

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

Doktori tézisek

Zsippai Adrienn

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Programvezető: Dr. Rácz Károly egyetemi tanár, MTA doktora

Témavezető: Dr. Igaz Péter egyetemi docens, MTA doktora

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

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Darvas Katalin egyetemi tanár, Ph.D.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Gundy Sarolta osztályvezető, kandidátus
Dr. Nagy Bálint tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2013

I. BEVEZETÉS

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

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

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

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

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

II. CÉLKITŰZÉSEK

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

III. MÓDSZEREK

Sejttenyésztés és kezelések

A humán mellékvesekéreg carcinoma NCI-H295R sejt monolayer tenyésztését Dulbecco's modified Eagle's medium/Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM:F-12) táptalajon hoztuk létre kiegészítve: inzulinnal, transferrinnel, szelénnel, linolénsavval, szarvasmarha szérum albuminnal, penicillin/sztreptomocinnel, Nu-szérummal, L-glutaminnal és 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazin-etánszulfonsavval (Sigma-Aldrich Chemical Co.). A sejteket párás környezetben 37°C-on tenyésztettük, és 7 naponta szubkultúrát készítettünk. A sejteket 24, 48, 72 és 96 órán keresztül mitotánnal kezeltük, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M és 10^{-6} M koncentrációkban. A kontroll csoporthoz azonos mennyiségű és koncentrációjú etanolt adtunk.

Sejt viabilitás vizsgálatok

A sejtek viabilitásának meghatározására MTT tesztet és áramlási citometria vizsgálatot alkalmaztunk.

Az MTT teszt során NCI-H295R sejteket kiültettük 1×10^4 sejt/lyuk denzitásban, komplett tápközegben. 48 órás inkubálás után 10^{-4} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M koncentrációjú mitotánt tartalmazó tápközegben a tenyészetet 24, 48, 72 és 96 órán keresztül újra inkubáltuk. 20 μ l MTT (Sigma-Aldrich Chemical Co.) alkalmazásával, és további 24 órás inkubációt követően az optikai denzitást a Labsystem Multiscan Multisoft microplate leolvasó (Labsystem) segítségével mértük.

Az áramlási citometria vizsgálat során az NCI-H295R sejteket $1,5 \times 10^5$ sejt/lyuk sűrűségben ültettük ki, komplett tápközegben. 48 órás inkubáció után 10^{-4} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M és 10^{-6} M koncentrációjú mitotán alkalmazásával 24, 48, 72 és 96 órán keresztül újra inkubáltuk a tenyészetet. Majd a sejtek 0,5 g/L tripszinnel (Sigma-Aldrich Chemical Co.) való kezelését követően a mérés FACSCalibur típusú áramlási citométerrel (BD Biosciences) történt. Az adatokat CellQuest Pro™ Software (BD Biosciences) segítségével elemeztük.

Mindkét mérésnél kontrollként azonos mennyiségű etanollal kezelt sejteket használtunk.

Szteroidhormon szintek meghatározása

48 órás inkubációt követően 24, 48, 72 és 96 órán keresztül, 10^{-6} M mitotánnal kezelt NCI-H295R sejteket felülúszójának segítségével két hormont, a kortizol és az androszténdion szint mérését végeztük el. A kortizol szint meghatározása Elecsys Immunoanalyser System (Roche Diagnostics Ltd) segítségével történt, Roche Cobas kortizol elektrokemilumineszcens immunoassay (Roche Diagnostics GmbH) alkalmazásával. Az androszténdion szint azonosítását Androstenedione Radioimmunoassay Kit (DiaSorin SPA) használatával valósítottuk meg

RNS izolálás

2×10^6 számú NCI-H295R sejt 5×10^{-6} M mitotános és etanolos kezelését követően az RNS izolálást Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH) segítségével végeztünk, míg DNáz emésztés RNase-Free DNase Set (Qiagen GmbH) alkalmazásával történt.

Az RNS koncentráció meghatározásához NanoDrop 1000 Spektrofotométert (Thermo Fisher Scientific Inc) használtunk, s az RNS-integritásának mérése Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies Inc) segítségével valósult meg.

mRNS expressziós profil meghatározása

16 független NCI-H295R minta (4 minta 48 órás kontroll, 4 minta 72 órás kontroll, 4 minta 48 órás mitotán-kezelt és 4 minta 72 órás mitotán-kezelt) mRNS expressziós mintázatát vizsgáltuk. Az mRNS expressziós profil meghatározása $4 \times 44K$ Agilent Whole Human Genome Microarray (Agilent Technologies Inc) lemezek segítségével történt.

QRT-PCR vizsgálatok

Szignifikáns expressziós eltérést mutató gének validálása a csoportonkénti esetszám növelését követően kvantitatív valós idejű reverz transzkripció polimeráz lánreakció (qRT-PCR) módszerrel történt. 7 szignifikáns ($p < 0.05$) expressziós eltérést mutató gént választottunk ki validálás és esetszám növelés céljából. A legkisebb változási érték különbség és a szórástényező vizsgálata alapján a *ZNF625* (Applied Biosystems) gént találtuk a legalkalmasabb "housekeeping" génnek.

Statisztikai elemzés

A microarray adatok statisztikai elemzését GeneSpring Software 10,1-el (Agilent Technologies Inc.) végeztük. A géneexpressziók változásai közötti különbségek kimutatásához kétutas ANOVA módszert, Student t-próbát, Tukey-féle post hoc tesztet, majd Benjamini-Hochberg korrekciót használtunk. A viabilitás vizsgálat, a szteroidhormon szint meghatározás és qRT-PCR adatok statisztikai elemzése során Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corp.) és Statistica 8,0 (Statsoft Inc.) szoftvereket alkalmaztunk. A qRT-PCR adatokat kétutas ANOVA módszerrel és Tukey-féle post hoc teszttel elemeztük.

A mikroRNS-ek által befolyásolt patogenetikai útvonalak bioinformatikai elemzése

Adatkészletek

Felnőtt ép mellékvesék, ACA és ACC miRNS expressziós adatait öt vizsgálatból gyűjtöttük össze. Így összesen 631 miRNS-t azonosítottunk, melyből 305 miRNS felülexpresszált és 326 miRNS alulexpresszált volt. A nyers miRNS expressziós adatokat a következő módon csoportosítottuk: az ACA fokozott expressziójú miRNS-ei vs ACC fokozott expressziójú miRNS-ei, az ACA csökkent kifejeződésű miRNS-ei vs ACC csökkent kifejeződésű miRNS-ei, ép mellékvese fokozott expressziójú miRNS-ei vs ACC fokozott expressziójú miRNS-ei, valamint ép mellékvese csökkent kifejeződésű miRNS-ei vs ACC csökkent kifejeződésű miRNS-ei. A további vizsgálatokban legalább 2 tanulmányban szereplő miRNS-eket használtuk.

Felnőtt ép mellékvesék, ACA és ACC mRNS expressziós adatait három elemzésből gyűjtöttük össze. A tanulmányokat minden esetben szakirodalom alapján azonosítottuk (PubMed, www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

Szövetspecifikus miRNS target predikció

Legalább 2 tanulmányban szignifikánsnak bizonyult miRNS-ek lehetséges mRNS célpontjait három számítógépes target predikciós algoritmusok (TargetScan 5.2, Pictar és a MicroCosm Targets) segítségével azonosítottuk. Az eredményeket egy saját Java programnyelvű szoftver segítségével egyesítettük.

A szövetspecifikusság eléréséhez az mRNS expressziós tanulmányok eredményeit a miRNS adatokkal párhuzamosan vizsgáltuk. A szűrést követően a Gene Set Enrichment analízist (GSEA, www.broad.mit.edu) alkalmaztunk Leading Edge-Analysis (LEA) megközelítéssel.

Útvonalelemzés

GSEA módszerrel szűrt, szövetspecifikus miRNS célpontokon az útvonalelemzést Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 7.1 szoftver (Ingenuity Systems) segítségével végeztük.

IV. EREDMÉNYEK

Sejt viabilitás vizsgálatok

A sejtek viabilitás vizsgálat alapján megállapítottuk, hogy 10^{-5} , 5×10^{-6} és 10^{-6} M koncentrációjú mitotán kezelésnek nem volt szignifikáns hatása a sejtek életképességére 24, 48, 72 és 96 órás inkubációs idő után sem. Azonban a mitotán 10^{-4} M koncentrációban drasztikusan csökkentette a sejtek életképességét mind MTT, s mind áramlási citometriás vizsgálat során.

Szteroidhormon szintek meghatározása

A kortizol és az androszténdion szintek mérésével megállapítottuk, hogy a NCI-H295R mellékvesekéreg carcinoma sejtvonalon a mitotán 5×10^{-6} M koncentrációja az az optimális kezelési koncentráció, amely a sejtek életképességét még nem befolyásolja, de a hormonszintézist már hatékonyan gátolja.

Microarray elemzés

A szteroidhormon vizsgálatok során megfigyelt több mint 50%-os hormonkoncentráció csökkenés alapján a további génexpressziós analízishez a 48 és 72 órás kezelési periódusokat választottuk ki. A mitotánt 5×10^{-6} M koncentrációban alkalmaztuk.

Több mint kétszeres expressziós változással, összesen 117 szignifikánsan kifejeződő gént azonosítottunk a 48 órás és a 72 órás mitotánnal kezelt csoportokban a megfelelő kontroll csoportokhoz viszonyítva. Ezen eredmények alapján a 48 órás kezelt mintáknál 63, a 72 órás mintáknál 111 szignifikánsan eltérően kifejeződő gént detektáltunk. Időfaktor nélkül a mintákban 60 szignifikánsan eltérően kifejeződő gént azonosítottunk.

A microarray alapján szignifikáns eltérést mutató gének azonosítását követően 7 gént validáltunk qRT-PCR módszer segítségével. Mivel kutatásaink során a mitotánnak a szteroidhormon bioszintézisre való lehetséges hatásait szeretnénk volna vizsgálni, így a validáláshoz a 3 legnagyobb változást mutató szteroidhormon bioszintézisben részt vevő, csökkent expressziójú gént választottuk: a *HSD3B1*-t, a *HSD3B2* és a *CYP21A2*. Ezen kívül a 4 legnagyobb mértékű fokozott expressziós változást mutató gént, a *GDF-15*-t, az *ALDH1L2*-t, a *TRIB3*-t és a *SERPINE2*-t vizsgáltuk.

A kiválasztott gének expressziójának validálása kvantitatív valós idejű PCR módszerrel

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

A mikroRNS-ek által befolyásolt patogenetikai útvonalak bioinformatikai elemzése

Szövetspecifikus target predikció

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

Útvonalelemzés

Az Ingenuity Pathway analízis segítségével összesen 820 olyan útvonalat sikerült azonosítanunk, amelyek a közös miRNS-ek által legalább két különböző vizsgálatban érintettek voltak. Ezek közül, a p-érték alapján ($p < 0.05$) 418 szignifikáns útvonalat identifikáltunk, melyből 178 minden tanulmányban részt vett. A korábbi metaanalízis vizsgálatunk alapján ezen útvonalak közül összesen 12, a retinsav jelátvitelben és a sejtciklus szabályozásban részt vevő útvonalakat választottuk ki a további elemzésünkhöz.

Retinsav jelátviteli útvonalak

Az ép mellékvese és ACC összehasonlításban a peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor alfa/retinoid X receptor alfa (*PPAR α /RXR α*) és a peroxiszóma proliferátor aktivátor receptor (*PPAR*) jelátviteli útvonalakat azonosítottuk, míg az ACA és ACC összevonás esetén a lipopoliszacharid/interleukin-1 (*LPS/IL-1*) által közvetített retinoid X receptor (*RXR*) funkció gátlás, a *PPAR α /RXR α* aktiválási és a retinsav receptor (*RAR*) aktiválási útvonalakat identifikáltuk.

Ép mellékvese és ACC összehasonlításban a retinsav jelátviteli útvonalak mRNS expressziós változásai kapcsolatban állhatnak a következő felülexpresszált (*miR-127-3p*, *miR-184*, *miR-210*, *miR-424*, *miR-432*, *miR-483-5p*, *miR-487b*, *miR-503*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (*miR-214*, *miR-511*, *miR-375*).

ACA és ACC összevetésben a retinsav jelátviteli útvonalak mRNS expressziós változásai összefüggésben lehetnek a következő felülexpresszált (*miR-106b*, *miR-127-3p*, *miR-130b*, *miR-135a*, *miR-136*, *miR-148b*, *miR-184*, *miR-210*, *miR-376c*, *miR-410*, *miR-424*, *miR-432*, *miR-483-5p*, *miR-487b*, *miR-503*, *miR-506*, *miR-542-3p*, *miR-542-5p*, *miR-642*, *miR-450a*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (*miR-let-7b*, *miR-101*, *miR-125b*, *miR-195*, *miR-214*, *miR-497*, *miR-557*, *miR-600*, *miR-617*, *miR-199a-3p*, *miR-199a-5p*, *miR-202*, *miR-335*, *miR-511*, *miR-572*, *miR-647*, *miR-708*, *miR-99a*) .

Sejtciklust szabályozó útvonalak

A sejtciklust szabályozó útvonalak között az ép mellékvese és ACC összehasonlítást alapul véve megtaláltuk az aril hidrokarbon receptor, a DNS károsodás indukálta 45 (*GADD45*) jelátviteli és az integrin jelátviteli útvonalakat, míg az ACA és ACC csoportok összehasonlításánál az integrin jelátviteli útvonalat, a G2/M ellenőrzési pont szabályozás, a kromoszóma replikáció sejtciklus szabályozás, illetve a ciklin és sejtciklus szabályozás útvonalait azonosítottuk.

Ép mellékvese és ACC összehasonlításban az aril hidrokarbon receptor és a *GADD45* jelátviteli útvonalak mRNS expressziós változásai összeköttetésben lehetnek a következő felülexpresszált (*miR-127-3p*, *miR-424*, *miR-432*, *miR-483-5p*, *miR-503*, *miR-184*, *miR-210*, *miR-487b*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (*miR-214*, *miR-375*, *miR-511*). Az integrin jelátviteli útvonal mRNS expressziós változásai pedig a következő felülexpresszált (*miR-127-3p*, *miR-184*, *miR-423*, *miR-424*, *miR-483-5p*,

miR-487b, miR-503, miR-210, miR-432) és alulexpresszált miRNS-ekkel (*miR-214, miR-51, miR-375*) lehetnek kapcsolatban.

ACA és ACC összevonásban az integrin jelátviteli útvonal mRNA expressziós változásai a következő felülexpresszált (*miR-106b, miR-127-3p, miR-135a, miR-136, miR-148b, miR-376c, miR-424, miR-432, miR-503, miR-506, miR-542-3p, miR-542-5p, miR-642, miR-130b, miR-210, miR-410, miR-483-5p, miR-487b, miR-450a*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (*miR-let-7b, miR-101, miR-125b, miR-195, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-202, miR-214, miR-335, miR-511, miR-557, miR-600, miR-617, miR-647, miR-708, miR-99a, miR-497, miR-572*) függhetnek össze. A G2/M ellenőrzési pont szabályozása, a kromoszóma replikáció szabályozás, a ciklin és sejtciklus szabályozás mRNA expressziós változásai összefüggésben állhatnak a következő felülexpresszált (*miR-135a, miR-487b, miR-410, miR-503, miR-106b, miR-127-3p, miR-148b, miR-184, miR-424, miR-483-5p, miR-506, miR-542-3p, miR-542-5p, miR-642*) és alulexpresszált miRNS-ekkel (*miR-let-7b, miR-101, miR-125b, miR-195, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-202, miR-214, miR-335, miR-497, miR-511, miR-557, miR-572, miR-600, miR-617, miR-647, miR-708, miR-99a*).

V. MEGBESZÉLÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

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

Eredményeimet az alábbi pontokban összegezve:

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

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

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

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

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

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

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

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

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

DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK

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

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A doktori munkám elkészítésével kapcsolatban köszönetemet szeretném kifejezni:

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