetén nem (kivéve a miR-486-5p PPGL minták esetén). Ennek egyik oka lehet a CgA-val korrelációt mutató miRNS-ek nagy részének elvesztése a tumorigenezis során (a globális miRNS expresszió ugyanis csökkent a kontrollokhoz képest), vagy okozhatta más technikai tényező. Újgenerációs szekvenálással alacsony vagy nagyon alacsony mennyiségben jelen levő miRNS-t is ki tudunk mutatni, azonban a valós idejű PCR reakció detektálási küszöbe – vizsgálataink tapasztalata alapján <50 UMI read szám – ezek validálását nem teszi lehetővé.

A protonpumpa gátló kezelés által okozott szérumban CgA szint emelkedés csökkenti a szérumban CgA klinikai hasznát neuroendokrin daganatos betegeknél. ROC analízissel megállapítottuk, hogy pNET szérumban a CgA önmagában kevésbé volt effektív a pNET betegek és kontrollok elkülönítésében. MiRNS-ek és a CgA kombinációja növelte a CgA diagnosztikus értékét. Különösen fontos esetben: alacsony CgA szintű pNET betegeknél – amely esetekben a CgA nem nyújt segítséget a daganat diagnózisában – olyan miRNS kombinációt találtunk, amely a CgA-val együtt magas diagnosztikus értéket ért el (AUC: 0,904).

Pancreas neuroendokrin daganatos betegeknél a Ki-67 proliferációs index által meghatározott grade jelentősen befolyásolja a prognózist [206]. Bár az alacsony mintaszám limitálja a vizsgálatunkból levont következtetéseket, a miR-451a, let-7i-5p és a miR-30d-5p inverz korrelációs tendenciát mutatott pNET betegek grade-jével. Több daganattípusban leírták a keringő miR-451a alulexpresszióját valamint immunreguláló tulajdonságát [203,207], amely megmagyarázhatja a tumor grade szerinti diszregulációját pNET-ben. A let-7i-5p egy ismert tumorszuppresszor miRNS, melynek expressziója negatívan korrelál a prognózissal [208]. Több tanulmányban alulexpresszálnak találtak daganatos betegek szérumban egészségesekhez képest [208], azonban a csökkenő

expresszió magyarázata és a high-grade pNET betegekben betöltött jelentősége nem tisztázott. Downreguláltak találták a miR-30d-5p-t daganatsejtekben (hepatocellularis carcinomában) és szecernált exosomákban is, magasabb szintjét hepatocellularis carcinomában pedig jobb túléléssel hozták összefüggésbe [209]. Mindezek arra utalnak, hogy a szövetben és folyadékbiopsziás mintákban mért miR-30d-5p szintje összefügghet a tumor grade-del, a progresszióval és a túléléssel.

Mindeddig egyetlen tanulmány vizsgálta pNET betegekben a keringő miRNS-eket egészséges kontrollokhoz képest [131]. A szerzők nagyon hasonló miRNS expressziós profilt találtak a két csoport között. Egyedül a miR-193b szintje volt magasabb pNET betegek szérumában és abundánsabb volt pNET szövetben is normál szigetsejtekhez képest. Ugyanakkor 6 beteg szövet- és szérummintáját vizsgálva sokkal gyengébb korrelációt figyeltek meg a szövetben és szérumban mért expresszió között, mint az ugyanazon szövetben mért átlag korrelációs koefficiens [131]. Egy másik közleményben 5 eltérően expresszáldó miRNS-t találtak pancreas ductalis adenocarcinomás és pNET betegek széruma között, de nem hasonlították össze a pNET betegeket egészséges kontroll esetekkel [210]. Ezek a miRNS-ek nem mutattak átfedést a mi eredményeinkkel pNET vs. kontroll betegek vonatkozásában. Egy közelmúltbeli publikációban 6 upregulált és 11 downregulált miRNS-t találtak pNET betegek plazmájából kivont exoszómákban krónikus pancreatitisben szenvedő betegekéhez képest [211]. Egyik miRNS sem egyezett meg az általunk vizsgáltakkal, bár a szerzők más kiindulási anyagot, más mérési módszereket használtak és adataikat krónikus pancreatitisben szenvedő betegekéhez hasonlították.

A miR-486-5p és a miR-30d-5p alacsony szintjét találtuk genetikailag meghatározott PPGL esetekben (ahol az *SDHB*, *RET*, *VHL* vagy *NF1* génekben található a mutáció) a sporadikus esetekhez képest. A let-7b-5p, let-7i-5p, miR-30d-5p és miR-486-5p downregulálva volt *SDHB* mutáns esetekben a vad *SDHB* allélt hordozókhoz képest, ami arra utal, hogy a PPGL etiológiája befolyásolhatja a keringő miRNS spektrumot. További, nagyobb esetszámú vizsgálatok lennének szükségesek ennek alátámasztására, ugyanis nem találtunk adatot szöveti és szérum miRNS-ek összehasonlítására sporadikus és genetikailag meghatározott PPGL esetekben. Négy tanulmány vizsgálta a keringő miRNS-eket PPGL-ben [140,141,212,213]. Nem találtak szignifikáns különbséget a benignus és malignus esetek között, viszont emelkedettnek találták a miR-96-5p, miR-

182-5p és miR-21-3p szintjét PPGL betegekben egészséges kontrollokhoz képest [140,141,212]. Ezeket az eredményeket nem tudtuk megerősíteni vizsgálatunkban, feltehetően a kísérleti módszerek különbözősége miatt.

6. Következtetések

6.1. Tapasztalataink a haza MEN1 adatbázis elemzése kapcsán

Elvégeztük a hazai MEN1 kohorsz átfogó genetikai és klinikai elemzését. Hazai és Európai Referencia Központként létrehoztuk a magyarországi MEN1 adatbázist, amely az Európai Ritka Endokrin Betegségek Referenciahálózatának (European Reference Network on Rare Endocrine Conditions, Endo-ERN) munkájában a későbbiekben jelentőséggel bírhat. Egy multicentrikus, nemzetközi együttműködés keretein belül lehetőség van eredményeink nagy esetszámú kohorszban való validálására, potenciálisan a *MEN1* genetikai vizsgálat indikációs kritériumainak módosítására.

Nagy arányban találtunk MEN1-gyanús, de mutációt nem hordozó betegeket (fenokópia). *MEN1*-pozitív és -negatív esetek összehasonlításával olyan klinikai jellemzőket kerestünk, amelyek legjobban előrejelzik a *MEN1* mutáció hordozását. A GEP-NET szignifikánsan korábban és gyakrabban alakult ki mutáció-pozitív betegekben, 30 év alatti GEP-NET pedig a legjobban prediktálta a pozitív genetikai tesztet. Megerősítettünk egy nemrég felvetődött javaslatot a genetikai vizsgálat kiterjesztésére 30 évnél fiatalabb életkorban jelentkező GEP-NET esetekre. High-impact mutációt hordozó MEN1 betegekben nagyobb valószínűséggel alakult ki GEP-NET; ez a genotípus-fenotípus összefüggés potenciálisan lényeges prognosztikai tényező lehet a genetikai tanácsadás során. Végül megjegyezzük, hogy a nagy számú mutáció-negatív eset ellenére a genetikai vizsgálat elkerülhetetlen a dominánsan öröklődő, magas penetranciájú MEN1 szindróma gyanús esetekben [7,10,214].

6.2. Menin és miRNS expresszió sporadikus és MEN1-asszociált PHPT-ben

Jól ismert tény, hogy csírasejtes és szomatikus *MEN1* mutációk dominálnak a PHPT patogenezisében. Megvizsgáltuk a *MEN1* mutációk és a potenciálisan *MEN1*-et targetáló miRNS-ek szerepét a hiányzó menin expresszióban sporadikus és MEN1-asszociált PHPT szövetekben. Demonstráltuk, hogy legnagyobbbrészt csírasejtes és szomatikus *MEN1* mutációk okozzák a menin hiányát PHPT szövetekben. Epigenetikai mechanizmusok is hozzájárulhatnak a PHPT patogeneziséhez, ezért *in silico* target predikció segítségével kiválasztottunk 5, a *MEN1* 3'UTR régióját potenciálisan targetáló miRNS-t, ezek körül a sporadikus, nem-szindrómás PHPT szövetekben magasabb miR-24 és miR-28 expressziót találtunk a MEN1-asszociált szövetekhez képest; amelynek, mint első epigenetikai eltérésnek sporadikus és szindrómás PHPT szövetek között, jelentősége lehet a PHPT patogenezisében.

6.3. Prognosztikus szöveti miRNS biomarkerek pNET-ben

Napjainkig nem sikerült megfelelően szenzitív, specifikus és elérhető biomarkert találni pancreas neuroendokrin tumorok diagnosztikájában és kezelésében. Prognózisuk jelentősen különbözik a daganat proliferációjának mértékétől függően, azaz a hisztopatológiai grade-ek szerint. Az egyik legnagyobb pNET betegcsoportot magában foglaló miRNS expressziós vizsgálatunkban különböző grádusú pNET szövetek összehasonlításával prognosztikus biomarkereket kerestünk. Legfontosabb eredményünk a miR-21, miR-106b és miR-10a kifejeződésének prognosztikus jelentősége pNET-ben. Ezek közül a miR-21 többváltozós analízis során független prognosztikus faktornak bizonyult a legnagyobb esetszámú pNET miRNS expressziós vizsgálatban. Érdekes módon progressziót elszenvedő betegekben a magasabb miR-10a és miR-106b szint korábban kialakuló progressziót valószínűsített, a miR-21 szintje azonban nem mutatott ilyen összefüggést; ugyanakkor a két miRNS egyike sem bizonyult független prognosztikus faktornak ebben a tekintetben. Ezeknek a miRNS-eknek a vizsgálata keringésben (liquid biopsy) hozzájárulhat a pNET-ek pontosabb preoperatív karakterizálásához, új eszközként szolgálhatnak a precíziós onkológiában.

6.4. Keringő miRNS biomarkerek pNET-ben

Az alacsony szenzitivitás és specificitás ellenére a szérumban CgA a leggyakrabban használt biomarker neuroendokrin tumorokban. A széles körben használt protonpumpa inhibitorok befolyásolják a diagnosztikus pontosságát. Elsőként vizsgáltuk a keringő miRNS-ek diagnosztikus jelentőségét a CgA-val összefüggésben pNET betegekben. A miRNS profil alapján el tudtuk különíteni a pNET/PPGL mintákat a kontrolloktól, valamint a miRNS-ek globális downregulációját figyeltük meg neuroendokrin tumoros betegekben egészséges kontrollokhoz képest.

A CgA-hoz hasonlóan a miRNS mintázat sem volt alkalmas biomarker a PPGL/pNET betegeknek a PPI szedőktől való elkülönítésben. A CgA és a let-7b-5p, let-7i-5p, miR-143-3p és miR-30d-5p miRNS-ekből álló kombináció magasabb AUC-t eredményezett regressziós modellünkben, mint az önálló markerek esetében a pNET betegek és kontrollok közötti elkülönítésben. A CgA és a let-7b-5p, let-7i-5p, miR-143-3p, miR-30d-5p és miR-486-5p miRNS-ek pedig elkülönítette az alacsony CgA szintű pNET betegeket a PPI szedőket is magában foglaló kontroll csoporttól. Eredményeink tehát megerősítették a korábbi megfigyeléseket más tumorokban: több faktor kombinációja magasabb diszkriminációs képességet eredményez [215,216]. A CgA és miRNS-ek kombinációja tehát biztató diagnosztikus eszköz lehet még a kihívást jelentő esetekben is, mint pl. az alacsony CgA szintű vagy PPI-t szedő pNET betegek.

7. Összefoglalás

PhD munkám során összegyűjtöttem a Magyarországon MEN1 szindróma gyanú miatt vizsgált betegek klinikai és genetikai adatait. Magyarországon a *MEN1* gén szekvenálása 2001 óta elérhető, 2001-2017 között Referencia Laboratóriumunkba küldött összes mintát feldolgoztam, ezáltal létrehoztam a hazai MEN1 adatbázist. Megfigyeléseinkből kiemelendő a 30 éves életkor alatt kialakuló GEP-NET gyakorisága MEN1 szindrómában, magas prediktív értéke *MEN1* mutációra, de a fenokópia magas aránya is igazolható volt beteganyagunkban.

MEN1-asszociált és sporadikus PHPT szövetek összehasonlításával megerősítettük a csírasejtes és szomatikus *MEN1* mutációk kóroki szerepét PHPT kialakulásában. A menin expresszió hiányának okaként epigenetikai mechanizmusok jelentőségét is feltételezve a *MEN1*-et potenciálisan célzó miR-24 és miR-28 magasabb expresszióját találtuk sporadikus PHPT szövetekben a MEN1-asszociáltakhoz képest.

A pancreas NET MEN1 szindrómában is vezető halálok, megbízható biomarkere nincs. Újraelemeztük az eddigi legnagyobb esetszámú, sporadikus pNET-ek szöveti miRNS expresszióját vizsgáló közlemény eredményeit [126], olyan potenciálisan prognosztikus biomarkerek után kutatva, amelyek eltérően expresszálódnak a pNET grádusok között. Az eredményeket saját mintáinkon validálva a jól ismert miR-21 onco-miR független prognosztikus faktornak bizonyult pNET-ben.

A folyadék biopszia térnyerésével széleskörű kutatások zajlanak a keringő biomarkerek felderítésére különböző kórállapotokban. A neuroendokrin tumorok esetében továbbra is az alacsony szenzitivitású és specificitású CgA az általánosan használt tumormarker. Elsőként vizsgáltam a miRNS expressziót pNET és PPGL betegeknél a CgA-val összefüggésben. Újgenerációs szekvenálással alacsony globális miRNS expressziót figyeltünk meg neuroendokrin tumoros betegeknél egészséges kontrollokhoz képest. 6 miRNS expressziójának validációjával olyan, miRNS-ekből és CgA-ból álló kombinációkat határoztam meg, amelyek a pNET mintákat jobban elkülönítették a PPI szedőket is magában foglaló kontrolloktól, mint a CgA vagy a miRNS-ek önmagukban. Különös jelentőséggel bír a diagnosztikus nehézséget jelentő, alacsony CgA szintű pNET betegeket elkülönítő kombináció.

8. Summary

During my PhD work I gathered and summarized all the clinical and genetic data of patients suspicious for MEN1 syndrome evaluated at our National Reference Center. *MEN1* genetic testing is available in Hungary since 2001. I collected all patient data sent to our Reference Laboratory between 2001-2017, thus creating the Hungarian MEN1 database. Our observations highlight the high frequency of MEN1 associated GEP-NETs developed under 30 years of age and its high predictive value for a positive *MEN1* genetic test; furthermore we found a high proportion of *MEN1*-negative patients with clinical MEN1 syndrome, i.e. phenocopy.

Subsequently, we confirmed the role of germline and somatic *MEN1* mutations in the pathogenesis of PHPT by comparing MEN1 associated and sporadic PHPT tissues. Considering epigenetic mechanisms as an underlying cause of menin deficiency we found a higher expression of potentially MEN1 targeting miR-24 and miR-28 in sporadic PHPT tissues compared to MEN1 associated ones.

Pancreas NET is a leading cause of mortality in MEN1 syndrome as well as in sporadic cases. There is no reliable biomarker to help diagnostic and therapeutic processes to date. We reanalyzed the previously published pNET tissue miRNA profiling dataset of Roldo et al. [126] searching for potential prognostic biomarkers with altered expression between different tumor grades. We successfully validated in our large cohort of pNET samples miR-21 as an independent prognostic marker in pNET.

Numerous circulating biomarker candidates are under investigation in different pathological conditions recently. CgA is still the most widely used tumor marker for neuroendocrine tumors, despite of its low sensitivity and specificity. Our pioneer work investigated miRNS expression in pNET and PPGL samples in relation to CgA. We observed a global downregulation of circulating miRNA compared to healthy individuals. 6 miRNAs were selected based on our NGS findings. Combinations of miRNAs with serum CgA were more effective in distinguishing pNET samples from controls containing PPI treated patients, than CgA or individual miRNAs. The combination distinguishing the diagnostically most challenging group of pNET patients with low CgA levels is of particular interest.

9. Irodalomjegyzék

1. Di Domenico A, Wiedmer T, Marinoni I, Perren A. Genetic and epigenetic drivers of neuroendocrine tumours (NET). *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(9):R315-R334.
2. Crona J, Skogseid B. GEP- NETS UPDATE: Genetics of neuroendocrine tumors. *Eur J Endocrinol*. 2016;174(6):R275-90.
3. Rickman DS, Beltran H, Demichelis F, Rubin MA. Biology and evolution of poorly differentiated neuroendocrine tumors. *Nat Med*. 2017;23(6):1-10.
4. Pastorino L, Grillo F, Albertelli M, Ghiorzo P, Bruno W. Insights into Mechanisms of Tumorigenesis in Neuroendocrine Neoplasms. *Int J Mol Sci*. 2021;22(19).
5. Chai SM, Brown IS, Kumarasinghe MP. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: selected pathology review and molecular updates. *Histopathology*. 2018;72(1):153-167.
6. Kouvaraki MA, Lee JE, Shapiro SE, Gagel RF, Sherman SI, Sellin R V., Cote GJ, Evans DB. Genotype-phenotype analysis in multiple endocrine neoplasia type 1. *Arch Surg*. 2002;137(6):641-647.
7. de Laat JM, van der Luijt RB, Pieterman CRC, Oostveen MP, Hermus AR, Dekkers OM, de Herder WW, van der Horst-Schrivers AN, Drent ML, Bisschop PH, Havekes B, Vriens MR, Valk GD. MEN1 redefined, a clinical comparison of mutation-positive and mutation-negative patients. *BMC Med*. 2016;14(1):1-9.
8. Carroll RW. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). 2013;1:297-309.
9. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C, Conte-Devolx B, Falchetti A, Gheri RG, Libroia A, Lips CJM, Lombardi G, Mannelli M, Pacini F, Ponder BAJ, Raue F, Skogseid B, Tamburrano G, Thakker R V., Thompson NW, Tomassetti P, Tonelli F, Wells J, Marx SJ. Consensus: Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(12):5658-5671.
10. Falchetti A. Genetics of multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: what's new and what's old. *F1000Research*. 2017;6(0):73.

11. Thakker R V., Newey PJ, Walls G V., Bilezikian J, Dralle H, Ebeling PR, Melmed S, Sakurai A, Tonelli F, Brandi ML. Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):2990-3011.
12. Giusti F, Tonelli F, Brandi ML. Primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 1: When to perform surgery? *Clinics.* 2012;67(SUPPLEMENT):141-144.
13. Eller-Vainicher C, Chiodini I, Battista C, Viti R, Mascia ML, Massironi S, Peracchi M, D'Agruma L, Minisola S, Corbetta S, Cole DEC, Spada A, Scillitani A. Sporadic and MEN1-related primary hyperparathyroidism: differences in clinical expression and severity. *J bone Miner Res Off J Am Soc Bone Miner Res.* 2009;24(8):1404-1410.
14. Marini F, Giusti F, Cioppi F, Maraghelli D, Cavalli T, Tonelli F, Brandi ML. Bone and Mineral Metabolism Phenotypes in MEN1-Related and Sporadic Primary Hyperparathyroidism, before and after Parathyroidectomy. *Cells.* 2021;10(8).
15. Al-Salameh A, Cadiot G, Calender A, Goudet P, Chanson P. Clinical aspects of multiple endocrine neoplasia type 1. *Nat Rev Endocrinol.* 2021;17(4):207-224.
16. Pieterman CRC, van Leeuwen RS, van den Broek MFM, van Nesselrooij BPM, Valk GD. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, Chrousos G, de Herder WW, Dhatariya K, Dungan K, Hershman JM, Hofland J, Kalra S, Kaltsas G, Koch C, Kopp P, Korbonits M, Kovacs CS, Kuohung W, Laferrère B, Levy M, McGee EA, McLachlan R, Morley JE, New M, Purnell J, Sahay R, Singer F, Sperling MA, Stratakis CA, Trencle DL, Wilson DP, eds. ; 2000.
17. Manoharan J, Albers MB, Bollmann C, Maurer E, Mintziras I, Wächter S, Bartsch DK. Single gland excision for MEN1-associated primary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2020;92(1):63-70.
18. Agarwal SK, Ozawa A, Mateo CM, Marx SJ. The MEN1 gene and pituitary tumours. *Horm Res.* 2009;71 Suppl 2(Suppl 2):131-138.

19. Delemer B. MEN1 and pituitary adenomas. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2012;73(2):59-61.
20. Rogoziński D, Gilis-Januszewska A, Skalniak A, Kluczyński Ł, Pantofliński J, Hubalewska-Dydejczyk A. Pituitary tumours in MEN1 syndrome - the new insight into the diagnosis and treatment. *Endokrynol Pol*. 2019;70(5):445-452.
21. Mele C, Mencarelli M, Caputo M, Mai S, Pagano L, Aimaretti G, Scacchi M, Falchetti A, Marzullo P. Phenotypes Associated With MEN1 Syndrome: A Focus on Genotype-Phenotype Correlations. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:591501.
22. Syro L V, Scheithauer BW, Kovacs K, Toledo RA, Londoño FJ, Ortiz LD, Rotondo F, Horvath E, Uribe H. Pituitary tumors in patients with MEN1 syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012;67 Suppl 1(Suppl 1):43-48.
23. Vergès B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, Sassolas G, Cougard P, Chambe B, Montvernay C, Calender A. Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):457-465.
24. Falchetti A. Genetic screening for multiple endocrine neoplasia syndrome type 1 (MEN-1): when and how. *F1000 Med Rep*. 2010;2.
25. Tonelli F, Giudici F, Fratini G, Brandi ML. Pancreatic endocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: review of literature. *Endocr Pract*. 2011;17 Suppl 3:33-40.
26. Giudici F, Cavalli T, Giusti F, Gronchi G, Batignani G, Tonelli F, Brandi ML. Natural History of MEN1 GEP-NET: Single-Center Experience After a Long Follow-Up. *World J Surg*. 2017;41(9):2312-2323.
27. Ito T, Igarashi H, Uehara H, Berna MJ, Jensen RT. Causes of death and prognostic factors in multiple endocrine neoplasia type 1: a prospective study: comparison of 106 MEN1/Zollinger-Ellison syndrome patients with 1613 literature MEN1 patients with or without pancreatic endocrine tumors. *Medicine (Baltimore)*. 2013;92(3):135-181.

28. Jensen RT, Berna MJ, Bingham DB, Norton JA. Inherited pancreatic endocrine tumor syndromes: Advances in molecular pathogenesis, diagnosis, management, and controversies. *Cancer*. 2008;113(7):1807-1843.
29. Romanet P, Mohamed A, Giraud S, Odou MF, North MO, Pertuit M, Pasmant E, Coppin L, Guien C, Calender A, Borson-Chazot F, Bérout C, Goudet P, Barlier A. UMD-MEN1 Database: An Overview of the 370 MEN1 Variants Present in 1676 Patients from the French Population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;104(3):753-764.
30. Yates CJ, Newey PJ, Thakker R V. Challenges and controversies in management of pancreatic neuroendocrine tumours in patients with MEN1. *lancet Diabetes Endocrinol*. 2015;3(11):895-905.
31. Lee L, Ramos-Alvarez I, Ito T, Jensen RT. Insights into Effects/Risks of Chronic Hypergastrinemia and Lifelong PPI Treatment in Man Based on Studies of Patients with Zollinger-Ellison Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
32. Marx SJ. Recent Topics Around Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(4):1296-1301.
33. Marini F, Giusti F, Tonelli F, Brandi ML. Pancreatic Neuroendocrine Neoplasms in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Int J Mol Sci*. 2021;22(8).
34. Pea A, Hruban RH, Wood LD. Genetics of pancreatic neuroendocrine tumors: implications for the clinic. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;9(11):1407-1419.
35. Chiloiro S, Lanza F, Bianchi A, Schinzari G, Brizi MG, Giampietro A, Rufini V, Inzani F, Giordano A, Rindi G, Pontecorvi A, De Marinis L. Pancreatic neuroendocrine tumors in MEN1 disease: a mono-centric longitudinal and prognostic study. *Endocrine*. 2018;60(2):362-367.
36. Lecomte P, Binquet C, Le Bras M, Tabarin A, Cardot-Bauters C, Borson-Chazot F, Lombard-Bohas C, Baudin E, Delemer B, Klein M, Vergès B, Aparicio T, Cosson E, Beckers A, Caron P, Chabre O, Chanson P, Du Boullay H, Guilhem I, Niccoli P, Rohmer V, Guigay J, Vulpoi C, Scoazec JY, Goudet P. Histologically

- Proven Bronchial Neuroendocrine Tumors in MEN1: A GTE 51-Case Cohort Study. *World J Surg.* 2018;42(1):143-152.
37. Bartsch DK, Albers MB, Lopez CL, Apitzsch JC, Walthers EM, Fink L, Fendrich V, Slater EP, Waldmann J, Anlauf M. Bronchopulmonary Neuroendocrine Neoplasms and Their Precursor Lesions in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Neuroendocrinology.* 2016;103(3-4):240-247.
 38. van Leeuwaarde RS, Dreijerink KM, Ausems MG, Beijers HJ, Dekkers OM, de Herder WW, van der Horst-Schrivers AN, Drent ML, Bisschop PH, Havekes B, Peeters PHM, Pijnappel RM, Vriens MR, Valk GD. MEN1-Dependent Breast Cancer: Indication for Early Screening? Results From the Dutch MEN1 Study Group. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017;102(6):2083-2090.
 39. Teinturier R, Abou Ziki R, Kassem L, Luo Y, Malbeteau L, Gherardi S, Corbo L, Bertolino P, Bachelot T, Treilleux I, Zhang CX, Le Romancer M. Reduced menin expression leads to decreased ER α expression and is correlated with the occurrence of human luminal B-like and ER-negative breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2021;190(3):389-401.
 40. Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR, Debelenko L V, Zhuang Z, Lubensky IA, Liotta LA, Crabtree JS, Wang Y, Roe BA, Weisemann J, Boguski MS, Agarwal SK, Kester MB, Kim YS, Heppner C, Dong Q, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ. Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science.* 1997;276(5311):404-407.
 41. Agarwal SK. The future: genetics advances in MEN1 therapeutic approaches and management strategies. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(10):T119-T134.
 42. Li JWY, Hua X, Reidy-Lagunes D, Untch BR. MENIN loss as a tissue-specific driver of tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;469:98-106.
 43. Kamilaris CDC, Stratakis CA. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1): An Update and the Significance of Early Genetic and Clinical Diagnosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10:339.
 44. Anlauf M, Perren A, Henopp T, Rudolf T, Garbrecht N, Schmitt A, Raffel A,

- Gimm O, Weihe E, Knoefel WT, Dralle H, Heitz PU, Komminoth P, Klöppel G. Allelic deletion of the MEN1 gene in duodenal gastrin and somatostatin cell neoplasms and their precursor lesions. *Gut*. 2007;56(5):637-644.
45. Luzi E, Marini F, Giusti F, Galli G, Cavalli L, Brandi ML. The negative feedback-loop between the Oncomir mir-24-1 and Menin modulates the men1 tumorigenesis by mimicking the “Knudson’s second hit.” *PLoS One*. 2012;7(6):1-10.
 46. Luzi E, Ciuffi S, Marini F, Mavilia C, Galli G, Brandi ML. Analysis of differentially expressed microRNAs in MEN1 parathyroid adenomas. *Am J Transl Res*. 2017;9(4):1743-1753.
 47. Donati S, Ciuffi S, Marini F, Palmi G, Miglietta F, Aurilia C, Brandi ML. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: The Potential Role of microRNAs in the Management of the Syndrome. *Int J Mol Sci*. 2020;21(20).
 48. Concolino P, Costella A, Capoluongo E. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): An update of 208 new germline variants reported in the last nine years. *Cancer Genet*. 2016;209(1-2):36-41.
 49. Lemos MC, Thakker R V. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat*. 2008;29(1):22-32.
 50. Marini F, Giusti F, Fossi C, Cioppi F, Cianferotti L, Masi L, Boaretto F, Zovato S, Cetani F, Colao A, Davì MV, Faggiano A, Fanciulli G, Ferolla P, Ferone D, Loli P, Mantero F, Marcocci C, Opocher G, Beck-Peccoz P, Persani L, Scillitani A, Guizzardi F, Spada A, Tomassetti P, Tonelli F, Brandi ML. Multiple endocrine neoplasia type 1: analysis of germline MEN1 mutations in the Italian multicenter MEN1 patient database. *Endocrine*. 2018;62(1):215-233.
 51. Luzi E, Brandi ML. Are MicroRNAs involved in the endocrine-specific pattern of tumorigenesis in multiple endocrine neoplasia type 1? *Endocr Pract*. 2011;17(SUPPL. 3):58-63.
 52. Gurung B, Katona BW, Hua X. Menin-mediated regulation of miRNA biogenesis uncovers the IRS2 pathway as a target for regulating pancreatic beta cells.

- Oncoscience*. 2014;1(9):562-566.
53. Goudet P, Dalac A, Le Bras M, Cardot-Bauters C, Niccoli P, Lévy-Bohbot N, du Boullay H, Bertagna X, Ruzsniowski P, Borson-Chazot F, Vergès B, Sadoul JL, Ménégau F, Tabarin A, Kühn JM, d'Anella P, Chabre O, Christin-Maitre S, Cadiot G, Binquet C, Delemer B. MEN1 disease occurring before 21 years old: a 160-patient cohort study from the Groupe d'étude des Tumeurs Endocrines. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(4):1568-1577.
 54. de Laat JM, van Leeuwaarde RS, Valk GD. The Importance of an Early and Accurate MEN1 Diagnosis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018;9(September):533.
 55. Van Leeuwaarde RS, Van Nesselrooij BPM, Hermus AR, Dekkers OM, De Herder WW, Van Der Horst-Schrivers AN, Drent ML, Bisschop PH, Havekes B, Vriens MR, De Laat JM, Pieterman CRC, Valk GD. Impact of delay in diagnosis in outcomes in MEN1: Results from the Dutch MEN1 study group. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(3):1159-1165.
 56. Manoharan J, Raue F, Lopez CL, Albers MB, Bollmann C, Fendrich V, Slater EP, Bartsch DK. Is Routine Screening of Young Asymptomatic MEN1 Patients Necessary? *World J Surg*. 2017;41(8):2026-2032.
 57. Ramundo V, Milone F, Severino R, Savastano S, Di Somma C, Vuolo L, De Luca L, Lombardi G, Colao A, Faggiano A. Clinical and prognostic implications of the genetic diagnosis of hereditary NET syndromes in asymptomatic patients. *Horm Metab Res = Horm und Stoffwechselforsch = Horm Metab*. 2011;43(11):794-800.
 58. Niederle B, Selberherr A, Bartsch DK, Brandi ML, Doherty GM, Falconi M, Goudet P, Halfdanarson TR, Ito T, Jensen RT, Larghi A, Lee L, Öberg K, Pavel M, Perren A, Sadowski SM, Tonelli F, Triponez F, Valk GD, O'Toole D, Scott-Coombes D, Thakker R V, Thompson GB, Treglia G, Wiedenmann B. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 and the Pancreas: Diagnosis and Treatment of Functioning and Non-Functioning Pancreatic and Duodenal Neuroendocrine Neoplasia within the MEN1 Syndrome - An International Consensus Statement. *Neuroendocrinology*. 2021;111(7):609-630.

59. Alrezk R, Hannah-Shmouni F, Stratakis CA. MEN4 and CDKN1B mutations: the latest of the MEN syndromes. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(10):T195-T208.
60. Frederiksen A, Rossing M, Hermann P, Ejersted C, Thakker R V, Frost M. Clinical Features of Multiple Endocrine Neoplasia Type 4: Novel Pathogenic Variant and Review of Published Cases. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(9):3637-3646.
61. Backman S, Bajic D, Crona J, Hellman P, Skogseid B, Stålberg P. Whole genome sequencing of apparently mutation-negative MEN1 patients. *Eur J Endocrinol*. 2020;182(1):35-45.
62. Yeh MW, Ituarte PHG, Zhou HC, Nishimoto S, Liu ILA, Harari A, Haigh PI, Adams AL. Incidence and prevalence of primary hyperparathyroidism in a racially mixed population. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3):1122-1129.
63. Daly AF, Beckers A. The Epidemiology of Pituitary Adenomas. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2020;49(3):347-355.
64. Klein RD, Salih S, Bessoni J, Bale AE. Clinical testing for multiple endocrine neoplasia type 1 in a DNA diagnostic laboratory. *Genet Med*. 2005;7(2):131-138.
65. Hai N, Aoki N, Shimatsu A, Mori T, Kosugi S. Clinical features of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) phenocopy without germline MEN1 gene mutations: analysis of 20 Japanese sporadic cases with MEN1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;52(4):509-518.
66. Walker MD, Silverberg SJ. Primary hyperparathyroidism. *Nat Rev Endocrinol*. 2018;14(2):115-125.
67. Newey PJ, Nesbit MA, Rimmer AJ, Attar M, Head RT, Christie PT, Gorvin CM, Stechman M, Gregory L, Mihai R, Sadler G, McVean G, Buck D, Thakker R V. Whole-exome sequencing studies of nonhereditary (sporadic) parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(10):E1995-2005.
68. Alvelos MI, Vinagre J, Fonseca E, Barbosa E, Teixeira-Gomes J, Sobrinho-Simões M, Soares P. MEN1 intragenic deletions may represent the most prevalent somatic event in sporadic primary hyperparathyroidism. *Eur J Endocrinol*. 2013;168(2):119-128.

69. Cromer MK, Starker LF, Choi M, Udelsman R, Nelson-Williams C, Lifton RP, Carling T. Identification of somatic mutations in parathyroid tumors using whole-exome sequencing. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):E1774-81.
70. Costa-Guda J, Arnold A. Genetic and epigenetic changes in sporadic endocrine tumors: parathyroid tumors. *Mol Cell Endocrinol.* 2014;386(1-2):46-54.
71. Halfdanarson TR, Rabe KG, Rubin J, Petersen GM. Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2008;19(10):1727-1733.
72. Yao JC, Hassan M, Phan A, Dagohoy C, Leary C, Mares JE, Abdalla EK, Fleming JB, Vauthey JN, Rashid A, Evans DB. One hundred years after “carcinoid”: epidemiology of and prognostic factors for neuroendocrine tumors in 35,825 cases in the United States. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2008;26(18):3063-3072.
73. Schimmack S, Svejda B, Lawrence B, Kidd M, Modlin IM. The diversity and commonalities of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Langenbeck's Arch Surg.* 2011;396(3):273-298.
74. Scott AT, Howe JR. Evaluation and Management of Neuroendocrine Tumors of the Pancreas. *Surg Clin North Am.* 2019;99(4):793-814.
75. Modlin IM, Moss SF, Gustafsson BI, Lawrence B, Schimmack S, Kidd M. The archaic distinction between functioning and nonfunctioning neuroendocrine neoplasms is no longer clinically relevant. *Langenbeck's Arch Surg.* 2011;396(8):1145-1156.
76. Ro C, Chai W, Yu VE, Yu R. Pancreatic neuroendocrine tumors: biology, diagnosis, and treatment. *Chin J Cancer.* 2013;32(6):312-324.
77. Modlin IM, Gustafsson BI, Moss SF, Pavel M, Tsolakis A V, Kidd M. Chromogranin A--biological function and clinical utility in neuro endocrine tumor disease. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(9):2427-2443.
78. Chi W, Warner RRP, Chan DL, Singh S, Segelov E, Strosberg J, Wisnivesky J, Kim MK. Long-term Outcomes of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine

- Tumors. *Pancreas*. 2018;47(3):321-325.
79. Sorbye H, Baudin E, Borbath I, Caplin M, Chen J, Cwikla JB, Frilling A, Grossman A, Kaltsas G, Scarpa A, Welin S, Garcia-Carbonero R. Unmet Needs in High-Grade Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms (WHO G3). *Neuroendocrinology*. 2019;108(1):54-62.
 80. Walter T, Tougeron D, Baudin E, Le Malicot K, Lecomte T, Malka D, Hentic O, Manfredi S, Bonnet I, Guimbaud R, Coriat R, Lepère C, Desauw C, Thiot-Bidault A, Dahan L, Roquin G, Aparicio T, Legoux JL, Lombard-Bohas C, Scoazec JY, Lepage C, Cadiot G. Poorly differentiated gastro-entero-pancreatic neuroendocrine carcinomas: Are they really heterogeneous? Insights from the FFCD-GTE national cohort. *Eur J Cancer*. 2017;79:158-165.
 81. Coriat R, Walter T, Terris B, Couvelard A, Ruzzniewski P. Gastroenteropancreatic Well-Differentiated Grade 3 Neuroendocrine Tumors: Review and Position Statement. *Oncologist*. 2016;21(10):1191-1199.
 82. Tang LH, Basturk O, Sue JJ, Klimstra DS. A Practical Approach to the Classification of WHO Grade 3 (G3) Well-differentiated Neuroendocrine Tumor (WD-NET) and Poorly Differentiated Neuroendocrine Carcinoma (PD-NEC) of the Pancreas. *Am J Surg Pathol*. 2016;40(9):1192-1202.
 83. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LAJ, Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*. 2011;331(6021):1199-1203.
 84. Missiaglia E, Dalai I, Barbi S, Beghelli S, Falconi M, Della Peruta M, Piemonti L, Capurso G, Di Florio A, Delle Fave G, Pederzoli P, Croce CM, Scarpa A. Pancreatic endocrine tumors: Expression profiling evidences a role for AKT-mTOR pathway. *J Clin Oncol*. 2010;28(2):245-255.
 85. Hijioka S, Hosoda W, Matsuo K, Ueno M, Furukawa M, Yoshitomi H, Kobayashi N, Ikeda M, Ito T, Nakamori S, Ishii H, Kodama Y, Morizane C, Okusaka T, Yanagimoto H, Notohara K, Taguchi H, Kitano M, Yane K, Maguchi H, Tsuchiya

- Y, Komoto I, Tanaka H, Tsuji A, Hashigo S, Kawaguchi Y, Mine T, Kanno A, Murohisa G, Miyabe K, Takagi T, Matayoshi N, Yoshida T, Hara K, Imamura M, Furuse J, Yatabe Y, Mizuno N. Rb Loss and KRAS Mutation Are Predictors of the Response to Platinum-Based Chemotherapy in Pancreatic Neuroendocrine Neoplasm with Grade 3: A Japanese Multicenter Pancreatic NEN-G3 Study. *Clin cancer Res an Off J Am Assoc Cancer Res.* 2017;23(16):4625-4632.
86. Konukiewitz B, Schlitter AM, Jesinghaus M, Pfister D, Steiger K, Segler A, Agaimy A, Sipos B, Zamboni G, Weichert W, Esposito I, Pfarr N, Klöppel G. Somatostatin receptor expression related to TP53 and RB1 alterations in pancreatic and extrapancreatic neuroendocrine neoplasms with a Ki67-index above 20. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc.* 2017;30(4):587-598.
87. Scarpa A, Chang DK, Nones K, Corbo V, Patch AM, Bailey P, Lawlor RT, Johns AL, Miller DK, Mafficini A, Rusev B, Scardoni M, Antonello D, Barbi S, Sikora KO, Cingarlini S, Vicentini C, McKay S, Quinn MCJ, Bruxner TJC, Christ AN, Harliwong I, Idrisoglu S, McLean S, Nourse C, Nourbakhsh E, Wilson PJ, Anderson MJ, Fink JL, Newell F, Waddell N, Holmes O, Kazakoff SH, Leonard C, Wood S, Xu Q, Nagaraj SH, Amato E, Dalai I, Bersani S, Cataldo I, Dei Tos AP, Capelli P, Davì MV, Landoni L, Malpaga A, Miotto M, Whitehall VLJ, Leggett BA, Harris JL, Harris J, Jones MD, Humphris J, Chantrill LA, Chin V, Nagrial AM, Pajic M, Scarlett CJ, Pinho A, Rooman I, Toon C, Wu J, Pinese M, Cowley M, Barbour A, Mawson A, Humphrey ES, Colvin EK, Chou A, Lovell JA, Jamieson NB, Duthie F, Gingras MC, Fisher WE, Dagg RA, Lau LMS, Lee M, Pickett HA, Reddel RR, Samra JS, Kench JG, Merrett ND, Epari K, Nguyen NQ, Zeps N, Falconi M, Simbolo M, Butturini G, Van Buren G, Partelli S, Fassan M, Khanna KK, Gill AJ, Wheeler DA, Gibbs RA, Musgrove EA, Bassi C, Tortora G, Pederzoli P, Pearson J V., Waddell N, Biankin A V., Grimmond SM. Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature.* 2017;543(7643):65-71.
88. Tischler AS. Molecular and cellular biology of pheochromocytomas and extra-adrenal paragangliomas. *Endocr Pathol.* 2006;17(4):321-328.
89. Welander J, Söderkvist P, Gimm O. Genetics and clinical characteristics of

- hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocr Relat Cancer*. 2011;18(6):R253-76.
90. Farrugia FA, Martikos G, Tzanetis P, Charalampopoulos A, Misiakos E, Zavras N, Sotiropoulos D. Pheochromocytoma, diagnosis and treatment: Review of the literature. *Endocr Regul*. 2017;51(3):168-181.
 91. Igaz P, Pat A. *Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes.*; 2019.
 92. Castro-Vega LJ, Lepoutre-Lussey C, Gimenez-Roqueplo AP, Favier J. Rethinking pheochromocytomas and paragangliomas from a genomic perspective. *Oncogene*. 2016;35(9):1080-1089.
 93. Hamidi O, Young WFJ, Iñiguez-Ariza NM, Kittah NE, Gruber L, Bancos C, Tamhane S, Bancos I. Malignant Pheochromocytoma and Paraganglioma: 272 Patients Over 55 Years. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(9):3296-3305.
 94. Herold Z, Doleschall M, Kovesdi A, Patocs A, Somogyi A. Chromogranin A and its role in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Endokrynol Pol*. 2018;69(5):598-610.
 95. Bílek R, Vlček P, Šafařík L, Michalský D, Novák K, Dušková J, Václavíková E, Widimský JJ, Zelinka T. Chromogranin A in the Laboratory Diagnosis of Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4).
 96. Gkolfinopoulos S, Tsapakidis K, Papadimitriou K, Papamichael D, Kountourakis P. Chromogranin A as a valid marker in oncology: Clinical application or false hopes? *World J Methodol*. 2017;7(1):9-15.
 97. Nobels FR, Kwekkeboom DJ, Coopmans W, Schoenmakers CH, Lindemans J, De Herder WW, Krenning EP, Bouillon R, Lamberts SW. Chromogranin A as serum marker for neuroendocrine neoplasia: comparison with neuron-specific enolase and the alpha-subunit of glycoprotein hormones. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(8):2622-2628.
 98. Di Giacinto P, Rota F, Rizza L, Campana D, Isidori A, Lania A, Lenzi A, Zuppi P, Baldelli R. Chromogranin A: From Laboratory to Clinical Aspects of Patients with Neuroendocrine Tumors. *Int J Endocrinol*. 2018;2018:8126087.

99. Mosli HH, Dennis A, Kocha W, Asher LJ, Van Uum SHM. Effect of short-term proton pump inhibitor treatment and its discontinuation on chromogranin A in healthy subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(9):E1731-5.
100. Pregun I, Herszényi L, Juhász M, Miheller P, Hritz I, Patócs A, Rácz K, Tulassay Z. Effect of proton-pump inhibitor therapy on serum chromogranin a level. *Digestion.* 2011;84(1):22-28.
101. Kidd M, Bodei L, Modlin IM. Chromogranin A: Any relevance in neuroendocrine tumors? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2016;23(1):28-37.
102. Modlin IM, Drozdov I, Alaimo D, Callahan S, Teixeira N, Bodei L, Kidd M. A multianalyte PCR blood test outperforms single analyte ELISAs (chromogranin A, pancreastatin, neurokinin A) for neuroendocrine tumor detection. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21(4):615-628.
103. Frank R, Hargreaves R. Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003;2(7):566-580.
104. Malczewska A, Kos-Kudła B, Kidd M, Drozdov I, Bodei L, Matar S, Oberg K, Modlin IM. The clinical applications of a multigene liquid biopsy (NETest) in neuroendocrine tumors. *Adv Med Sci.* 2020;65(1):18-29.
105. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19(1):92-105.
106. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004;116(2):281-297.
107. Chen B, Li H, Zeng X, Yang P, Liu X, Zhao X, Liang S. Roles of microRNA on cancer cell metabolism. *J Transl Med.* 2012;10:228.
108. Malczewska A, Kidd M, Matar S, Kos-Kudła B, Modlin IM. A Comprehensive Assessment of the Role of miRNAs as Biomarkers in Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology.* 2018;107(1):73-90.
109. Yang H, Zhang H, Zhu L, Wang J, Zhang C, Li D. Pathway analysis of cancer-associated microRNA targets. *Int J Oncol.* 2012;41(6):2213-2226.

110. Ma R, Jiang T, Kang X. Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31(1):38.
111. Allegra A, Alonci A, Campo S, Penna G, Petrunaro A, Gerace D, Musolino C. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *Int J Oncol.* 2012;41(6):1897-1912.
112. Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J Cell Physiol.* 2016;231(1):25-30.
113. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(30):10513-10518.
114. Wang H, Peng R, Wang J, Qin Z, Xue L. Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clin Epigenetics.* 2018;10:59.
115. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(4):259-269.
116. Yu S, Lu Z, Liu C, Meng Y, Ma Y, Zhao W, Liu J, Yu J, Chen J. miRNA-96 suppresses KRAS and functions as a tumor suppressor gene in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 2010;70(14):6015-6025.
117. Yan Z, Wang J, Wang C, Jiao Y, Qi W, Che S. miR-96/HBP1/Wnt/ β -catenin regulatory circuitry promotes glioma growth. *FEBS Lett.* 2014;588(17):3038-3046.
118. Butz H, Patócs A. MicroRNAs in endocrine tumors. *EJIFCC.* 2019;30(2):146-164.
119. Zhang GJ, Zhou T, Liu ZL, Tian HP, Xia SS. Plasma miR-200c and miR-18a as potential biomarkers for the detection of colorectal carcinoma. *Mol Clin Oncol.* 2013;1(2):379-384.
120. Giráldez MD, Lozano JJ, Ramírez G, Hijona E, Bujanda L, Castells A, Gironella M. Circulating microRNAs as biomarkers of colorectal cancer: results from a

- genome-wide profiling and validation study. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc.* 2013;11(6):681-8.e3.
121. Sun Y, Wang M, Lin G, Sun S, Li X, Qi J, Li J. Serum microRNA-155 as a potential biomarker to track disease in breast cancer. *PLoS One.* 2012;7(10):e47003.
 122. Wang J, Zhang KY, Liu SM, Sen S. Tumor-associated circulating microRNAs as biomarkers of cancer. *Molecules.* 2014;19(2):1912-1938.
 123. Fehlmann T, Kahraman M, Ludwig N, Backes C, Galata V, Keller V, Geffers L, Mercaldo N, Hornung D, Weis T, Kayvanpour E, Abu-Halima M, Deuschle C, Schulte C, Suenkel U, von Thaler AK, Maetzler W, Herr C, Fähndrich S, Vogelmeier C, Guimaraes P, Hecksteden A, Meyer T, Metzger F, Diener C, Deutscher S, Abdul-Khaliq H, Stehle I, Haeusler S, Meiser A, Groesdonk H V, Volk T, Lenhof HP, Katus H, Balling R, Meder B, Kruger R, Huwer H, Bals R, Meese E, Keller A. Evaluating the Use of Circulating MicroRNA Profiles for Lung Cancer Detection in Symptomatic Patients. *JAMA Oncol.* 2020;6(5):714-723.
 124. Usuba W, Urabe F, Yamamoto Y, Matsuzaki J, Sasaki H, Ichikawa M, Takizawa S, Aoki Y, Niida S, Kato K, Egawa S, Chikaraishi T, Fujimoto H, Ochiya T. Circulating miRNA panels for specific and early detection in bladder cancer. *Cancer Sci.* 2019;110(1):408-419.
 125. Hofland J, Zandee WT, de Herder WW. Role of biomarker tests for diagnosis of neuroendocrine tumours. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(11):656-669.
 126. Rahbari R, Holloway AK, He M, Khanafshar E, Clark OH, Kebebew E. Identification of differentially expressed microRNA in parathyroid tumors. *Ann Surg Oncol.* 2011;18(4):1158-1165.
 127. Aurilia C, Donati S, Palmmini G, Miglietta F, Falsetti I, Iantomasi T, Brandi ML. Are Non-Coding RNAs Useful Biomarkers in Parathyroid Tumorigenesis? *Int J Mol Sci.* 2021;22(19).
 128. Hwang S, Jeong JJ, Kim SH, Chung YJ, Song SY, Lee YJ, Rhee Y. Differential expression of miRNA199b-5p as a novel biomarker for sporadic and hereditary

- parathyroid tumors. *Sci Rep.* 2018;8(1):12016.
129. Yavropoulou MP, Pazaitou-Panayiotou K, Yovos JG, Poulivos C, Anastasilakis AD, Vlachodimitropoulos D, Vambakidis K, Tsave O, Chrisafi S, Daskalaki E, Makras P. Circulating and Tissue Expression Profile of MicroRNAs in Primary Hyperparathyroidism Caused by Sporadic Parathyroid Adenomas. *JBMR plus.* 2021;5(2):e10431.
 130. Roldo C, Missiaglia E, Hagan JP, Falconi M, Capelli P, Bersani S, Calin GA, Volinia S, Liu CG, Scarpa A, Croce CM. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4677-4684.
 131. Thorns C, Schurmann C, Gebauer N, Wallaschofski H, Kumpers C, Bernard V, Feller AC, Keck T, Habermann JK, Begum N, Lehnert H, Brabant G. Global MicroRNA profiling of pancreatic neuroendocrine Neoplasias. *Anticancer Res.* 2014;34(5):2249-2254.
 132. Jiang X, Shan A, Su Y, Cheng Y, Gu W, Wang W, Ning G, Cao Y. miR-144/451 Promote Cell Proliferation via Targeting PTEN/AKT Pathway in Insulinomas. *Endocrinology.* 2015;156(7):2429-2439.
 133. Sadanandam A, Wullschleger S, Lyssiotis CA, Grötzinger C, Barbi S, Bersani S, Körner J, Wafy I, Mafficini A, Lawlor RT, Simbolo M, Asara JM, Bläker H, Cantley LC, Wiedenmann B, Scarpa A, Hanahan D. A Cross-Species Analysis in Pancreatic Neuroendocrine Tumors Reveals Molecular Subtypes with Distinctive Clinical, Metastatic, Developmental, and Metabolic Characteristics. *Cancer Discov.* 2015;5(12):1296-1313.
 134. Lee YS, Kim H, Kim HW, Lee JC, Paik KH, Kang J, Kim J, Yoon YS, Han HS, Sohn I, Cho J, Hwang JH. High expression of microRNA-196a indicates poor prognosis in resected pancreatic neuroendocrine tumor. *Med (United States).* 2015;94(50):1-8.
 135. Gill P, Kim E, Chua TC, Clifton-Bligh RJ, Nahm CB, Mittal A, Gill AJ, Samra JS. MiRNA-3653 Is a Potential Tissue Biomarker for Increased Metastatic Risk in Pancreatic Neuroendocrine Tumours. *Endocr Pathol.* 2019;30(2):128-133.

136. Cavalcanti E, Galleggiante V, Coletta S, Stasi E, Chieppa M, Armentano R, Serino G. Altered miRNAs Expression Correlates With Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors Grades. *Front Oncol.* 2020;10:1187.
137. Zatelli MC, Grossrubatscher EM, Guadagno E, Sciammarella C, Faggiano A, Colao A. Circulating tumor cells and mirnas as prognostic markers in neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer.* 2017;24(6):R223-R237.
138. Tömböl Z, Eder K, Kovács A, Szabó PM, Kulka J, Likó I, Zalatnai A, Rác G, Tóth M, Patócs A, Falus A, Rác K, Igaz P. MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas. *Mod Pathol an Off J United States Can Acad Pathol Inc.* 2010;23(12):1583-1595.
139. Meyer-Rochow GY, Jackson NE, Conaglen J V, Whittle DE, Kunnimalaiyaan M, Chen H, Westin G, Sandgren J, Stålberg P, Khanafshar E, Shibru D, Duh QY, Clark OH, Kebebew E, Gill AJ, Clifton-Bligh R, Robinson BG, Benn DE, Sidhu SB. MicroRNA profiling of benign and malignant pheochromocytomas identifies novel diagnostic and therapeutic targets. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(3):835-846.
140. Patterson E, Webb R, Weisbrod A, Bian B, He M, Zhang L, Holloway AK, Krishna R, Nilubol N, Pacak K, Kebebew E. The microRNA expression changes associated with malignancy and SDHB mutation in pheochromocytoma. *Endocr Relat Cancer.* 2012;19(2):157-166.
141. Zong L, Meng L, Shi R. Role of miR-101 in pheochromocytoma patients with SDHD mutation. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015;8(2):1545-1554.
142. Igaz P, Igaz I, Nagy Z, Nyíró G, Szabó PM, Falus A, Patócs A, Rác K. MicroRNAs in adrenal tumors: relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Cell Mol Life Sci.* 2015;72(3):417-428.
143. Morelli A, Falchetti A, Martinetti V, Becherini L, Mark M, Friedman E, Brandi ML. MEN1 gene mutation analysis in Italian patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Eur J Endocrinol.* 2000;142(2):131-137.
144. Balogh K, Hunyady L, Patocs A, Gergics P, Valkusz Z, Toth M, Racz K. MEN1

- gene mutations in Hungarian patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2007;67(5):727-734.
145. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol*. 1995;48(9):876-878.
 146. Zhuang Z, Vortmeyer AO, Pack S, Huang S, Pham TA, Wang C, Park WS, Agarwal SK, Debelenko L V, Kester M, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Yu F, Heppner C, Crabtree JS, Skarulis MC, Venzon DJ, Emmert-Buck MR, Spiegel AM, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Burns AL, Marx SJ, Lubensky IA. Somatic mutations of the MEN1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas. *Cancer Res*. 1997;57(21):4682-4686.
 147. Szabó PM, Butz H, Igaz P, Rácz K, Hunyady L, Patócs A. Minireview: miRomics in endocrinology: a novel approach for modeling endocrine diseases. *Mol Endocrinol*. 2013;27(4):573-585.
 148. Maragkakis M, Reczko M, Simossis VA, Alexiou P, Papadopoulos GL, Dalamagas T, Giannopoulos G, Goumas G, Koukis E, Kourtis K, Vergoulis T, Koziris N, Sellis T, Tsanakas P, Hatzigeorgiou AG. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Web Server issue):W273-6.
 149. Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by “walking” the genes of three genomes. *J Biomed Inform*. 2011;44(5):839-847.
 150. Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol*. 2003;5(1):R1.
 151. Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*. 2005;37(5):495-500.
 152. Grimson A, Farh KKH, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing.

- Mol Cell*. 2007;27(1):91-105.
153. Tam S, Tsao MS, McPherson JD. Optimization of miRNA-seq data preprocessing. *Brief Bioinform*. 2015;16(6):950-963.
 154. Zhou HQ, Chen QC, Qiu ZT, Tan WL, Mo CQ, Gao SW. Integrative microRNA-mRNA and protein-protein interaction analysis in pancreatic neuroendocrine tumors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20(13):2842-2852.
 155. Grolmusz VK, Kövesdi A, Borka K, Igaz P, Patócs A. Prognostic relevance of proliferation-related miRNAs in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Eur J Endocrinol*. 2018;179(4):219-228.
 156. Zimmermann N, Knief J, Kacprowski T, Lazar-Karsten P, Keck T, Billmann F, Schmid S, Luley K, Lehnert H, Brabant G, Thorns C. MicroRNA analysis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and metastases. *Oncotarget*. 2018;9(47):28379-28390.
 157. de Cubas AA, Leandro-García LJ, Schiavi F, Mancikova V, Comino-Méndez I, Inglada-Pérez L, Perez-Martinez M, Ibarz N, Ximénez-Embún P, López-Jiménez E, Maliszewska A, Letón R, Gómez Graña A, Bernal C, Alvarez-Escolá C, Rodríguez-Antona C, Opocher G, Muñoz J, Megias D, Cascón A, Robledo M. Integrative analysis of miRNA and mRNA expression profiles in pheochromocytoma and paraganglioma identifies genotype-specific markers and potentially regulated pathways. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(4):477-493.
 158. Balogh K, Patócs A, Majnik J, Varga F, Illyés G, Hunyady L, Rác K. Unusual presentation of multiple endocrine neoplasia type 1 in a young woman with a novel mutation of the MEN1 gene. *J Hum Genet*. 2004;49(7):380-386.
 159. Kövesdi A, Tóth M, Butz H, Szücs N, Sárman B, Pusztai P, Tőke J, Reismann P, Fáklya M, Tóth G, Somogyi A, Borka K, Erdei A, Nagy E V, Deák V, Valkusz Z, Igaz P, Patócs A, Grolmusz VK. True MEN1 or phenocopy? Evidence for genotype-phenotypic correlations in MEN1 syndrome. *Endocrine*. 2019;65(2):451-459.
 160. Grolmusz VK, Borka K, Kövesdi A, Németh K, Balogh K, Dékány C, Kiss A, Szentpéteri A, Sárman B, Somogyi A, Csajbók É, Valkusz Z, Tóth M, Igaz P, Rác

- K, Patócs A. MEN1 mutations and potentially MEN1-targeting miRNAs are responsible for menin deficiency in sporadic and MEN1 syndrome-associated primary hyperparathyroidism. *Virchows Arch.* 2017;471(3):401-411.
161. Grolmusz VK, Kövesdi A, Borka K, Igaz P, Patócs A. Prognostic relevance of proliferation-related miRNAs in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(4):219-228.
 162. Shah JS, Soon PS, Marsh DJ. Comparison of Methodologies to Detect Low Levels of Hemolysis in Serum for Accurate Assessment of Serum microRNAs. *PLoS One.* 2016;11(4):e0153200.
 163. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, Tait JF, Tewari M. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila).* 2012;5(3):492-497.
 164. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012;13(5):358-369.
 165. Cheng HH, Yi HS, Kim Y, Kroh EM, Chien JW, Eaton KD, Goodman MT, Tait JF, Tewari M, Pritchard CC. Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One.* 2013;8(6):e64795.
 166. Kövesdi A, Kurucz PA, Nyírő G, Darvasi O, Patócs A, Butz H. Circulating miRNA increases the diagnostic accuracy of chromogranin a in metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancers (Basel).* 2020;12(9):1-20.
 167. Németh K, Darvasi O, Likó I, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, Szabó B, Krokker L, Pállinger É, Igaz P, Patócs A, Butz H. Comprehensive analysis of circulating microRNAs in plasma of patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab.* Published online May 2019.
 168. Tham E, Grandell U, Lindgren E, Toss G, Skogseid B, Nordenskjöld M. Clinical testing for mutations in the MEN1 gene in Sweden: A report on 200 unrelated cases. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(9):3389-3395.
 169. Giacché M, Panarotto A, Mori L, Daffini L, Tacchetti MC, Pirola I, Agabiti Rosei E, Castellano M. A novel menin gene deletional mutation in a little series of Italian

- patients affected by apparently sporadic multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2012;35(2):124-128.
170. Davì MV, Boninsegna L, Dalle Carbonare L, Toiari M, Capelli P, Scarpa A, Francia G, Falconi M. Presentation and outcome of pancreaticoduodenal endocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome. *Neuroendocrinology.* 2011;94(1):58-65.
 171. Falconi M, Eriksson B, Kaltsas G, Bartsch DK, Capdevila J, Caplin M, Kos-Kudla B, Kwekkeboom D, Rindi G, Kloppel G, Reed N, Kianmanesh R, Jensen RT. ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Patients with Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology.* 2016;103(2):153-171.
 172. Pardi E, Borsari S, Saponaro F, Bogazzi F, Urbani C, Mariotti S, Pigliaru F, Satta C, Pani F, Materazzi G, Miccoli P, Grantaliano L, Marcocci C, Cetani F. Mutational and large deletion study of genes implicated in hereditary forms of primary hyperparathyroidism and correlation with clinical features. *PLoS One.* 2017;12(10):1-22.
 173. Christakis I, Qiu W, Hyde SM, Cote GJ, Grubbs EG, Perrier ND, Lee JE. Genotype-phenotype pancreatic neuroendocrine tumor relationship in multiple endocrine neoplasia type 1 patients: A 23-year experience at a single institution. *Surg (United States).* 2018;163(1):212-217.
 174. Machens A, Schaaf L, Karges W, Frank-Raue K, Bartsch DK, Rothmund M, Schneyer U, Goretzki P, Raue F, Dralle H. Age-related penetrance of endocrine tumours in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): A multicentre study of 258 gene carriers. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2007;67(4):613-622.
 175. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424.
 176. Pieterman CRC, Conemans EB, Dreijerink KMA, De Laat JM, Timmers HTM,

- Vriens MR, Valk GD. Thoracic and duodenopancreatic neuroendocrine tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: Natural history and function of menin in tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(3).
177. Dreijerink KMA, Timmers HTM, Brown M. Twenty years of menin: emerging opportunities for restoration of transcriptional regulation in MEN1. *Endocr Relat Cancer*. 2017;24(10):T135-T145.
178. Igaz P. MEN1 clinical background. *Adv Exp Med Biol*. 2009;668:1-15.
179. Tsang VHM, Dwight T, Benn DE, Meyer-Rochow GY, Gill AJ, Sywak M, Sidhu S, Veivers D, Sue CM, Robinson BG, Clifton-Bligh RJ, Parker NR. Overexpression of miR-210 is associated with SDH-related pheochromocytomas, paragangliomas, and gastrointestinal stromal tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(3):415-426.
180. Danza K, De Summa S, Pilato B, Carella M, Palumbo O, Popescu O, Paradiso A, Pinto R, Tommasi S. Combined microRNA and ER expression: a new classifier for familial and sporadic breast cancer patients. *J Transl Med*. 2014;12:319.
181. Corbo V, Dalai I, Scardoni M, Barbi S, Beghelli S, Bersani S, Albarello L, Doglioni C, Schott C, Capelli P, Chilosi M, Boninsegna L, Becker KF, Falconi M, Scarpa A. MEN1 in pancreatic endocrine tumors: analysis of gene and protein status in 169 sporadic neoplasms reveals alterations in the vast majority of cases. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(3):771-783.
182. Vijayaraghavan J, Maggi EC, Crabtree JS. miR-24 regulates menin in the endocrine pancreas. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014;307(1):E84-92.
183. Marini F, Brandi ML. Role of miR-24 in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: A Potential Target for Molecular Therapy. *Int J Mol Sci*. 2021;22(14).
184. Giglio S, Cirombella R, Amodeo R, Portaro L, Lavra L, Vecchione A. MicroRNA miR-24 promotes cell proliferation by targeting the CDKs inhibitors p27Kip1 and p16INK4a. *J Cell Physiol*. 2013;228(10):2015-2023.
185. Occhi G, Regazzo D, Trivellin G, Boaretto F, Ciato D, Bobisse S, Ferasin S, Cetani F, Pardi E, Korbonits M, Pellegata NS, Sidarovich V, Quattrone A, Opocher G,

- Mantero F, Scaroni C. A novel mutation in the upstream open reading frame of the CDKN1B gene causes a MEN4 phenotype. *PLoS Genet.* 2013;9(3):e1003350.
186. Pardi E, Mariotti S, Pellegata NS, Benfini K, Borsari S, Saponaro F, Torregrossa L, Cappai A, Satta C, Mastinu M, Marcocci C, Cetani F. Functional characterization of a CDKN1B mutation in a Sardinian kindred with multiple endocrine neoplasia type 4 (MEN4). *Endocr Connect.* 2015;4(1):1-8.
187. Bowden M, Zhou CW, Zhang S, Brais L, Rossi A, Naudin L, Thiagalingam A, Sicinska E, Kulke MH. Profiling of metastatic small intestine neuroendocrine tumors reveals characteristic miRNAs detectable in plasma. *Oncotarget.* 2017;8(33):54331-54344.
188. Pfeffer SR, Yang CH, Pfeffer LM. The Role of miR-21 in Cancer. *Drug Dev Res.* 2015;76(6):270-277.
189. Frankel LB, Christoffersen NR, Jacobsen A, Lindow M, Krogh A, Lund AH. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 2008;283(2):1026-1033.
190. Hu JZ, Huang JH, Zeng L, Wang G, Cao M, Lu HB. Anti-apoptotic effect of microRNA-21 after contusion spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma.* 2013;30(15):1349-1360.
191. Peralta-Zaragoza O, Deas J, Meneses-Acosta A, De la O-Gómez F, Fernández-Tilapa G, Gómez-Cerón C, Benítez-Boijseauneau O, Burguete-García A, Torres-Poveda K, Bermúdez-Morales VH, Madrid-Marina V, Rodríguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A, Pérez-Plasencia C. Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells. *BMC Cancer.* 2016;16:215.
192. Wu Y, Song Y, Xiong Y, Wang X, Xu K, Han B, Bai Y, Li L, Zhang Y, Zhou L. MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth and Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol.* 2017;43(3):945-958.
193. Cai L, Wang W, Li X, Dong T, Zhang Q, Zhu B, Zhao H, Wu S. MicroRNA-21-

- 5p induces the metastatic phenotype of human cervical carcinoma cells in vitro by targeting the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Oncol Lett.* 2018;15(4):5213-5219.
194. Li Y, Chen Y, Li J, Zhang Z, Huang C, Lian G, Yang K, Chen S, Lin Y, Wang L, Huang K, Zeng L. Co-delivery of microRNA-21 antisense oligonucleotides and gemcitabine using nanomedicine for pancreatic cancer therapy. *Cancer Sci.* 2017;108(7):1493-1503.
 195. Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, Hur K, Yoo MW, Lee HJ, Yang HK, Kim VN. Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(5):1672-1681.
 196. Prasad R, Katiyar SK. Down-regulation of miRNA-106b inhibits growth of melanoma cells by promoting G1-phase cell cycle arrest and reactivation of p21/WAF1/Cip1 protein. *Oncotarget.* 2014;5(21):10636-10649.
 197. Yu T, Liu L, Li J, Yan M, Lin H, Liu Y, Chu D, Tu H, Gu A, Yao M. MiRNA-10a is upregulated in NSCLC and may promote cancer by targeting PTEN. *Oncotarget.* 2015;6(30):30239-30250.
 198. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebet BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005;435(7043):834-838.
 199. Aakko S, Straume AH, Birkeland EE, Chen P, Qiao X, Lønning PE, Kallio MJ. MYC-Induced miR-203b-3p and miR-203a-3p Control Bcl-xL Expression and Paclitaxel Sensitivity in Tumor Cells. *Transl Oncol.* 2019;12(1):170-179.
 200. Shen M, Dong C, Ruan X, Yan W, Cao M, Pizzo D, Wu X, Yang L, Liu L, Ren X, Wang SE. Chemotherapy-Induced Extracellular Vesicle miRNAs Promote Breast Cancer Stemness by Targeting ONECUT2. *Cancer Res.* 2019;79(14):3608-3621.
 201. An N, Zheng B. MiR-203a-3p Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation, EMT,

- and Apoptosis by Regulating SLUG. *Technol Cancer Res Treat.* 2020;19:1533033819898729.
202. Chen L, Gao H, Liang J, Qiao J, Duan J, Shi H, Zhen T, Li H, Zhang F, Zhu Z, Han A. miR-203a-3p promotes colorectal cancer proliferation and migration by targeting PDE4D. *Am J Cancer Res.* 2018;8(12):2387-2401.
 203. Di C, Jiang Y, Li M, Juan X, Xu C. Circulating Exosomal microRNA Signature As a Noninvasive Biomarker for Diagnosis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Blood.* 2018;132(Supplement 1):5406.
 204. Huang Z, Chen W, Du Y, Guo Q, Mao Y, Zhou X, Hua D. Serum miR-16 as a potential biomarker for human cancer diagnosis: results from a large-scale population. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2019;145(3):787-796.
 205. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR. Neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(1):1-18.
 206. Klöppel G, Couvelard A, Perren A, Komminoth P, McNicol AM, Nilsson O, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B, Papotti M, Rindi G, Plöckinger U. ENETS Consensus Guidelines for the Standards of Care in Neuroendocrine Tumors: towards a standardized approach to the diagnosis of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors and their prognostic stratification. *Neuroendocrinology.* 2009;90(2):162-166.
 207. Li M, Song Q, Li H, Lou Y, Wang L. Circulating miR-25-3p and miR-451a May Be Potential Biomarkers for the Diagnosis of Papillary Thyroid Carcinoma. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132403.
 208. Chirshhev E, Oberg KC, Ioffe YJ, Unternaehrer JJ. Let-7 as biomarker, prognostic indicator, and therapy for precision medicine in cancer. *Clin Transl Med.* 2019;8(1):24.
 209. Yu LX, Zhang BL, Yang Y, Wang MC, Lei GL, Gao Y, Liu H, Xiao CH, Xu JJ, Qin H, Xu XY, Chen ZS, Zhang DD, Li FG, Zhang SG, Liu R. Exosomal microRNAs as potential biomarkers for cancer cell migration and prognosis in hepatocellular carcinoma patient-derived cell models. *Oncol Rep.* 2019;41(1):257-

- 269.
210. Li A, Yu J, Kim H, Wolfgang CL, Canto MI, Hruban RH, Goggins M. MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls. *Clin Cancer Res.* 2013;19(13):3600-3610.
 211. Vicentini C, Calore F, Nigita G, Fadda P, Simbolo M, Sperandio N, Luchini C, Lawlor RT, Croce CM, Corbo V, Fassan M, Scarpa A. Exosomal miRNA signatures of pancreatic lesions. *BMC Gastroenterol.* 2020;20(1):137.
 212. Calsina B, Castro-Vega LJ, Torres-Pérez R, Inglada-Pérez L, Currás-Freixes M, Roldán-Romero JM, Mancikova V, Letón R, Remacha L, Santos M, Burnichon N, Lussey-Lepoutre C, Rapizzi E, Graña O, Álvarez-Escolá C, de Cubas AA, Lanillos J, Cordero-Barreal A, Martínez-Montes AM, Bellucci A, Amar L, Fernandes-Rosa FL, Calatayud M, Aller J, Lamas C, Sastre-Marcos J, Canu L, Korpershoek E, Timmers HJ, Lenders JW, Beuschlein F, Fassnacht-Capeller M, Eisenhofer G, Mannelli M, Al-Shahrour F, Favier J, Rodríguez-Antona C, Cascón A, Montero-Conde C, Gimenez-Roqueplo AP, Robledo M. Integrative multi-omics analysis identifies a prognostic miRNA signature and a targetable miR-21-3p/TSC2/mTOR axis in metastatic pheochromocytoma/paraganglioma. *Theranostics.* 2019;9(17):4946-4958.
 213. Ruff SM, Ayabe RI, Malekzadeh P, Good ML, Wach MM, Gonzales MK, Tirosh A, Nilubol N, Pacak K, Kebebew E, Patel D. MicroRNA-210 May Be a Preoperative Biomarker of Malignant Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J Surg Res.* 2019;243:1-7.
 214. Burgess JR, Nord B, David R, Greenaway TM, Parameswaran V, Larsson C, Shepherd JJ, Teh BT. Phenotype and phenocopy: The relationship between genotype and clinical phenotype in a single large family with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN 1). *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000;53(2):205-211.
 215. Liu J, Gao J, Du Y, Li Z, Ren Y, Gu J, Wang X, Gong Y, Wang W, Kong X. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *Int J cancer.* 2012;131(3):683-691.

216. Pesta M, Kucera R, Topolcan O, Karlikova M, Houfkova K, Polivka J, Macanova T, Machova I, Slouka D, Kulda V. Plasma microRNA Levels Combined with CEA and CA19-9 in the Follow-Up of Colorectal Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2019;11(6).

10. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke:

1. Kövesdi A, Tóth M, Butz H, Szücs N, Sárman B, Pusztai P, Tóke J, Reismann P, Fáklya M, Tóth G, Somogyi A, Borka K, Erdei A, Nagy E V, Deák V, Valkusz Z, Igaz P, Patócs A, Grolmusz VK. True MEN1 or phenocopy? Evidence for geno-phenotypic correlations in MEN1 syndrome. *Endocrine*. 2019;65(2):451-459.
2. Grolmusz VK, Borka K, Kövesdi A, Németh K, Balogh K, Dékány C, Kiss A, Szentpéteri A, Sárman B, Somogyi A, Csajbók É, Valkusz Z, Tóth M, Igaz P, Rác K, Patócs A. MEN1 mutations and potentially MEN1-targeting miRNAs are responsible for menin deficiency in sporadic and MEN1 syndrome-associated primary hyperparathyroidism. *Virchows Arch*. 2017;471(3):401-411.
3. Grolmusz VK, Kövesdi A, Borka K, Igaz P, Patócs A. Prognostic relevance of proliferation-related miRNAs in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Eur J Endocrinol*. 2018;179(4):219-228.
4. Kövesdi A, Kurucz PA, Nyíró G, Darvasi O, Patócs A, Butz H. Circulating miRNA increases the diagnostic accuracy of chromogranin a in metastatic pancreatic neuroendocrine tumors. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):1-20.

Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó saját közlemények jegyzéke

5. Herold Z, Doleschall M, Kövesdi A, Patócs A, Somogyi A. Chromogranin A and its role in the pathogenesis of diabetes mellitus. *Endokrynol Pol*. 2018;69(5):598-610.
6. Szappanos Á, Mészáros K, Nagy Z, Kövesdi A, Likó I, Kiss E, Tóth M, Patócs A. [Extraadrenal glucocorticoid synthesis]. *Orv Hetil*. 2018;159(7):260-268.
7. Bazsó A, Szappanos Á, Kövesdi A, Rásonyi R, Nagy E, Patócs A, Poór G, Kiss E. The potential pathogenic role of glucocorticoid receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev*. 2019;18(10):102362.

8. Bazsó A, Kövesdi A, Rásonyi R, Nagy E, Poór G, Patócs A, Kiss E. Glucocorticoid receptor polymorphisms in rheumatoid arthritis: results from a single centre. Clin Exp Rheumatol. 2020;38(5):858-863.
9. Molnár Á, Kövesdi A, Szücs N, Tóth M, Igaz P, Rácz K, Patócs A. Polymorphisms of the GR and HSD11B1 genes influence body mass index and weight gain during hormone replacement treatment in patients with Addison's disease. Clin Endocrinol (Oxf). 2016;85(2).
10. Kövesdi A, Patócs A. Brief Description of Inheritance Patterns. Exp Suppl. 2019;111:21-27.
11. Sarkadi B, Grolmusz VK, Butz H, Kövesdi A, Likó I, Nyirő G, Igaz P, Patócs A. [Evolution of molecular genetic methods in the clinical diagnosis of hereditary endocrine tumour syndromes]. Orv Hetil. 2018;159(7):285-292.
12. Brubel R, Dobó N, Csibi N, Kövesdi A, Máté S, Ács N, Lukovich P, Murber Á, Bokor A. [The effect of surgical treatment of bowel endometriosis on fertility]. Orv Hetil. 2019;160(41):1633-1638.

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom elsősorban témavezetőmnek, **Prof. Dr. Patócs Attilának**, aki mérhetetlen szakmai tudásával és tapasztalatával, türelmével, bizalmával irányította munkámat. Köszönöm **Dr. Butz Henriettnek**, aki ötleteivel, szakmai vezetésével szintén jelentős mértékben hozzájárult PhD munkámhoz. Köszönöm **Dr. Grolmusz Vince Kornél** kollégámnak, aki példamutató kitartásával, precizitásával, türelmével vezette PhD munkám egy részét.

Köszönettel tartozom Dr. Borka Katalin egyetemi docens asszonynak a hisztopatológiai vizsgálatok elvégzéséért.

Köszönöm az Endokrin Genetikai Laboratórium dolgozóinak, kollégáimnak támogatását: Dr. Nyíró Gábornak, Dr. Sarkadi Balázsnak, Dr. Decmann Ábelnek, Dr. Sumánszki Csabának, Fülöpné Dr. Németh Kingának, Dr. Perge Pálnak, Dr. Doleschall Mártonnak, Szabó Borbálának, Krokker Lillának, Darvasi Ottónak, Dr. Mészáros Katalinnak, Benkő Mariannak. Külön köszönettel tartozom a II. sz. Belgyógyászati Klinika endokrinológus szakorvosainak.

Köszönöm továbbá mindazon klinikai endokrinológus kollégának a segítségét, akik a betegek referálásán túl hozzáférést biztosítottak a betegek klinikai adataihoz.

Hálával és köszönettel tartozom családomnak, akik támogatásukkal, türelmükkel, bizalmukkal segítették dolgozatom elkészülését.