

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2499.

SARKADI BALÁZS

Hormonális szabályozó mechanizmusok

című program

Programvezető: Dr. Igaz Péter, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Patócs Attila, egyetemi tanár

Phaeochromocytómák és paragangliómák komplex genetikai és tumorbiológiai vizsgálata

Doktori értekezés

Dr. Sarkadi Balázs

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Czirják Gábor, PhD., egyetemi docens
Dr. Rubovszky Gábor, PhD., főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

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

Tagok: Dr. Hubina Erika, PhD., főorvos

Dr. Beke Artúr, PhD., egyetemi adjunktus

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	6
1. Bevezetés.....	9
1.1 Örökletes endokrin tumorszindrómák és a Multiplex endokrin neoplázia 2-es típusa (MEN2).....	9
1.2 Phaeochromocytómák és paragangliómák.....	10
1.2.1 Phaeochromocytómákról és paragangliómákról általánosságban.....	10
1.2.2 Genetikai háttér.....	11
1.2.3 Molekuláris patogenezis.....	12
1.3 Szukcinát-dehidrogenáz.....	17
1.3.1 A szukcinát-dehidrogenáz felépítése.....	18
1.3.2 A szukcinát-dehidrogenáz működése.....	19
1.4 A citrát-ciklusbeli enzimek mutációinak hatása Phaeo/PGL-ban.....	20
1.4.1 Onkometabolitok.....	20
1.4.2 Az <i>SDHx</i> mutációkhoz társuló kórélettan.....	21
1.4.3 A szukcinát akkumuláció további következményei.....	23
1.4.4 A glutamin/glutamát metabolizmus szerepe.....	24
1.5 SDH gátlószerke.....	24
1.5.1 Itakonát.....	24
1.5.2 Atpenin.....	27
1.6 Az újgenerációs szekvenálás jelentősége Phaeo/PGL betegek molekuláris genetikai diagnosztikájában.....	27
2. Célkitűzések.....	34
3. Módszerek.....	35
3.1 Phaeo/PGL betegek mutáció vizsgálata DNS szekvenálással.....	35
3.2 Az Endogén Panel összeállítása.....	35

3.3	Variánsok azonosítása a panelszekvenálás során	36
3.4	Sejttenyészetek.....	36
3.5	<i>Sdhb</i> csendesítés	37
3.6	Fehérje izolálása és Western Blot.....	38
3.7	Itakonát kezelés.....	38
3.8	Atpenin kezelés.....	38
3.9	Intracelluláris metabolit koncentráció mérések	39
3.10	AlamarBlue – Viabilitási assay.....	39
3.11	Sejtproliferációs assay	40
3.12	Tömegspektrometriai mérések.....	41
3.13	Sejtlégzés és extracelluláris savasodás	41
3.14	A mitokondrium membrán potenciál ($\Delta\Psi_m$) és a plazma membrán potenciál (PMP) egyidejű mérése	42
3.15	Statisztikai analízis	43
4.	Eredmények.....	44
4.1	Csírsejtes <i>BRCAl</i> mutáció egy MEN2A szindrómás betegben	44
4.2	Újgenerációs szekvenálás klinikai alkalmazhatósága.....	47
4.2.1	Az Endogén Panel 1.0 kifejlesztése.....	47
4.2.1.1	Az Endogén Panel 1.0 prospektív csoportja.....	48
4.2.2	Az Endogén Panel 2.0 kifejlesztése.....	49
	Endogén Panel 1.0 validálási csoport.....	51
	Endogén Panel 1.0 prospektív csoport	51
	Endogén Panel 2.0	51
4.2.3	A másodlagos variánsok jelentősége.....	51
4.2.4	Az <i>Sdhb</i> csendesítése hatékonyan csökkenti az SDH aktivitást.....	63

4.2.5	Az itakonát kezelés sikeresen gátolta az összes vizsgált sejtvonal SDH aktivitását.....	65
4.2.6	Az atpenin kezelés sikeresen gátolta az összes vizsgált sejtvonal SDH aktivitását.....	67
4.2.7	A SDH gátlása összességében pozitív hatással van a PC12 sejtek életképességére és nincs hatással a proliferációjukra	67
4.2.8	Az itakonát csökkentette a HeLa és H295R sejtek életképességét, míg az atpenin csak a H295R sejtek életképességére gyakorolt negatív hatást	70
4.2.9	A glutamát és laktát koncentrációban mutatkozó változások SDH gátlószer és sejttípus specifikusak	72
4.2.10	A GLS-1 gén expressziója összefüggést mutat a SDH enzim gátlásával. 83	
4.2.11	A GLS és az SDHB immunhisztokémiai vizsgálata a GLS-1 enzim fontos szerepére utal	86
4.2.12	Az SDH enzim és a GLS-1 együttes gátlása csökkenti a PC12 sejtek proliferációját.....	91
4.2.13	A 3D szferoid PC12 modelben a BPTES növeli a halott sejtek számát a kontrollhoz képest	93
4.2.14	Oxigénfogyasztásos mérések.....	93
5.	Megbeszélés.....	96
5.1	Összetett genetikai háttér, esettanulmány	97
5.2	Az Endogén szekvenáló Panel klinikai felhasználhatósága.....	98
5.2.1	Patogén variánsok.....	101
5.2.2	Ismeretlen jelentőséggel bíró variánsok	102
5.3	A mellékvesevelő és a paraganglionok tumorbiológiai jellemzői szukcinát dehidrogenáz károsodása esetén.....	104
5.3.1	A kutatásainkhoz felhasznált sejtvonalak rövid összefoglalója	104

5.3.2	A szukcinát akkumuláció modellezésének jelentősége és hatása a különböző sejtvonalakra	105
5.3.3	Az SDH gátlás hatása a sejtek metabolikus profiljaira.....	106
5.3.4	A glutamin/glutamát metabolizmus jelentősége in vitro kísérleteinkben és Phaeo/PGL danagatok esetében.....	107
5.3.5	A GLS-1 gátlás hatékonyan csökkenti az SDH funkciójában károsodott PC12 sejtek proliferációját	109
5.3.6	A GLS-1 jelentősége in vivo különböző etiológiájú Phaeo/PGL metszetek immunhisztokémiai vizsgálata alapján.....	110
6.	Következtetések.....	111
7.	Összefoglalás.....	114
8.	Summary.....	115
9.	Irodalomjegyzék.....	116
10.	Saját publikációk jegyzéke	142
11.	Köszönetnyilvánítás	144
	Táblázatjegyzék.....	146
	Ábrajegyzék.....	146

Rövidítések jegyzéke

4EBP1	eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E kötő fehérje 1
5hmC	5-hidroximetil-citozin
AC	akonitáz / akonitát-hidratáz
ADP	adenozin-difoszfát
ASK1	apoptózis szignált szabályozó kináz 1
ATP	adenozin-trifoszfát
bHLH	bázikus hélix-hurok-hélix domén
BWA	Burrows-Wheeler Alignment
CII	II-es komplex
CII _{low}	alternatív összetételű II-es komplex
cADC	cisz-akonitát-dekarboxiláz
CoA	koenzim A
EGLN	alfa-ketoglutarát dependens dioxigenáz
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
FADH ₂	redukált flavin-adenin-dinukleotid
Fe-S	Vas-szulfát csoport
FH	fumarát-hidratáz
GABA	gamma-amino-vajsav
GAD	glutamát-dekarboxiláz
GAP	GTPáz aktiváló fehérje
GDH	glutamát-dehidrogenáz
GDP	guanozin-difoszfát

GLS	glutamát-szintetáz
GOT2	glutamát-oxálacetát transzamináz / aszpartát aminotranszferáz
GS	glutamin-szintetáz
GTP	guanozin-trifoszfát
HIF	hipoxia indukált faktor
IDH	izocitrát-dehidrogenáz
<i>Irg1</i>	immunreszponzív gén 1
ita	itakonát
KoA	koenzim A
LDH	laktát-dehidrogenáz
MAX	MYC-asszociált faktor X
MDH2	malát-dehidrogenáz 2
MGTK	metilglutakonáz
mtDNS	mitokondrális DNS
NAD	nikotin-adenin-dinukleotid
NADH	redukált nikotin-adenin-dinukleotid
NF1	neurofibromin 1
NFW	nukleázmentes víz
NGS	next generations sequencing, újgenerációs szekvenálás
ODD	oxigéndependens degradáció
PC	piruvát-karboxiláz
PBS	Phosphate buffered saline-Foszfát pufferoldat
PGL	paraganglióma

PHD	prolil-hidroxiláz / alfa-ketoglutarát dependens dioxigenáz
Phaeo	phaeochromocytóma
ROS	reaktív oxigéngyök
SDH	szukcinát-dehidrogenáz
SDHA	szukcinát-dehidrogenáz A alegysége
SDHAF1	szukcinát-dehidrogenáz komplex 1-es összeszerelődési faktor
SDHAF2	szukcinát-dehidrogenáz komplex 2-es összeszerelődési faktor
SDHAF3	szukcinát-dehidrogenáz komplex 3-as összeszerelődési faktor
SDHAF4	szukcinát-dehidrogenáz komplex 4-es összeszerelődési faktor
SDHB	szukcinát-dehidrogenáz B alegysége
SDHC	szukcinát-dehidrogenáz C alegysége
SDHD	szukcinát-dehidrogenáz D alegysége
SLP	szubsztrátszintű foszforiláció
STK	szukcinát-tiokináz / szukcinát-CoA-ligáz
TMEM127	transzmembrán fehérje 127
Q	ubikinon
QH ₂	ubikinol
UCP2	uncoupling protein 2, szétkapcsoló fehérje 2
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
VHL	von Hippel-Lindau transzkripciós faktor
VUS	variant of uncertain significance/ismeretlen jelentőségű variáns

1. Bevezetés

1.1 Örökletes endokrin tumorszindrómák és a Multiplex endokrin neoplázia 2-es típusa (MEN2)

Az endokrin tumorszindrómák közé többségében olyan ritka megbetegedések tartoznak, melyekben különböző endokrin szervek daganatai egyszerre fordulnak elő ugyanabban a betegben. A megbetegedések lehetnek sporadikusak illetve örökletesek. Az örökletes tumorszindrómák esetében a genetikai konzultáció kiemelt jelentőségű a korai diagnózis és a helyesen választott daganatterápia indikációja miatt. Az endokrin rendszer daganatai külön figyelmet érdemelnek olyan értelemben, hogy több esetben a tumorok a hormonok elválasztása miatt speciálisabb terápiát igényelnek. A prototípusa ezeknek a betegségeknek a multiplex endokrin neopláziák (MEN) 1-es és 2-es típusa, de rajtuk kívül több más szindróma részjelenségeként is megjelenhetnek endokrin manifesztációk [1].

Az örökletes endokrin tumorszindrómák döntő többsége tumorszuppresszor gének mutációjához kötött. A patogenezisük a klasszikus Knudson modellt követi, miszerint az érintett allél pár egyik tagja csírasejtes mutációt hordoz, azonban a daganat kialakulásához a másik allél szomatikus mutációja vagy elvesztése is szükséges. Ezt a jelenséget nevezzük a heterozigótáság elvesztésének. A tumorszuppresszor gének mutációi inaktiváló hatásúak, így a tumorszuppresszor fehérjék nem tudják kifejteni daganatgátló hatásukat [1].

Ezzel ellentétben a MEN2 szindróma kialakulása a *RET* protoonkogén aktiváló jellegű mutációihoz kötött. Amíg a tumorszuppresszor gének mutációi komoly következményekkel járnak a gén funkcióját tekintve (nonszensz vagy kereteltolódással járó mutációk, inzerciók, deléciók stb.), addig a protoonkogének aktiváló mutációi általában pontmutációk, melyek aminosavcserét eredményeznek a kódolt fehérjékben és funkcionyerést okoznak [1].

A klasszikus autoszomális domináns öröklésmentet mutató tumorszindrómák közül a multiplex endokrin neoplázia 2-es típusa (MEN2) az egyik legjobban tanulmányozott

megbetegedés. A betegséget a *RET* gén mutációja okozza. A MEN2 szindróma a medulláris pajzsmirigy karcinóma (medullary thyroid carcinoma, MTC), phaeochromocytóma (Phaeo) és hiperparatireózis (HPT) képében jelentkezhet. Több nemzetközi tanulmány segítségével részletes genotípus-fenotípus összefüggéseket ismerünk [2, 3], illetve a genetikai konzultáció akár kodon-specifikus is lehet az érintett betegek és családtagjaik esetében [4]. Mindazonáltal a mutációk penetranciája akár családon belül is eltérhet [4]. A fenotípus változatos megjelenése más genetikai variánsokhoz, környezeti faktorokhoz és epigenetikai eltérésekhez is köthető [5-8].

1.2 Phaeochromocytómák és paragangliómák

1.2.1 Phaeochromocytómákról és paragangliómákról általánosságban

A phaeochromocytómák és paragangliómák (Phaeo/PGL) ritka neuroendokrin tumorok, melyek a mellékvesevelő szimpatikus idegrendszerből származó kromaffin sejteiből (phaeochromocytóma), illetve az extraadrenális, mellkasi és hasi paraganglionokból (paraganglióma) fejlődhetnek. Ezen daganatok katekolaminok (adrenalin, noradrenalin) szintézisére is képesek, amelyek a jellegzetes klinikai tünetegyüttest okoznak. A mellkasi és hasi paraganglionokból kiinduló tumorok mellett a fej és a nyak ganglionjaiból is kialakulhat daganat, ám ezek általában nem képesek katekolaminok szekréciójára, így klinikai felismerésük gyakran nehéz [9]. Ezen daganatok éves incidenciája 8 beteg/1 millió főre tehető, ezen belül a katekolamin termelő tumorok aránya a magasvérnyomásos felnőtt populáció 0,2%-át teheti ki [10-12]. A phaeochromocytómák és a paragangliómák alapvetően jóindulatú daganatok, azonban mihamarabbi felismerésük és kezelésük a katekolamin szekréció okozta magas kardiovaszkuláris morbiditás és mortalitás miatt kiemelten fontos.

A betegség mortalitásának tekintetében kiemelkedő fontosságú, hogy a phaeochromocytómák 2-36%-a, a paragangliómák 3-58%-a rosszindulatú [13-16]. A rosszindulatú daganatok 5 éves mortalitása rossz, egyes tanulmányok 50%-ra teszik a túlélést [17]. A malignitás megállapítása a mai napig csak a nem kromaffin szövetekbe

történő betörés és/vagy távoli daganatos áttétek esetén mondható ki. Specifikus szövettani vagy egyéb diagnosztikus módszer az intenzív kutatások ellenére sem áll rendelkezésre. Ezen felül a specifikus terápia hiánya és az ebből következő rossz mortalitási mutatók miatt a malignus phaeochromocytómák és paragangliómák jelentős szakmai kihívást jelentenek [16, 17].

1.2.2 Genetikai háttér

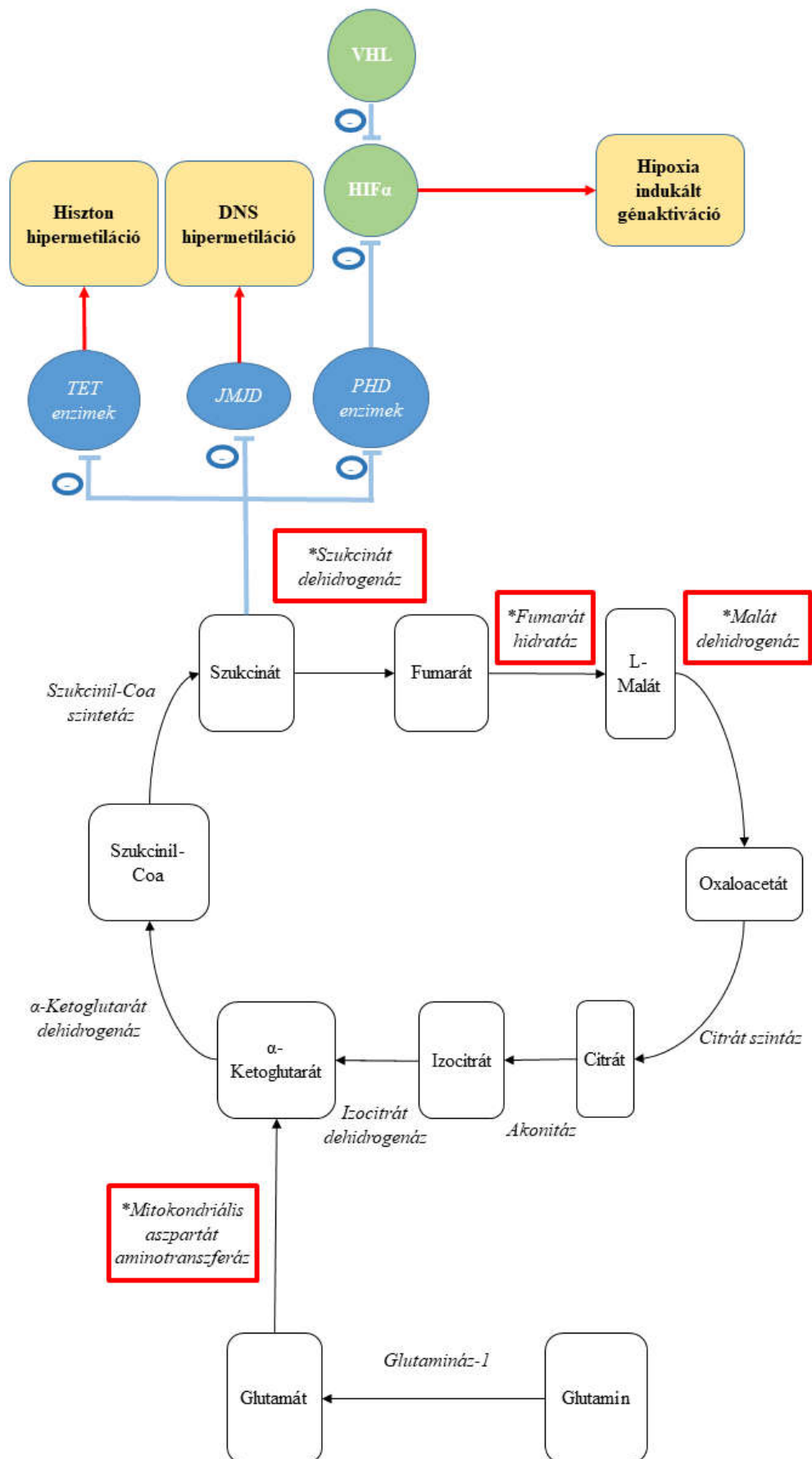
Phaeochromocytómák és paragangliómák örökölhetőséget tekintve a legmagasabb aránnyal rendelkeznek az emberi daganatos megbetegedések között: a betegek 40%-ában fedezhető fel csírarsejtes mutáció a jelenleg ismert 18 hajlamosító gén: *NF1*, *RET*, *MAX*, *TMEM127*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *GOT2*, *FH*, *MDH2*, *PHD2*, *VHL*, *HIF2A*, *KIF1B*, *SLC25A11*, *BAP1* [18-28] egyikében. Mindezekon felül, szomatikus mutáció az esetek 30-40%-ban igazolható [29]. Több esetben ezek a daganatok más tumorszindróma részjelenségeként jelentkeznek, mely jellegzetes fenotípusos megjelenés esetén a diagnózist jelentősen megkönnyíthetik. Ezen szindrómák közé tartozik az 1-es típusú neurofibromatózis (*NF1* mutáció esetén), MEN2 szindróma (*RET* mutációja esetén), von Hippel-Lindau szindróma (*VHL* mutációval asszociáltan), familiáris phaeochromocytóma szindrómák (*TMEM127* és *MAX* mutáció esetén), az örökletes paraganglióma szindrómák (az *SDHx* csoport valamely tagjának [*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2* mutációja esetén), policitémia paraganglióma szindróma (*HIF2A* mutációkor), illetve Reed szindróma (*FH* mutáció esetén). A phaeochromocytómák és paragangliómák változatos klinikai megjelenésük miatt az egyértelmű fenotípusos jelleg hiánya esetén a betegséget okozó génre az esetek többségében következtetni nehezen lehet [30]. A betegség genetikai hátterének pontos ismerete (legyen az csírarsejtes vagy szomatikus mutáció, vagy esetenként mozaicizmus) hatalmas jelentőséggel bír az optimális beteggondozás tekintetében. Ennek a legfontosabb sarokkövei a beteg családtagjainak genetikai szűrése, a megfelelő képalkotó vizsgálat alkalmazása, a prognózis pontos ismerete és malignus daganatok esetén a sebészi eltávolításon felüli terápia kiválasztása [17, 29, 31-33].

1.2.3 Molekuláris patogenezis

A phaeochromocytómák és paragangliómák a transzkripciós profiljuk és a fő molekuláris útvonalaiuk alapján két csoportba, úgynevezett „klaszterekbe” sorolhatóak [34].

1.2.3.1 Klaszter 1, avagy pszeudohipoxiához társult tumorok

Az ebbe a csoportba sorolható tumorok közös jellemzője a hipoxia indukált faktorok (HIF) aktivációja nem oxigénszegény körülmények között. Ezen faktorok aktivációja oxigéndús körülmények között ún. pszeudohipoxiás állapotot idéz elő. Génexpresszió szintjén ez a hipoxia során aktiválódó gének (pl. *VEGFR*, *PDGF*, *LDH*, *GLUT1*) konstitutív aktivációját jelenti, szöveti oxigén szinttől függetlenül. Ez a mechanizmus az irodalomban eddig a *VHL*, *SDHx* (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*), *FH* és *HIF2A* gének mutációjának következtében került leírásra. A *VHL* gén által kódolt fehérje egy ubikvitin komplex részét képezi, mely a HIF-1 proteoszóma-mediált lebontásában játszik szerepet. A gén mutációja esetén a fehérje funkciója sérül, így a HIF-1 lebontása is gátlódik [35]. *EPAS1* (más néven *HIF2A*) szintén a HIF lebontásának gátlásán keresztül idézi elő a pszeudohipoxiát. Az *SDHx* és az *FH* mutációi a szukcinát illetve a fumarát akkumulációjához vezetnek. A szukcinát molekuláris szerkezetét tekintve nagyban hasonlít az alfa-ketoglutaráthoz, így bizonyos enzimek esetén egymás kompetitív inhibitoraiként viselkednek. Ilyenek pl. az alfa-ketoglutarát dependens dioxigenázok, melyek a HIF1 α lebontásáért felelnek. További jellegzetes epigenetikai változásokat, DNS és hiszton hipermetilációt okoznak a Jumonji hiszton demetilázok (JMJ) és a TET DNS hidroxilázok gátlása révén ezekben a tumorokban [36, 37]. (1. Ábra.)



1. Ábra. Klaszter 1 mutációk patomechanizmusa.

A von Hippel-Lindau (VHL), a szukcinát-dehidrogenáz (SDH), a hipoxia indukált faktor 2A (HIF2A), a prolil-hidroxiláz-2 (PHD2), illetve a fumarát-hidratáz (FH) génjeiben fellépő mutációk phaeochromocytómához vagy paragangliómához vezethetnek a HIF fokozott aktivációján keresztül. A HIF1 α és a HIF2 α alegységek a HIF1 β -val történő heterodimerizáció után az angiogenezisben, metabolizmusban és sejtnövekedésben szerepet játszó gének aktivációját fokozzák. Az enzimek, melyek génjeinek mutációja az enzim csökkent működéséhez vezet, késsel, míg azok, melyek génmutációja fokozott aktivációhoz vezet, narancssárgával vannak feltüntetve. A HIF α a HIF1 α -t és a HIF2 α -t egyaránt jelenti, de csak a *HIF2A* gén mutációját írták le eddig Pheo/PGL esetében. A PHD alatt egyaránt értjük a PHD1, PHD2 és PHD3 enzimeket, ezek közül eddig a *PHD2* mutációját mutatták ki Pheo/PGL-ban.

1.2.3.2 Klaszter 2, avagy a fokozott kináz jelátvitellel jellemezhető tumorok

A másik nagy csoportot a tirozin-kináz receptorokban, illetve az ezeket érintő jelátviteli útvonalakban (mTOR, MYC) részt vevő faktorokban jelentkező mutációk alkotják. (2. Ábra) Ez a klaszter a *RET*, *NFI*, *MAX*, és *TMEM127* mutációt hordozó phaeochromocytómákat és paragangliómákat foglalja magában.

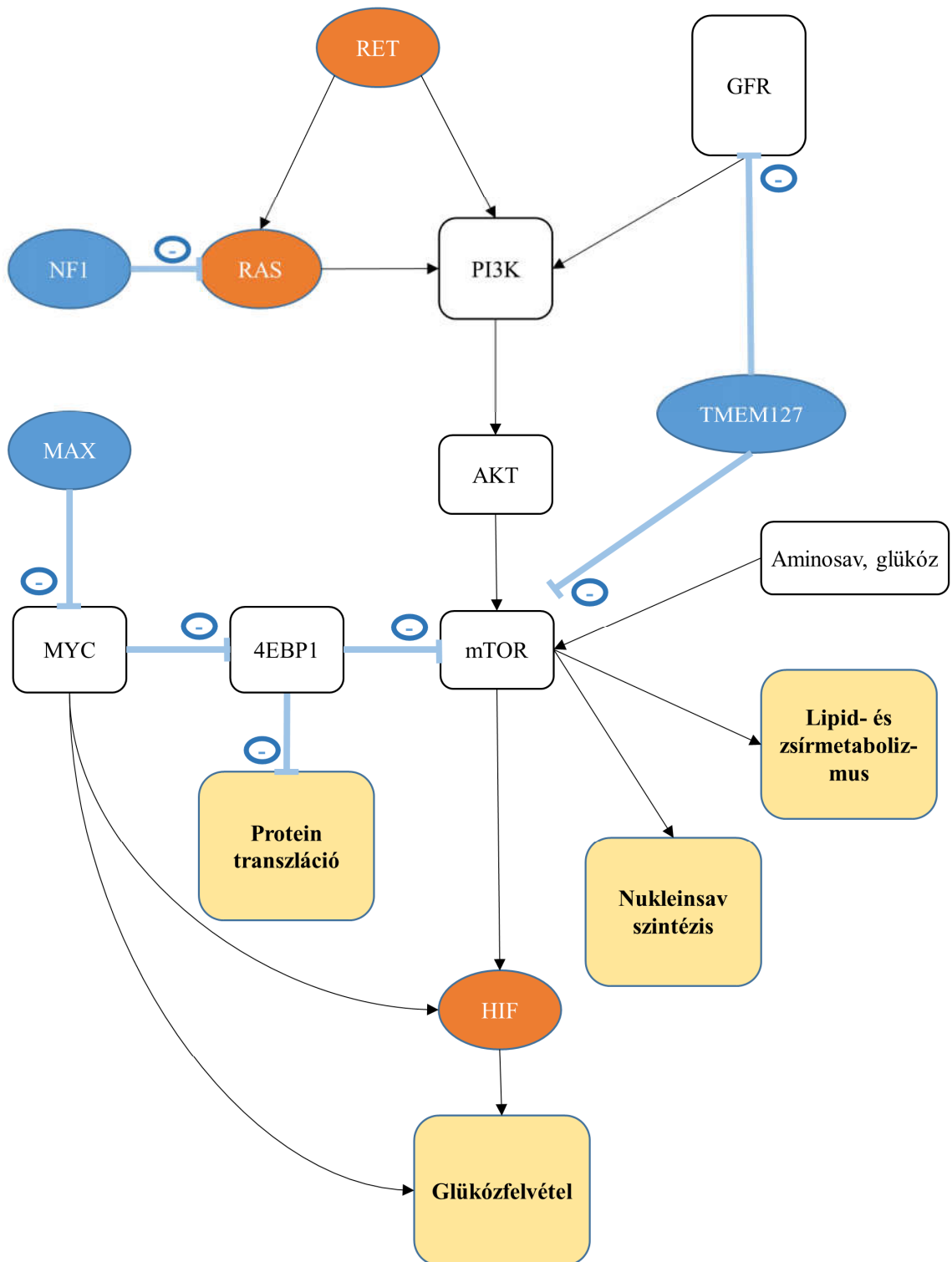
MEN2A szindrómához társuló *RET* mutációk a receptor ligand-független homodimerizációját okozzák, aminek következtében a PI3-AKT, RAS, p38 MAPK, illetve a JUN N-terminális kináz útvonalai aktiválódnak. MEN2B szindrómához vezető *RET* mutációk esetén a kináz szubsztrátspecificitása vesz el [38, 39].

Az *NFI* gén által kódolt neurofibromin tumorszuppresszor szerepet tölt be egy GTPáz aktiváló fehérje (GAP), és a RAS inaktivációja révén. A RAS humán malignus folyamatokban egy jól ismert onkogén faktor, melynek konstitutív aktivációja phaeochromocytóma és paraganglióma kialakulásához vezethet [40, 41].

A *MAX* egy bázikus hélix-hurok-hélix (bHLH) leucin-cipzár domént tartalmazó transzkripciós faktort kódol. A MAX fehérje a MYC transzkripciós faktorialkothat komplexet; utóbbi fehérje egy jól ismert onkogén számos humán daganat esetében [42]. A legtöbb, *MAX* génben fellépő mutáció főként a bHLH régiót érinti, így a MAX más fehérjékhez való kötődését gátolja meg, mely feltehetőleg a MYC célgénjeinek fokozott

transzkripcióját is okozza. A MYC-MAX komplex a gének promoter régióinak E-box szekvenciájához kötve több mint 1000 gén transzkripcióját befolyásolja. A MAX a MYC faktoron felül az MXD1, MNT és MGA transzkripciós faktorcsalád tagjaival is komplexet képezhet [43].

A *TMEM127* mutációja valószínűleg az mTOR csökkent foszforilációját és következményes aktivációját okozva idéz elő phaeochromocytómát [44].



2. Ábra. Klaszter 2 mutációk patomechanizmusa.

A *RET*, neurofibromin 1 (*NF1*), transzmembrán protein 127 (*TMEM127*), MYC-asszociált faktor X (*MAX*), és a *HRAS* mutációiról kimutatták, hogy növekedést

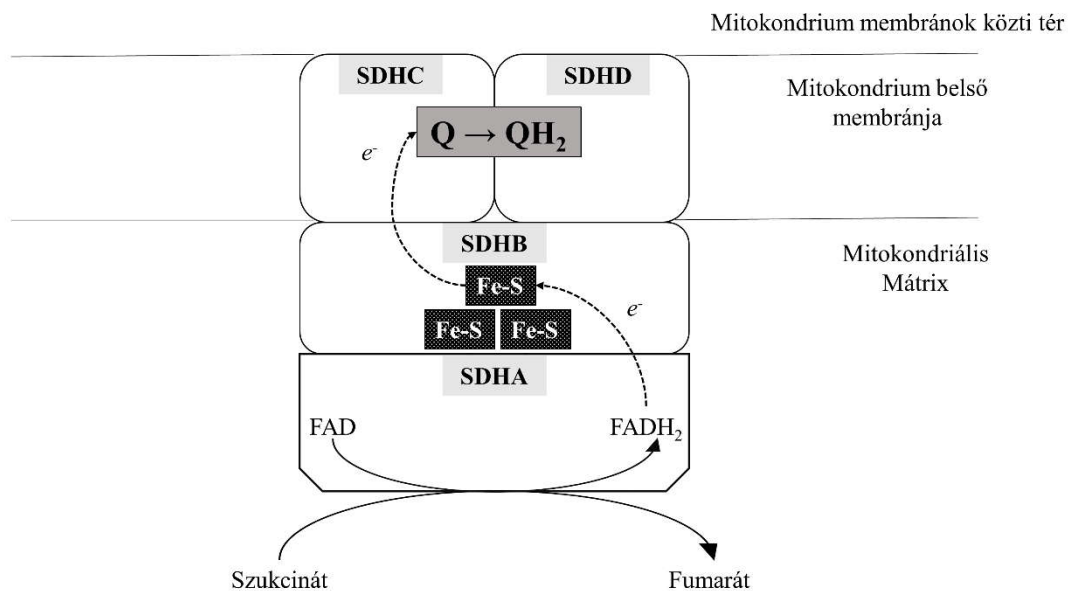
indukáló folyamatokat indítanak el a tirozin-kináz receptorokon és azok útvonalain, az mTOR-on és a MYC faktoron keresztül. A RET és egyéb növekedési faktor receptor (GFR) aktivációja a RAS és a PI3-AKT útvonalakon keresztül az mTOR aktiválódásához vezet. Az aktivált mTOR a sejtnövekedést befolyásolja makromolekulák szintéziséen keresztül – protein [a 4EBP1 (eukarióta transzlációs iniciációs faktor 4E kötő fehérje 1) gátlásával], nukleinsav, lipid, valamint zsírsavak szintéziséet, illetve a glükóz felvételét fokozza. Egyes tumorokban a MYC az mTOR-ral együttműködve fokozza a proteinek transzlációját a 4EBP1 gátlásával, illetve a HIF-en keresztül a glükózfelvételt növeli. Ezeket az útvonalakat több faktor szabályozza: az NF1 gátolja a RAS faktort; a MAX gátolja a MYC-et; a TMEM127 az mTOR-t képes gátolni. Az enzimek, melyek génjeinek mutációja az enzim csökkent működéshez vezet, kékekkel, míg azok, melyek génmutációja fokozott aktivációhoz vezet, narancssárgával vannak feltüntetve.

1.3 Szukcinát-dehidrogenáz

A mitokondrium belső membránjában elhelyezkedő, a citromsav ciklus tagját képező szukcinát-dehidrogenáz (SDH) enzim a szukcinát fumaráttá történő átalakításáért felel, valamint az oxidatív foszforiláció II-es komplexeként elektronszállító szerepet is betölt. A citrát-ciklus kémiai reakciók sorozatából épül fel, melyek a sejt aerob energiahomeosztáziséában vesznek részt. A Szent-Györgyi-Krebs-ciklusként is ismert reakciósorozat minden lépése a mitokondriális mátrixban játszódik le. A reakció során a sejt szénhidrát-, zsír-, aminosav- és fehérje-anyagcseretermékeket használ, hogy az acetil-koenzim A-t (acetil-CoA) oxidálja. Az acetil-CoA fő forrása a glikolízis, de származhat zsírsavak oxidálásából is. A ciklus végén egy molekula acetil-CoA oxidálásával négy molekula ATP, tíz molekula NADH, és két molekula FADH₂ keletkezik, majd a NADH és FADH₂ által szállított elektronok az oxidatív foszforiláció során molekuláris oxigénre kerülnek. Az SDH enzimet Szent-Györgyi Albert írta le elsőként 1937-ben.

1.3.1 A szukcinát-dehidrogenáz felépítése

Az SDH enzimkomplex alegységeit az *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF1* és *SDHAF2* génszakaszok kódolják (továbbá ismert *SDHAF3* és *SDHAF4* is, de ezek funkciója még nem tisztázott [45]) (3. Ábra). A fenti gének által kódolt SDHA és SDHB alegységek képezik az enzim hidrophil alegységeit. Az SDHA egy flavin adenin dinukleotid (FAD) prosztetikus csoportot tartalmazó flavoprotein, flavinációját az SDHAF2 faktor végzi, mely nélkülözhetetlen az SDH összeállításához. A vas-szulfur proteinnek is nevezett SDHB egy 2Fe:2S, 4Fe:4S és 3Fe:4S vas-szulfát (Fe-S) centrumokat tartalmazó fehérje. A másik két, hidrofób alegység, az SDHC (amely citokróm b560 fehérjeként is ismert) és az SDHD horgonyozzák ki az SDHA és SDHB alegységeket a mitokondriális membránhoz. Az SDHC és az SDHD a membránba ágyazott domének, transzmembrán héliceik között hem-B csoporttal. Az SDHA alegység a szukcinát fumaráttá történő oxidációjáért, és egy időben a FAD FADH₂-vé való alakításáért felelős. A FADH₂ az elektronokat az SDHB alegység vas-szulfát centrumára szállítja. A CoQ és a hem-B csoport részletei és katalitikus funkciói még nem teljesen ismertek [46].



3. Ábra. A szukcinát dehidrogenáz felépítése. Az SDHA alegységhez kovalensen kötődik a flavin adenin dinukleotid (FAD) kofaktor, illetve itt található a katalitikus

egység, ami fumaráttá oxidálja a szukcinátot. A reakció során az enzimhez kovalensen kötött FAD redukálódik és a FADH_2 keletkezik. A FADH_2 továbbiakban ismét visszaoxidálódik FAD-dá és az így keletkezett nagyenergiájú elektronok az SDHB alegység Fe-S klasztereire kerülnek. A reakció során felszabaduló hidrogén a mitokondriális mátrixban, míg a FAD az SDHA alegységhez kötve marad. Az összesen 3 db Fe-S klaszter lineáris elektrontranszportláncot alkotva juttatják el az elektronokat a kinol-kötő doménhez, amely az SDHB, SDHC és SDHD alegységek által körülhatárolt térségben helyezkedik el. Itt történik az ubikinon (Q) redukciója ubikinollá (QH_2). e^- : elektron

1.3.2 A szukcinát-dehidrogenáz működése

Az SDH az oxidatív foszforiláció elektrontranszportlánc rendszerének tagja, így a sejtek fő energiaforrásként szolgáló rendszer részét alkotja. Az SDH enzimkomplex különlegessége, hogy ez az egyetlen komplex az oxidatív foszforilációban, melyet nem a mitokondriális DNS-ben kódolt polipeptidek építenek fel. A szukcinát-dehidrogenáz a citromsavciklus során a szukcinát fumaráttá történő oxidálását végzi, mellyel egy időben az ubikinon (Q) ubikinollá (QH_2) való redukálására is sor kerül. Egyedülálló módon tehát az SDH mind a citromsavciklusban, illetve az oxidatív foszforilációban is részt vesz.

A szukcinát fumaráttá történő oxidizációja során a FAD redukálódik, így FADH_2 képződik. A keletkezett fumarát későbbiekben a citrát-ciklusban hasznosul tovább (lásd a későbbiekben). A keletkezett FADH_2 oxidálódik és az így felszabadult nagyenergiájú elektronok az SDHB alegységen keresztül az SDHB, SDHC és SDHD alegységek által körülhatárolt kinol-kötő doménhez kerülnek. Itt ezen elektronok segítségével az ubikinon redukálódik ubikinollá, mely az oxidatív foszforilációban játszik további szerepet [47].

Az oxidatív foszforiláció a mitokondriumok belső membránján zajlik, az öt komplexből felépülő kaszkád által (I-V. komplex). Az SDH a II. komplexet alkotja a reakciósorból. Ismételten az enzim különlegességét mutatja, hogy az SDH az egyetlen olyan tagja a

légzési láncnak, mely nem rendelkezik protonpumpa aktivitással. Az elektronok áramlása a NADH-ról és FADH₂-ről a fehérjekomplexeken keresztül a mitokondrium intermembrán terébe történő protonok pumpálásával társított, amely transzmembrán potenciált hoz létre. Ezt használja fel az V. komplex, hogy ATP-t állítson elő ADP-ből és egy foszfát-csoportból [48]. Szukcinátra vonatkoztatva a maximális P/O hányados (azon ATP molekulák száma, mely az atomos oxigén 2 elektronnal történő, vízzé való redukciójához szükséges) 1.7, amely kevesebb, mint a NAD⁺-asszociált szubsztrátokra számítva, ami 2.7 [46].

1.4 A citrát-ciklusbeli enzimek mutációinak hatása Phaeo/PGL-ban

Az új évezredben a citromsavciklus a figyelem középpontjába került, mivel több, a ciklust alkotó enzim esetében beigazolódott, hogy mutációja Phaeo/PGL kialakulásához vezethet. Nevezetesen a szukcinát-dehidrogenáz alegységek (SDHx), a fumarát-hidratáz (FH), illetve a malát-dehidrogenáz 2 (MDH2) enzimek csírasejtes mutációi esetében írtak le örökletes Phaeo/PGL kórképeket [20-23, 49-51]. A fentieken túl az izocitrát-dehidrogenáz (IDH) szomatikus mutációját is megfigyelték phaeochromocytómák és paragangliómák vizsgálatakor [52]. Mitokondriális enzimek közül továbbá az aszpartát-aminotranszferáz enzimet kódoló *GOT2* gén csírasejtes mutációjához is társult phaeochromocytóma [25]. Az egyik legszélesebb körben elfogadott magyarázat a tumorok megjelenésére az, hogy a Szent-Györgyi-Krebs-ciklus enzimjeinek defektusa esetén az intracelluláris metabolitok felhalmozódnak, ami rosszindulatú daganat kialakulásának kedvez. Ezen tulajdonsággal rendelkező anyagcsere termékeket az irodalom összefoglaló néven „onkometabolitoknak” nevezi.

1.4.1 Onkometabolitok

Azon anyagcseretermékeket értjük az onkometabolit kifejezés alatt, melyeknek patológiás felhalmozódása megváltoztatja a sejt élettani működését és ezzel potenciálisan malignus transzformációhoz is hozzájárulnak. Ezen anyagcseretermékek megnövekedett koncentrációi általában bizonyos enzimeket kódoló gének funkcióvesztéssel (ún. „loss of function”, pl. L-2-hidroxi-glutarát, szukcinát, fumarát

esetén) illetve funkciónyeréssel (ún. „gain-of-function”, pl. D-2-hidroxioglutarát esetén) járó mutációinak következményei [53]. Az onkometabolitok megnövekedett koncentrációja a sejtekben onkogén útvonalak aktivációjához és kritikus epigenetikai módosításokhoz vezet.

Onkometabolitként tartják számon a D-2-hidroxioglutarátot, az L-2- hidroxioglutarátot, a szukcinátot illetve a fumarátot. Ezek a metabolitok a fiziológiástól eltérő koncentrációikban más útvonalak homeosztázisára is befolyással vannak szerkezeti hasonlóságuk, illetve a metabolizmusban betöltött hasonló szerepük miatt [54].

Az onkometabolitok iránti fokozott érdeklődés miatt az elmúlt években egyre több, a metabolizmusra hatást gyakorló gének mutációja került felfedezésre. A citrátkör enzimjeinek, így a fumarát-hidratáz (FH) és a szukcinát-dehidrogenáz (SDH) génjeiben bekövetkező loss-of-function (csökkent enzimaktivitást eredményező) mutációk a fumarát illetve a szukcinát felhalmozódását okozzák, míg az izocitrát-dehidrogenáz (IDH) gain-of-function (fokozott enzimaktivitást eredményező) mutációi a D-2-hidroxioglutarát koncentrációját emelik. Ezért többek között az *SDHx* géneket is tumorszuppresszor génekként tartjuk számon.

1.4.2 Az *SDHx* mutációkhoz társuló kórélettan

A tumorszuppresszorként számon tartott SDH [19] alegységeit kódoló gének csírasejtes mutációit (*SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*), valamint az *SDHAF2* faktornak csírasejtes mutációját is kimutatták már pheochromocytómás és paragangliómás betegekben. Ezen daganatok mellett a fenti alegységek mutációihoz vesesejtes rákot [55], gasztrointesztinális stromalis tumort [56] valamint gyomor karcinómát [57] is társítottak már. A mutációk következtében csökkent, vagy teljesen hiányos SDH aktivitás miatt felhalmozódó szukcinát szerepét in vivo és in vitro kísérletek is igazolták [58].

A szukcinát közvetett módon hatással van a HIF α -alegységek poszttranszlációs módosításával a HIF (hipoxia indukált faktor) stabilitására. A HIF α -alegységek stabilitása specifikus prolin aminosavak hidroxilációjától függ. Fiziológiás körülmények között (normoxiában) a HIF α -alegységek termelődése folyamatos, majd hidroxiláció következtében lebomlanak. Ez a folyamat állandó elérhetőséget, ám gyenge egyensúlyi állapotot biztosít. A hidroxilációt a dioxigenázok csoportjába tartozó prolin-hidroxilázok

(PHD1, PHD2 és PHD3, más néven EGLN1, EGLN2, és EGLN3) végzik a HIF α alegységek oxigéndependens degradáció (ODD) doménjében található prolin aminosavakon [59]. A prolin-hidroxilázok aktivitását oxigén, vas, aszkorbát és alfa-ketoglutarát tudja befolyásolni. A PHD ezimek a hidroxilációhoz molekuláris oxigént és alfa-ketoglutarátot használnak fel, a folyamat végterméke pedig szukcinát és széndioxid [60]. A prolinok hidroxilációja a von Hippel-Lindau (VHL) fehérje számára képeznek kötőhelyeket.

Habár oxigénfüggő az aktivitásuk, az alacsony oxigén iránti affinitásuk jó oxigénszenzorrá teszi a PHD enzimeket [61]. Hipoxia esetén a HIF α proteinek hidroxilációja nem történik meg, a VHL fehérje nem tud kötődni így stabilizálódik a HIF. [59]. Ezt a kóros stabilizációt normoxiás körülmények között pszeudohipoxiának nevezi az irodalom. Az SDH enzim defektusai esetében a patomechanizmus a szukcinát felhalmozódásához köthető: a szukcinát az alfa-ketoglutaráthoz való hasonlósága miatt kompetitíven gátolja a PHD enzimeket így alakítva ki pszeudohipoxiát [62].

A szukcinát megemelkedett szintje azonban az alfa-ketoglutaráthoz hasonló szerkezete miatt több más, alfa-ketoglutarát-dependens enzim működését is befolyásolja. Ide tartoznak a hiszton-demetilázok inaktivációja (JMJ demetilázok és TET hidroxilázok), melynek következménye a hisztonok hipermetilációja. Ezek a változások korábbi kutatások során alfa-ketoglutarát pótlásával visszafordíthatóak voltak.

A szukcinát-dehidrogenáz enzim alegységeit kódoló génekben előforduló mutációkkal összefüggő klinikai jellegzetességeket az 1. Táblázat foglalja össze [34, 46]. Klinikailag az *SDHB* génben fellépő mutációknak van a legnagyobb jelentősége, mivel mutáció jelenléte erősen megnöveli a metasztatikus abdominális paraganglióma kialakulásának valószínűségét.

1. Táblázat. Az SDHx gének mutációi és a betegség fenotípusának összefüggései.

Phaeo: pheochromocytóma; PGL: paraganglióma

Gén neve	A tumor domináns elhelyezkedése	Tumor szám	Pozitív családi anamnézis rizikója	Malignitás rizikó	A kódoló régiót érintő mutációk	
					Missense/nonsense	Deléció/inzerció
<i>SDHA</i>	PGL	Általában egy	Alacsony	?*	29	0
<i>SDHB</i>	PGL > Phaeo	Multiplex	Alacsony	Magas	212	82
<i>SDHC</i>	PGL	Multiplex	Alacsony	Alacsony	26	5
<i>SDHD</i>	PGL > Phaeo	Multiplex	Magas	Alacsony	164	71
<i>SDHA</i> <i>F2</i>	PGL	Multiplex	Magas	?*	4	1

* Az adat az eddig előforduló kis elemszám miatt nem meghatározható.

1.4.3 A szukcinát akkumuláció további következményei

A szukcinát emelkedett szintje epigenetikai változásokat is okoz: a daganatsejtekben, DNS és hiszton hipermetiláció figyelhető meg [37]. A DNS-metiláció a genom stabilitásában játszik szerepet, illetve génexpresszió szabályozásának egyik kiemelt szereplője [63]. A szukcinátszint emelkedés azonban valószínűleg sejt specifikus következményekkel jár: a szukcinát akkumulációval összefüggésben HepG2 sejtvonalon a sejtek emelkedett apoptózisát és csökkent életképességét írták le – nagy

valószínűséggel a kaszpáz-3 vagy a kaszpáz-7 apoptotikus útvonal aktiválódása következtében [64].

1.4.4 A glutamin/glutamát metabolizmus szerepe

Régóta ismert, hogy a daganatok képesek alkalmazkodni a megváltozott metabolikus környezetükhöz [65]. A glutamin az egyik fő szénatom forrása a nukleotidok és a nem esszenciális aminosavak bioszintézisének [66], és a metabolizmusa a sejtek proliferációját segíti NADPH előállításán keresztül [67]. A glutamin-függő oxidatív foszforiláció a sejtek egyik fontos energiaforrása [68], ennek segítségével a sejtek képesek a citromsavciklus metabolitjainak előállítására/feltöltésére. Mindezen hatások mellett a glutaminolízis fontos szerepet játszik oxigénszegény körülmények között a tumorsejtek szubsztrátszintű foszforilációjában [69]. A glutamin a glutation bioszintézisének egyik prekursora, így a sejtek redox homeosztázisának fenntartásában [70-72] is kulcsszereplő.

A glutamin mitokondriumba való transzportjáért felelős glutamináz-1 (GLS-1) glutamátot állít elő glutaminból. A glutamát tovább metabolizálódhat a mitokondriumban α -ketoglutaráttá a glutamát-dehidrogenáz (GDH) által, majd beléphet a citromsavciklusba. A GLS-1 enzim emelkedett expressziója és a glutamin metabolizmus nélkülözhetetlensége több tumor esetében igazolódott [73-76]. Csökkent glutamátszinteket igazoltak *SDHx* mutáns tumorokban [77], valamint az *SDHB* mutációt is összefüggésbe hozták megnövekedett glutamin metabolizmussal [78]. Az *SDHB* deficiens sejtek emelkedett mértékű glutamin felvételt mutatnak. Ez a jelenség összefüggésben van az aszpartát a mitokondriumból a citoszólba történő megnövekedett transzportjával, mely a sejtek anabolizmusának támogatására szolgál [79].

1.5 SDH gátlószer

1.5.1 Itakonát

Az itakonát (2-metilén butándisav) egy, az emberi szervezet által is előállított telítetlen dikarboxilsav. Az itakonátot *in vivo* emlősökben eddig aktivált makrofágokban [80],

Mycobacterium tuberculosis-fertőzött tüdőben [81], Zika-vírus fertőzött idegsejtekben [82], vizeletben és szérumban [83], illetve glioblasztómákban [84] mutatták ki.

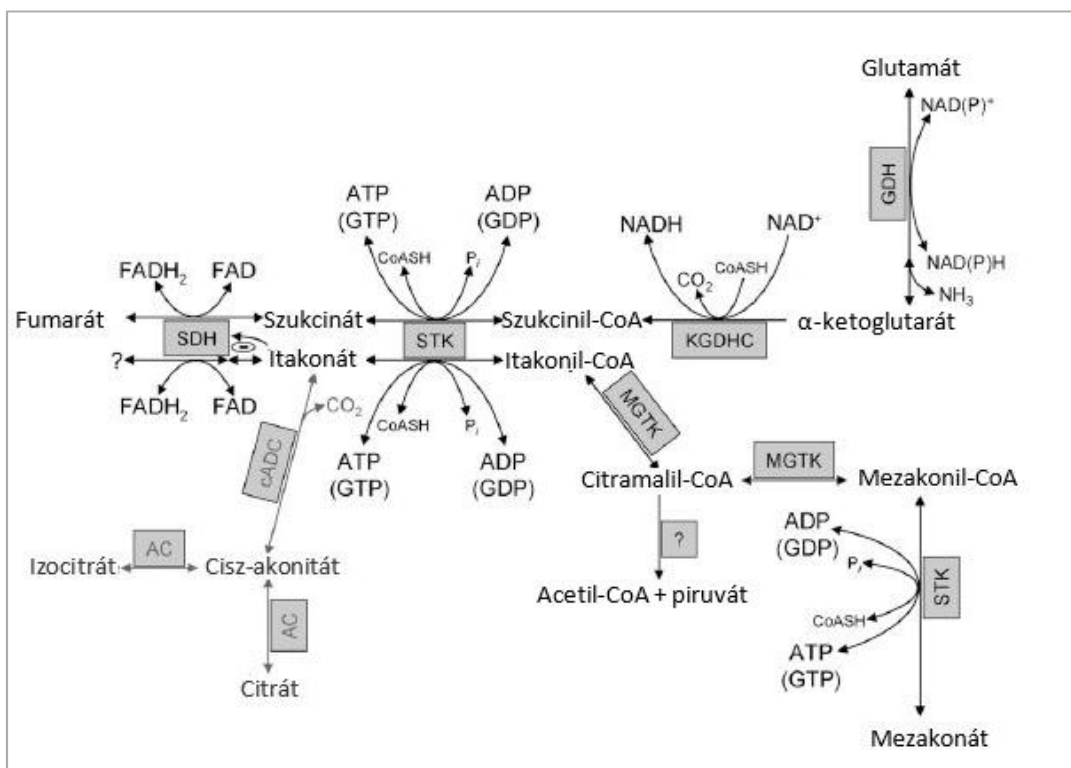
A humán és az egér makrofágok cisz-akonitátból állítják elő az itakonátot egy cisz-akonitát-dekarboxiláz aktivitást mutató enzimen keresztül, melyet az immunreszponzív gén kódol (*Irg1*, más néven *Acod1*) [85]. Az előállított itakonát a makrofágok antimikrobiális aktivitásához járul hozzá a glioxilát-ciklus egy kulcsenzimének, az izocitrát-liáznak gátlásával [86]. A glioxilát-ciklus a bakteriális zsírsav és acetát anyagcsere számára nélkülözhetetlen [87].

Iparilag az itakonátot cisz-akonitátból állítják elő az *Aspergillus terreus* *cadA* génje által kódolt extramitokondriális cisz-akonitát-dekarboxiláz enzim segítségével [88]. Származékainak a felhasználása számtalan területen ismert (fogászatban, szemészetben, gyógyszerészetben, valamint a benzilammóniummal komplexálva vízben oldódó felületi anyagok gyártására használják az élelmiszeriparban a baktérium fertőzés csökkentésére [89]), mégsem lép be a táplálékláncba mérhető mennyiségben. Ugyanakkor kisemlős kísérletek keretében kimutatták, hogy jelentős mértékben metabolizálja a szervezet orális adagolás esetén [90, 91]. A szakirodalomban nincs egységes megállapodás az exogén itakonát sejtbe történő felvételével kapcsolatban, kérdéses, hogy hatását a sejtbe történő felvétel után, vagy már sejten kívül, receptorok által szabályozva fejt ki.

Az azonban igazolt, hogy az exogén itakonát az SDH enzim gyenge kompetitív gátlószere [90-92]. A gátlás hátterében az itakonát α -szénatomja áll, ugyanis ez nem rendelkezik elég hidrogénnel a kettős kötés kialakításához. Így az itakonát átalakítása szükséges egy olyan formává, amelyet az SDH is tud metabolizálni. A szakirodalomban a legelfogadottabb elmélet szerint az itakonát metilszukcináttá (ez a legvalószínűbb, mivel a metilszukcinát a szukcinát-dehidrogenáz ismert szubsztrátja), illetve hidroxiláció révén hidroximetil-szukcináttá (legjobb tudomásunk szerint ezt még nem bizonyították) alakulhat, amelyeket már a szukcinát-dehidrogenáz is metabolizálhat [93, 94]. Dekarboxiláció vagy izomerizáció után azonban a keletkezett termékek nem lehetnek a szukcinát-dehidrogenáz szubsztrátjai.

Oxigénhiányos állapotban ATP és Mg^{2+} jelenlétében, [91] az itakonát a szukcinát-CoA-ligáz (más néven szukcinát-tiokináz, STK) enzim révén tioészterré alakul (itakonil-

CoA), majd az MGTK (metilglutakonáz) enzimén keresztül citramalil-CoA képződik belőle (4. Ábra) [95]. A keletkezett citramalil-CoA-ból mezakonil-CoA jön létre. Alternatívaként azonban acetil-CoA-vá és piruváttá alakulhat [91, 96]. A CoA csoport leválasztásáért az STK felelős mind a mezakonil-CoA és az itakonil-CoA esetében is. Mivel ATP hidrolízisével mennek végbe a szukcinát-CoA-ligáz által katalizált reakciók, így az itakonát, valamint az itakonából képződő metabolitok egyik legfontosabb tulajdonsága, hogy visszavetik a szubsztrátszintű foszforilációt (SLP). Következésképpen az itakonát a sejtet jelentős mennyiségű ATP-től illetve GTP-től fosztja meg [95].



4. Ábra. Az itakonát metabolizmusa. STK - szukcinát-tiokináz (szukcinát-CoA-ligáz); GDH - glutamát-dehidrogenáz; MGTK - metilglutakonáz; cADC - cisz-akonitát-dekarboxiláz; AC - akonitáz (akonitát hidratáz) [95].

1.5.2 Atpenin

Az Atpenin A5 (atpenin) egy SDH gátlószer. Az ubikinonhoz való szerkezeti hasonlósága miatt az atpenin a mitokondriális II-es komplex (azaz az SDH) ubikinon kötőhelyéhez kapcsolódik, így gátolva az elektrontranszferet az enzim és az ubikinon között. Az atpenin így mind a szubsztrát szintű foszforilációt, mind a szukcinát-fumarát átalakulást hatékonyan gátolja [97, 98]. Az atpeninnel történő SDH gátlás nem okoz oxigénhiányos állapotra jellegzetes változásokat a gének expressziójában [99].

1.6 Az újgenerációs szekvenálás jelentősége Phaeo/PGL betegek molekuláris genetikai diagnosztikájában

Az újgenerációs szekvenálás alatt azokat a nagy áteresztőképességű génszekvenálási módszereket értjük, amelyekkel párhuzamosan több (akár milliós nagyságrendű) mintát, vagy több gént (akár a teljes genomot) lehet egyidejűleg szekvenálni. Működésükhöz elengedhetetlen a speciális technikai, beleértve a számítógépes és informatikai háttér. Elterjedésük a molekuláris genetikai diagnosztikát és ezzel együtt az örökletes endokrinológiai szindrómák molekuláris genetikai diagnosztikáját is átalakította a mindennapi klinikai gyakorlatban. Előnyük mellett számos új kihívást is teremtettek ezek a módszerek: az NGS térhódítása számos technológiai fejlesztést, új szakismereteket és számos új munkafolyamatot vont maga után. A klinikai szakorvos munkája mellett laboratóriumi szakemberek, bioinformatikusok és molekuláris biológusok összehangolt munkavégzésére van szükség a klinikai gyakorlat számára elengedhetetlen molekuláris genetikai lelet helyes elkészítésében és értelmezésében. A vizsgálat megfelelő indikációja kulcsfontosságú, mivel technológiától függően már önmagában a keletkezett adatmennyiség feldolgozása egy munkaigényes folyamat, a beazonosított eltérések megfelelő, klinikai relevanciával bíró értelmezése pedig számos kihívással jár [100]. Az indikáció egyes tumoros megbetegedések esetén eltérhet, azonban a szakmai ajánlások kiemelik, hogy minden olyan tumoros megbetegedés esetén javasolt a genetikai vizsgálat, ahol az örökletes daganatok kialakulására több mint 10% esély van [101]. A hormonrendszer daganatai esetében különösképpen így

van, mivel még a sporadikus megjelenést mutató esetek között is magas a csírasejtes génelterések jelenléte [102]. Különösképpen igaz ez a phaeochromocytómák és paragangliómákra, mivel ezeknek a tumoroknak (jelen ismereteink szerint) 40%-a csírasejtes mutáció következményeképpen alakul ki [31]. A genetikai szűrést tovább nehezíti, hogy PhD munkám ideje alatt 27 gén szomatikus és csírasejtes mutációinak szerepét bizonyították phaeochromocytóma és paraganglióma patogenezisével kapcsolatban. Ezen gének között előfordulnak olyanok, amelyek csak csírasejtesen mutálódtak (pl. *RET*), olyanok, amelyek mind csírasejtes és szomatikus mutáció szintjén is érintettek illetve csak szomatikusan mutálódó gének is [103].

Az újgenerációs szekvenáló módszerek segítségével nem csak ritka betegségek gyakoribb diagnózisára számíthatunk, hanem génelterések együttes fennállásának felismerésére is. Egyesek ezek közül egyértelműen patogének, azonban több genetikai variáns esetén a kialakult fenotípus nem egyértelmű, lehet, ún. módosító hatással számolni, de ártalmatlan szekvenciavariánsok is beazonosításra kerülhetnek. Ezek interpretációja további kihívást jelent mind a diagnosztikai mind a klinikai gyakorlatban.

A megnövekedett igényekhez a genetikai diagnosztikai munka is alkalmazkodott: a korábbi egy eltérés-egy gén koncepciót napjainkra felváltotta a betegségre hajlamosító gének vagy a genom kódoló régióinak, esetleg teljes genomot célzó vizsgálatok alkalmazása. Így tehát a hagyományos szekvenálási módszerekkel kiegészítve az újgenerációs szekvenáló metódusok is a klinikai diagnosztika szerves részei lettek.

2. Táblázat: A phaeochromocytóma/paraganglióma kialakulásához társult gének listája. Lokalizáció tekintetében Phaeo-ról beszélünk, ha a daganat a mellékvesevelőből indul ki, míg PGL-ről a feji, nyaki és extraabdominális, illetve intraabdominális, de nem mellékvesevelő eredetű tumorok esetében. NF1: Neurofibromatózis 1-es típusa; RET: Rearranged during transfection; SDHD: szukcinát-dehidrogenáz D alegység, SDHB: szukcinát-dehidrogenáz B alegység; SDHC: szukcinát-dehidrogenáz C alegység; SDHA: szukcinát-dehidrogenáz A alegység; SDHAF2: szukcinát-dehidrogenáz összeállító faktor 2, PHD2: prolil hidroxiláz 2-es típus, KIF1B: kinezin család 1B fehérje; TMEM127: transzmembrán protein 127; MAX: Myc-asszociált faktor X; MDH2: malát-dehidrogenáz 2-es típus, FH: fumarát-hidratáz; GOT2: Glutamin-oxaloacetát transzamináz 2; SLC25A11: Oxoglutarát/malát hordozó; VHL: von Hippel-Lindau; PGL: paraganglioma, Phaeo: phaeochromocytóma, PGL1-5: paraganglioma szindrómák (1-5 típus); MEN2B: Multiplex endokrin neoplázia 2B típus.

Gén (Referencia szek- vencia)	Kromoszo- mális lokalizáció	Kapcsolódó szindróma	Felfedezés éve	Lokalizáció (Phaeo/PG L)	További tünetek
NF1 <u>NM_000267.3</u>	17q11.2	Neurofibromatózis 1-es típusa	1990	mellékvese Phaeo	café au lait foltok, neuro-fibrómák
RET <u>NM_00975.4</u>	10q11.21	Multiplex endokrin neoplázia 2-es típusa	1994	mellékvese Phaeo (gyakran kétoldali)	medulláris pajzsmirigy karcinóma hiperparatireózis neurinomák (MEN2B)

Gén (Referencia- szek- vencia)	Kromoszo- mális lokalizáció	Kapcsolódó szindróma	Felfedezés éve	Lokalizáci ó (Phaeo/PGL)	További tünetek
VHL <u>NM_00</u> <u>0551.3</u>	3p25.3	von Hippel- Lindau szindróma	1993	mellékvese Phaeo, (gyakran kétoldali) extra- adrenális PGL	retina angioma haemangio- blastoma vesesejtes karcinóma
SDHD <u>NM_00</u> <u>3002.3</u>	11q23.1	PGL1	2000	fej és nyak PGL hasüregi Phaeo és PGL	C sejt hiperplázia és hiperkalcémia
SDHC <u>NM_00</u> <u>3001.3</u>	1q23.3	PGL3	2001	fej és nyak PGL	Gasztro- intesztinális stromalis tumor
SDHB <u>NM_00</u> <u>3000.2</u>	1p36.13	PGL4	2000	hasi PGL (gyakran malignus)	vesesejtes karcinóma, Gasztro- intesztinális stromalis tumor, leiomiómák
PHD2	1q42.2		2008	PGL	Familiáris eritrocitózis

Gén (Referencia- szek- vencia)	Kromoszo- mális lokalizáció	Kapcsolódó szindróma	Felfedezés éve	Lokalizáci ó (Phaeo/PGL)	További tünetek
KIF1B	1p36.22		2008	mellékvese Pheo	Charcot- Marie-Tooth Disease, Axonal, Type 2a1
SDHA F2 /SDH5 <u>NM_01</u> <u>7841.2</u>	11q12.2	PGL2	2010	PGL	
TMEM 127 <u>NM_01</u> <u>7849.3</u>	2q11.2		2010	mellékvese Phaeo	
SDHA <u>NM_00</u> <u>4168.3</u>	5p15.33	PGL5	2011	PGL	Leigh szindróma
MAX <u>NM_00</u> <u>2382.4</u>	14q23.3		2011	mellékvese Phaeo, PGL	
MDH2	7q21.12		2015	mellékvese Phaeo, PGL	Epileptikus enkefalopátia
FH	1q43		2014	PGL	vesesejtes karcinóma, leiomiómák

Gén (Referencia- szek- vencia)	Kromoszo- mális lokalizáció	Kapcsolódó szindróma	Felfedezés éve	Lokalizáci ó (Phaeo/PGL)	További tünetek
GOT2	16q21		2017	mellékvese Phaeo, PGL	
SLC25 A11	17p13.2		2018	PGL	

2. Célkitűzések

Kutatásom célkitűzései két területre irányultak: genetikai és tumorbiológiai vizsgálatokkal a beazonosított csírasejtes mutációkhoz társult molekuláris mechanizmusok feltárására fókuszáltam Phaeo/PGL-ban.

A daganatok genetikájára összpontosító kutatásunk célkitűzései között szerepelt:

1. egy, a daganatos endokrin betegségekre hajlamosító génmutációkat kimutató újgenerációs szekvenáló panel kifejlesztése és alkalmazása a napi munkában.
2. az NGS eredmények során több esetben előfordulhat, hogy egy betegben akár két patogén génhiba is igazolódik, amelyek együttes hatása a fenotípust is módosíthatja. Célul tűztem ki, hogy egy unikális eset bemutatásán keresztül két, különböző betegséghez társuló csírasejtes mutáció együttes fennállásának fenotípust módosító hatásait elemezzem.

A tumorbiológiai kutatásaim során

1. új prognosztikus és terápiás markerek azonosítását tűztem ki célul malignus Phaeo/PGL tumorok esetében.
2. kutatásaim tárgyát képezte egy malignus *SDHB* deficiens modellezésére alkalmas *in vitro* módszer kifejlesztése és jellemzése

3. Módszerek

3.1 Phaeo/PGL betegek mutáció vizsgálata DNS szekvenálással

Az Endogén Panel validációs csoportjába tartozó betegek *RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *MAX* és *TMEM127* génjeit a panelszekvenálás előtt, illetve az esettanulmányunkban szűrt *RET* és *BRCA1* és *BRCA2* géneket tájékoztatott beleegyezést követően hagyományos PCR reakciókkal és Sanger szekvenálással vizsgáltuk [104]. DNS kivonást a vérből kerskedelmi forgalomban elérhető kitekkel végeztük (Roche High Pure kit, Roche, Life Sciences, Penzberg, Németország; QIAamp DNA Mini kit, Qiagen, Kalifornia, Egyesült Államok). A fenti gének kétirányú szekvenálását Sanger szekvenálással, ill. a nagy deléciók vizsgálatát multiplex ligációs próba amplifikációval végeztük [105]. A kutatásunka bevont betegek mind írásbeli beleegyezést adtak, a vizsgálatainkat az ETT-TUKEB engedélyezte (ETT-TUKEB 4457/2012/EKU)

3.2 Az Endogén Panel összeállítása

Az Endogén Panel első verziójában az alábbi géneket vizsgáltuk: *EGLN1*, *EPAS1*, *FH*, *KIF1B*, *MAX*, *MEN1*, *NF1*, *RET*, *SDHA*, *SDHAF2*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *TMEM127*, *VHL*. A második verzióban a gének listáját az újabb irodalmi adatoknak megfelelően bővítettük a: *GOT2*, *MDH2*, és *SLC25A11* génekkel. A célzott génpanel könyvtárkészítésében Roche NimbleGene SeqCap technológiát használtunk. Ez a technológia hibridizáción alapul, ami a PCR alapú technológiákhoz képest specifikusabb könyvtárkészítést tesz lehetővé. Minden gén minden kódoló exonjára terveztünk próbákat, a teljes genetikai régió > 98%-át sikerült lefedni. Az exonok mellett a splice régiók 30 nukleotidhosszúságú szakaszai is vizsgálathatóak voltak a tervezett próbákkal.

A szekvenálás az Endogén Panel 1.0 verziója esetén MiSeq Reagent Kit, micro formátot, míg az Endogén Panel 2.0 esetén a MiSeq Reagent Kit, nano formátumát használtuk (Illumina Inc., Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok). A szekvenálást Illumina MiSeq készüléken végeztük (Illumina Inc., Kalifornia, Amerikai Egyesült Államok).

3.3 Variánsok azonosítása a panelszekvenálás során

A szekvenálás közben kapott genom adatok vizsgálata GATK (Genome Analysis Toolkit) Best Practices használatával történt [106]. Az adapter szekvenciákat eltávolítottuk Cutadapt segítségével [107]). A nyers szekvenálási, FASTQ formátumban kapott readeket az UCSC hg19 humán referencia genomhoz illesztettük BWA algoritmus használatával [108]. Samtools használatával eltávolítottuk a 20-asnál kisebb quality score-ral rendelkező readeket [109]. A PCR duplikátumot szűrésére Picard MarkDuplicates (<http://broadinstitute.github.io/picard>) programot használtunk. Az ún. indel újrainlesztést és a bázis quality score újrakalibrálását GATK alkalmazásával végeztük. A variánsok funkcionális karakterizálására interneten elérhető, SNPEFFECT, SIFT, ClinVar, Varsome és PolyPhen alkalmazásokat használtunk [110-112]. Az ENDOGEN 2 panel eredményeit a GATK FUNCTATOR algoritmusával is elemeztük. A komplex bioinformatikai elemzés a klinikai munkához nélkülözhetetlen interpretálás miatt elengedhetetlen, mindegyik algoritmusnak van előnye és hátránya is, de együttes alkalmazásukkal érhető el a legbiztosabban a klinikai szempontból is releváns eltérések beazonosítása [113].

A variánsok prevalenciáját és a klinikai jelentőségét a dbSNP [114], az amerikai Exom Project Variáns szervere (National Heart, Lung, and Blood Institute Exome Sequencing Project Exome Variant Server (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)), Hapmap [115], ClinVar, Varsome és 1000Genomes [116] adatbázisai segítségével határoztuk meg.

Az azonosított összes variáns ugyanazon a szűrési folyamaton esett át, mely során elimináltuk az exonon kívüli (UTR), a szinoním és alacsony read-számú (<10 read/variáns) eltéréseket.

3.4 Sejttenyészetek

Valamennyi sejtvonalat az American Type Culture Collection (ATCC) cégtől vásároltuk. A sejtek inkubációja 37 °C-on, párasított, 5% szén-dioxidot tartalmazó környezetben történt.

A PC12 (patkány kromaffin sejtvonala) sejteket 75 cm²-es flaskában, 15% lószérumot (Gibco BRL), valamint 1% penicillin-streptomycint (Biosera LM-A4118/100)

tartalmazó F12 (Kaigh's modification, Gibco 21127022) tápfolyadékban tenyésztettük. A tápfolyadékot hetente 2-3 alkalommal cseréltük. A sejteket a flasksból a további vizsgálatokra Tripszin-EDTA oldattal (#P0781, Sigma-Aldrich, Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) távolítottuk el.

A HeLa (humán méhnyakrák sejtvonal) sejteket 75 cm²-es flasksban, DMEM/F12 oldatban tenyésztettük (Dulbecco's modified Eagle medium/HamF12) (#11330032, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) mely 10% FBS-t (fetalis szarvasmarha szérum; #10270106, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok), valamint 1% penicillin-streptomycint (LM-A4118/100, Biosera) tartalmazott. A sejtek gondozása és eltávolítása a PC12 sejteknél leírt módszerekkel megegyező módon történt.

A H295R (humán mellékvesekéreg rák sejtvonal) sejteket 75 cm²-es flasksban, DMEM/F12 oldatban tenyésztettük (Dulbecco's modified Eagle medium/HamF12) (#11330032, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) melyet 0,00625 mg/ml inzulinnal (#I9278, Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok), 0,00625 mg/ml humán transferrinnel (#T5391, Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok), 6,25 ng/ml szelénsavval (#S9133, Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok), 1,25 mg/ml marha szérum albuminnal (#A9647, Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok), 2.5% nu-szérummal (Zenon Bio Kft.Szeged, Hungary) és 1% penicillin-streptomycinnel (#P0781, Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) egészítettünk ki. A sejtek gondozása és eltávolítása a PC12 sejteknél leírt módszerekkel megegyező módon történt.

3.5 *Sdhb* csendesítés

A PC12 sejteket 6-lyukú plate-ekre ültettük ki 24 órával a transzfekciót megelőzően, antibiotikummentes tápban. Két Silencer Select kis interferáló, *Sdhb* gént célzó RNS-t (siRNS 1: Sequence (5'→3': GAUUAAGAAUGAAAUCHAUtt, siRNA ID: #s151576; siRNS 2: Sequence (5'→3': GCAAAGUCUCGAAAUAUAtt, siRNA ID: #s220846) (Ambion by Life Technologies) használtunk fel a transzfektáláshoz RNAiMAX Reagent-tel (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült

Államok), a gyártói protokollnak megfelelően. Negatív kontrollnak PC12 sejteket transzfektáltunk nem-célzó Silencer Select siRNS-sel (Ambion by Life Technologies). A transzfekció hatékonyságát Sdhb fehérje Western Blot vizsgálatával ellenőriztük.

3.6 Fehérje izolálása és Western Blot

Teljes fehérjét M-Per reagenssel (#78503, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Amerikai Egyesült Államok) izoláltunk a gyártó instrukcióinak megfelelően. A fehérje koncentrációkat BCA Assay-el (Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) határoztuk meg. A teljes fehérje frakciót 10-15%-os SDS poliakrilamid gélben választottuk külön, majd PVDF membránra vittük át és egy éjszakán át inkubáltuk SDHB antitesttel (5 μ g/mL; anti-SDHB, ab14714, Abcam). A fehérjék megfelelő betöltésének ellenőrzésére β -aktin antitestet (1:25000, Cell Signalling Technology, ZA, Leiden, Hollandia) használtunk. Anti-egér HRP IgG antitestet használtunk másodlagos ellenanyagként (1:2,000, #P044701, Agilent, Santa Clara, CA, Amerikai Egyesült Államok). A kapott jelek intenzitását Image J software-rel (Bethesda, MD, Amerikai Egyesült Államok) vizsgáltuk.

3.7 Itakonát kezelés

Itakonátból (#I29204 Sigma-Aldrich, Sigma, St. Louis, MO, Amerikai Egyesült Államok) 500 nM koncentrációjú törzsoldatot készítettünk, a pH 7.2-es értékre NaOH oldattal korrigáltuk. A plate-ekre kiültetett sejteket 24 órán keresztül inkubáltuk. PBS-sel történő mosás után a friss tápfolyadékhoz itakonátot adtunk 25 mM koncentrációban. Kontrollként nukleázmentes vizet (NFW) használtunk.

3.8 Atpenin kezelés

Az atpenin A5 (atpenin) reagenst az Enzo Life Sciences (#ALX-380-313-MC25, Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY) cégtől vásároltuk. 2mM törzsoldatokat készítettünk abszolút etanollal. A sejteket az atpenin kezeléshez 6-lyukú plate-ekre ültettük ki. Egy nap inkubációt követően a sejtek médiumát friss tápfolyadékra cseréltük

PBS mosást követően. 1 μM atpenint adtunk a sejtekhez, kontrollnak abszolút etanol használtunk.

3.9 Intracelluláris metabolit koncentráció mérések

A sejteket 6-lyukú plate-ekben növesztettük a metabolit profil elemzéséhez. A 24 órás PC12 metabolit koncentrációk vizsgálatához 9 itakonáttal kezelt és 9 kontroll rendszert használtunk. Az összes egyéb (48 órás PC12, valamint 24 és 48 órás HeLa és H295R) vizsgálatot egyszerre 3 párhuzamos, itakonáttal kezelt, illetve 3 kontroll (ugyanolyan térfogatú NFW-vel kezelt) sejttenyészetten végeztük.

A metabolitok koncentrációjának normalizálásához a metabolit profil mérésével egyenlő számú sejteket ültettünk ki 6-lyukú plate-ekre. A sejtek inkubációja és kezelése a korábban leírtakkal megegyezően történt. Inkubáció után a sejteket a már említett módon eltávolítottuk, majd a sejtekből DNS-t izoláltunk, melyhez a QIacube (110V) (#9001292, Qiagen, Hilden, Németország) készüléket használtuk. A DNS koncentrációjának mérése NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok) készülékkel történt. Az adatok normalizálásához a megfelelő metabolit koncentrációkat ($\mu\text{mol/l}$) a hozzájuk tartozó DNS-koncentrációval ($\text{ng}/\mu\text{l}$) osztottuk, majd szoroztuk 1000-rel. A normalizált koncentrációk mértékegysége így $\mu\text{mol}/\mu\text{g}$ lett.

3.10 AlamarBlue – Viabilitási assay

A vizsgálatot 96-lyukú plate-eken végeztük. Minden kísérletet 6 biológiai párhuzamos mintán végeztem el. A sejtek életképességét AlamarBlue assay használatával vizsgáltuk (#DAL1025, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok). Az AlamarBlue reagens egy resazurin tartalmú oldat, melynek segítségével az élő sejtek redukáló képességét vizsgálva kvantitatív információt ad a sejtek életképességéről. A resazurin nem toxikus, sejtekbe penetráló összetevője a reagensnek, mely az élő sejtekbe lépve resorufinná alakul, mely erősen fluoreszcens. A sejtek életképességét abszorbancia illetve fluoreszcencia mérésével tudjuk mérni.

A PC12 sejteket 96-lyukú plate-ekre ültettük ki egyenként 100 µl tápfolyadékba, a sejtek sűrűsége a kezelés időtartamától függően: 5000 sejt/lyuk 24 órás kezeléshez; 2500 sejt/lyuk a 48 órás, míg 1700 sejt/lyuk a 72 órás kezeléshez.

A HeLa sejteket 96-lyukú plate-ekre ültettük ki egyenként 100 µl tápfolyadékba, a kezelés időtartamától függően a következő sűrűségekkel: 3000 sejt/lyuk a 24 órás kezeléshez; 1500 sejt/lyuk a 48 órás kezeléshez; illetve 1000 sejt/lyuk a 72 órás kísérlethez.

A H295R sejteket 96-lyukú plate-ekre ültettük ki egyenként 100 µl tápfolyadékba, a kezelés időtartamától függően a következő sűrűségekkel: 10000 sejt/lyuk a 24 órás kezeléshez; 5000 sejt/lyuk a 48 órás kezeléshez; illetve 3500 sejt/lyuk a 72 órás kísérlethez.

A kezelések adott inkubációs ideje után 10 µl AlamarBlue reagenst adtunk a rendszerhez, majd 37 °C-on, párasított, 5% szén-dioxidot tartalmazó környezetben 1 óra 15 perces inkubációt követően a sejtek fluoreszcenciáját (ex:560 nm; em:590 nm) detektáltuk Varioskan Flash plate reader készülékkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Egyesült Államok).

3.11 Sejtproliferációs assay

A vizsgálatokat 96-lyukú plate-eken végeztük PC12 sejteken, 2500 sejt/lyuk kiültetési aránnyal. Minden méréshez hat párhuzamos mérést használtunk. A megfelelő kezelés elvégzése után a sejtek 24, 48 és 72 óráig inkubálódtak 37 °C-on, párasított, 5% szén-dioxidot tartalmazó környezetben. Az inkubációt követően a sejteket 4°C-os 10%-os triklórecetsav oldatban fixáltuk 60 percig, majd ötszöri vizes mosást követően a plate-eket kiszárítottuk. Ezt követően 15 percig 0,4%-os Sulforodamin B (SRB) festés történt szobahőmérsékleten, majd a plate-eket 1%-os ecetsavval mostuk. A fehérjékhez kötött festék ismételt beoldásához 10 mM Tris használtunk. Az abszorbancia mérése 570 nm-en történt, Varioskan Flash plate readerrel (Thermo Fisher Scientific).

3.12 Tömegspektrometriai mérések

Az intracelluláris metabolit szinteket (laktát, piruvát, citrát, alfa-ketoglutarát, fumarát, glutamát, aszpartát, malát, szukcinát) Szoboszlai és munkatársai módszere alapján határoztuk meg [117]. Röviden összefoglalva: a sejteket folyékony nitrogénnel kezeltük, a sejtes frakciót metanol-kloroform-NFW (9:1:1 arányú) extrakciós eleggyel izoláltuk. Ezután 4°C-on vortexeltük a mintákat, majd a centrifugálás (15000xg, 10 perc, 4°C) során nyert felülúszót -80°C-on tároltuk a folyadékkromatográfiához kapcsolt tömegspektrometriás (LC/MS) mérés elvégzéséig. A folyadékkromatográfiás elválasztást Perkin-Elmer Flexar FX10 műszerrel, a tömegspektrometriás mérést ABSciex 5500 QTRAP készülékkel végeztük. A tömegspektrometriás mérés során az egyes metabolitok kvantitatív meghatározása a kiindulási és a fragmentációs ionok detektálásával (MRM- Multiple Reaction Monitoring) történt. A kromatográfiás elválasztás Phenomenex Luna Omega C18 (100x2,1mm, 1,6 µm) (GenLab Ltd., Budapest) típusú oszlopon történt. A mozgó fázis víz és metanol volt, mindkettő 0,1% hangyasavat (V/V) tartalmazott. A tömegspektrométer negatív elektropray ionizációs módban mért a következő beállításokkal: hőmérséklet: 300°C, ionizációs feszültség: -4000 V, bemeneti potenciál: -10 V. A laktát, piruvát, citrát, alfa-ketoglutarát, szukcinát, fumarát, malát, glutamát és aszpartát koncentrációjának meghatározása kalibrációs görbék segítségével történt. Minden adott mintából 3 párhuzamos mérést készítettünk.

3.13 Sejtlégzés és extracelluláris savasodás

A valós idejű oxigénfogyasztási ráta (oxygen consumption rate, OCR) és extracelluláris savasodási ráta (extracellular acidification rate, ECAR) mérésére Seahorse XF96 Analyzer (Agilent Technologies, Amerikai Egyesült Államok) készüléket használtunk korábbi protokollok leírása alapján [95, 118, 119]. A PC12 sejteket 96-lyukú Seahorse plate-ekre (Agilent Technologies, Amerikai Egyesült Államok) ültettük ki 100 µL tápfolyadékban, 30000 sejt/lyuk arányban, 24 órával a mérések megkezdése előtt. Az itakonát és az atpenin kezelést a sejtek 24 vagy 48 órával a mérések előtt kapták meg, míg az *Sdhb* géncsendesítést 48 órával a mérések előtt végeztük. A BPTES kezelést 24 órával a mérések előtt alkalmaztuk. A mérések napján a sejtek tápfolyadékát lecseréltük

a következő összetételű médiumra (a számok mM-ban értendők): 120 NaCl, 3.5 KCl, 1.3 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 20 HEPES, 10 glükóz, pH 7.4. Ezt követően az alap OCR és ECAR értékeket 1,5 óra elteltével mértük.

A mérések közben frissen előkészített glutamint (4 mM) és/vagy anyagcsere inhibitorokat/modulátorokat (oligomycin 2µM, 2,4-dinitrophenol- DNP 200 µM és antimycin A + rotetone 1-1µM) adtunk minden egyes lyukhoz a kívánt koncentráció eléréséig.

3.14 A mitokondrium membrán potenciál ($\Delta\Psi_m$) és a plazma membránpotenciál (PMP) egyidejű mérése

A PC12 sejteket poli-L-ornitinnel fedett 8-kamrájú LabTek II kamrákban (Nunc, Rochester, NY, Amerikai Egyesült Államok) növesztettük 3 napig teljes médiumban, megközelítőleg $3 \cdot 10^5$ sejt/karma számmal 37 °C-on 5% CO₂ mellett. Az itakonát és az atpenin kezelést a sejtek 24 vagy 48 órával a mérések előtt kapták meg, míg az *Sdhb* géncsendesítést 48 órával a mérések előtt végeztük. A mérések napján a sejtek tápfolyadékát lecseréltük a következő összetételű tápfolyadékra (a számok mM-ban értendők): 120 NaCl, 3.5 KCl, 1.3 CaCl₂, 1.0 MgCl₂, 20 HEPES, 15 glükóz, pH 7.4 TMRM (180 nM) és bis-oxonol típusú PMP indikátor, DIBAC4(3) (250 nM, Life Technologies Inc.) vegyületekkel hozzáadásával 1 órával a kísérletek előtt. A kísérleteket 34 °C-on végeztük UAPO 20× air 0.75 NA lencsével felszerelt, Bioprecision-2 xy-stage Olympus IX81 invertált mikroszkóppal (Ludl Electronic Products Ltd., Hawthorne, NY) és egy 75W xenon arc lámpával (Lambda LS, Sutter Instruments, Novato, CA). A képeket 1342 × 1024 pixel felbontásban (12 bit-en digitalizálva, 4 × 4 binning-el és 250 msec expozíciós idővel a TMRM képekhez; a DIBAC4(3) képekhez 200 msec exponálással) 4x4 binneléssel, 12 bittel digitalizálva készítettük. A DIBAC4(3) megvilágításához egy 490/10 nm hullámhosszt gerjesztő 505LP dikronikus tükröt és egy 535/25 emissziós szűrőt használtunk (Chroma Technology Corp., Bellows Falls, VT). A TMRM képek megvilágításához 535/20 nm hullámhosszt gerjesztő 555LP dikronikus tükröt és egy 535/25 emissziós szűrőt és egy 630/75 emittert használtunk (Chroma Technology Corp., Bellows Falls, VT).

A TMRM és a DIBAC4(3) emissziói közötti átfedés egy Image Analyst MKII (Image Analyst Software, Novato, CA) programmal fejlesztett, lineáris spektrális nem-keverő algoritmussal lett kiküszöbölve [120], melyhez egy egyedi dekompozíciós algoritmust használtunk [120]. Az algoritmus kiszámítja a nem kevert fluoreszcencia intenzitást egy, az átfedő együttható mátrixával kiegészített lineáris egyenlettel. Az együttható mátrixot a TRM és a DIBAC4(3) emissziójának együttes detektálása után határoztuk meg azután, hogy a sejteket TMRM-mel vagy DIBAC4(3)-el kezeltük. A mitokondrium depolarizálását 6 egymás utáni 10nM SF6847 adásával érték el, majd minden sorozat végén a teljes mitokondriális depolarizációt mitokondriális (MDC) és plazma membrán (CDC) depolarizáló vegyületekkel érték el. Az elegy összetétele (μM): 1 valinomycin, 1 SF 6847, 2 oligomycin; a CDC összetétele (μM): 1 valinomycin, 1 SF 6847, 2 oligomycin, 10 nigericin, 10 monensin.

3.15 Statisztikai analízis

Az összes mért adatot átlag \pm SD formában adtuk meg, néhány esetet kivéve, ahol ezt külön jeleztem.

Az eredményeink statisztikai analíziséhez GraphPad Prism 6 programot használtam (GraphPad Software Inc. La Jolla, California Egyesült Államok). Az adatok Gauss-görbe szerinti eloszlását Shapiro-Wilks teszttel vizsgáltuk. Normál eloszlású adatok esetén t-teszttel, egyéb esetben Mann-Whitney-próbával analizáltuk az eredményeink közti különbségeket. Statisztikailag szignifikánsnak a 0.05-nél kisebb p-értékeket vettük.

Az ábrákon feltüntetett szignifikanciaszinteket a következő módon jeleztük: n.s. – $p > 0,05$; * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$; **** – $p < 0,0001$.

4. Eredmények

4.1 Csírasejtes *BRCAl* mutáció egy MEN2A szindrómás betegben

Egy 16 éves fiatal nőbeteget 2013-ban referáltak a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinikájára endokrinológiai kivizsgálás céljából. Hajhullása hátterének esetleges pajzsmirigy eredete és a pajzsmirigyben tapintott két göb miatt a háziorvosa endokrinológiai kivizsgálásra irányította a páciens. A Klinikán elvégzett vizsgálatok során a tiroid stimuláló hormon (TSH) a normál tartományban volt (2,44 mU/L; referencia tartomány: 0,35-4,94 mU/L). Az elvégzett nyaki ultrahang vizsgálaton a pajzsmirigy mindkét lebenyében összesen két hipoehogén, inhomogén massa ábrázolódott mikrokalcifikációval. Biopsziás és vékonytű biopsziás mintavételt követően szövettani vizsgálat történt. Mindkét oldalról származó aspirátum keneteiben azonos citológiai kép volt megfigyelhető hematoxin-eozin festés után: a kenetek extrém sejtűnek mutatkoztak, bennük a normál folliculus hámsejtekhez kissé nagyobb maggal rendelkező, atípusos kromatin állománnyal bíró daganatsejtek ábrázolódtak. Calcitonin ellenes antitesttel történő festés a daganatsejtek közel 100%-ban pozitív festődést mutatott. Komputerezált tomográfias (CT) vizsgálat a jobb lebenyben egy 2,2 cm átmérőjű, a bal lebenyben egy 0,6 cm átmérőjű göböt azonosított. A beteg calcitonin és karcinoembrionális antigén (CEA) szintjei jelentősen emelkedettek értékeket mutattak (calcitonin: 501 pg/ml; referencia tartomány: 0-6 pg/ml. CEA: 7,4 ng/ml; referencia tartomány: 0-4,3 ng/ml). A plazma parathormon szint (37,9 pg/ml, referencia tartomány: 15-65 pg/ml) valamint a 24 órás vizelet metanefrin (178 mcg/24h; referencia tartomány: 64-302 mcg/24h) és normetanefrin szintek (385 mcg/24h; referencia tartomány: 162-527 mcg/24h) patológiás eltérést nem mutattak.

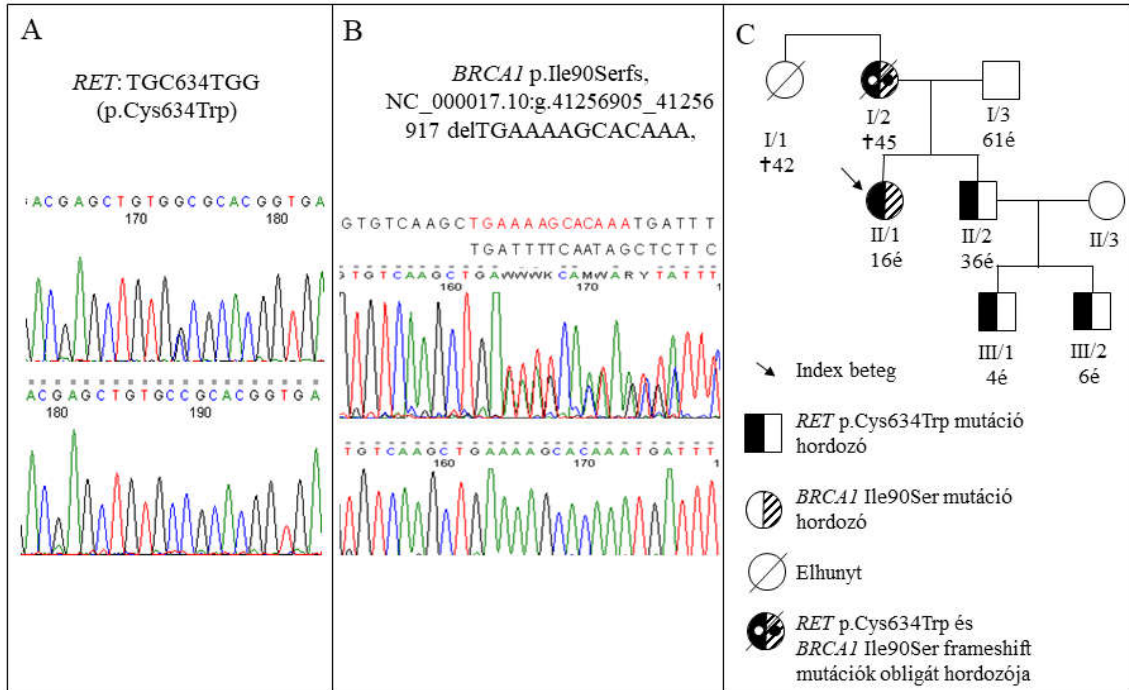
Teljes pajzsmirigy eltávolítást követően a szövettani vizsgálat megerősítette a medullaris pajzsmirigy karcinóma (MTC) diagnózisát. A daganat 3 bal és 4 jobb oldali nyirokcsomóba adott átétet, távoli metasztázis nem igazolódott. A tumor TNM klasszifikációja pT2N1a volt [121]. Habár a szérumban calcitonin és CEA szintek jelentősen csökkentek a műtétet követő megfigyelési időszakban, teljes biokémiai

remissziót nem sikerült elérni: a szérum calcitonin szintek bizonytalan emelkedő tendenciát mutattak 31-178 ng/L tartományban a posztoperatív időszakot eddig felölelő hat évben. A posztoperatív CT vizsgálaton egy reziduális pajzsmirigyszövet igazolódott egyéb metasztázis gyanúja nélkül. Ismételt ultrahang és vékonytű aspirációs bioszia vizsgálat a reziduális szövet háttérében hegszövetet állapított meg, visszamaradt pajzsmirigy szövetet nem igazolt. A TSH szintek a műtétet követően 31,1 mU/L szintre emelkedtek, melyeket a sikeres pajzsmirigy hormon szubsztitúció 0,128-3,843 mU/L értékekre normalizált (referencia tartomány: 0,35-4,94 mU/L).

Genetikai tanácsadást követően a beteget MEN2A szindróma gyanúja miatt a *RET* gén genetikai vizsgálatának vetették alá [121]. A vizsgálat egy ismert patogén heterozigóta mutációt (p.Cys634Trp) igazolt két gyakori, szinonim *RET* polimorfizmus mellett (rs1800860 és rs1800861). Az igazolt patogén, MEN2A-ra hajlamosító mutáció miatt a beteg a betegség további manifesztációnak szűrése céljából további vizsgálatokon esett át. Mellékvese és dúclánc phaeochromocytómákat és paragangliómákat nyak-, mellkas- has- és kismedence CT vizsgálatokkal nem sikerült igazolni, valamint a 24 órás gyűjtött vizeletvizsgálattal sem ábrázolódott katekolamin vagy metanefrin szekretáló tumorra utaló eltérés. Daganatos eltérésre utaló jel nem ábrázolódott a képalkotó vizsgálatokon sem. A szérum parathormon szintek a fiziológias tartományban voltak és mellékpajzsmirigy eltérésre utaló klinikai jel nem volt kimutatható. Az eddig eltelt hat évben a beteg továbbra is mentes a MEN2A szindróma egyéb manifesztációjától.

Mivel a MEN2A szindróma autoszomális domináns öröklődésmenetet mutat a beteg elsőfokú családtagjait is javasolt bevonni a genetikai tanácsadásba [121]. A részletes családi anamnézis felvétele során kiderült, hogy a beteg édesanyja és édesanyja lánytestvére is metasztatikus emlődaganat miatt hunytak el. Ez a váratlan lelet felvetette az örökletes emlőrák szindróma valószínűségét. Sajnálatos módon az elhunyt családtagoktól DNS izolálásra alkalmas minta és kórházi zárójelentés nem maradt vissza. Az örökletes emlődaganat szindróma is autoszomális domináns öröklődésmenetet mutat, így az elsőfokú rokonok szűrése ebben az esetben is javasolt [122]. A nemzetközi javaslatoknak megfelelően genetikai vizsgálat történt és egy kereteltolódással járó patogén *BRCA1* mutáció igazolódott (*BRCA1* p.Ile90Serfs,

NC_000017.10:g.41256905_41256917 delTGAAAAGCACAAA) a betegben (5. ábra). A klinikai kivizsgálás és a mágneses rezonancia vizsgálat (MRI) nem talált emlődaganatra utaló jelet, valamint az eddig eltelt utánkövetési időszakban sem emlősem petefészkek illetve egyéb daganatra utaló jel nem ábrázolódott.



5. ábra: A *RET* és *BRCA1* mutációt hordozó beteg szekvenálási eredményei, ill. családfája. **A:** Az index betegben azonosított *RET* p.Cys634Trp mutáció kromatogramja. **B:** Az index betegben azonosított *BRCA1* p.Ile90Ser frameshift mutáció kromatogramja. **Panel C:** Az index beteg családfája. Az index beteg (II/1) 16 éves volt a diagnózis felállításakor (jelenleg 23 éves), míg a testvére (II/2) 36 éves (jelenleg 43 éves). A beteg testvérének 4 éves (III/1) (jelenleg 11 éves) és 6 éves (III/2) (jelenleg 13 éves) gyermekei is hordozták a *RET* p.Cys634Trp mutációt. Az index beteg édesanyjánál (I/2) 34 évesen diagnosztizáltak emlődaganatot, melynek metasztázisai következtében 45 évesen hunyt el. Az index beteg nagynénjénél (I/1) 36 évesen diagnosztizáltak emlődaganatot, majd a beteg 42 éves korában hunyt el. (†: életkor a halál időpontjában; é: életkor).

Tekintettel az igazolt örökletes tumorszindrómákra, a beteg hozzátartozóit is bevontuk a *RET* és *BRCAl* gének szűrésébe. A beteg bátyja (kor: 36 év) és két fia (kor: 4 és 6 év) szintén hordozták a *RET* 11-es exon p.C634W mutációt, azonban a *BRCAl* mutáció nem igazolódott az esetükben. A beteg testvérében klinikai kivizsgálás során két pajzsmirigy göböt, laborvizsgálatokkal emelkedett calcitonin szintet (215 pg/ml) írtak le. Teljes pajzsmirigy eltávolítást követően calcitonin szintjei a fiziológiás tartományba kerültek. A beteg testvérenek két fia megelőző pajzsmirigy eltávolításon esett át. Az eltávolított pajzsmirigyek szövettani vizsgálata MTC-re utaló jelet nem írt le. A beteg édesapja sem a *RET* sem a *BRCAl* mutációt nem hordozta. A teljes családfa az 5. ábrán látható.

4.2 Újgenerációs szekvenálás klinikai alkalmazhatósága

4.2.1 Az Endogén Panel 1.0 kifejlesztése

A csírasettes mutációkért felelős gének egyidejű vizsgálatának céljából kutatócsoportunk kifejlesztett egy hibridizáción alapuló, a gének párhuzamos szekvenálását lehetővé tevő panelt. A szekvenáló panel első verziója (Endogén Panel 1.0) összesen 15 gén egyidejű vizsgálatára volt képes (*EGLN1*, *EPAS1*, *FH*, *KIF1B*, *MAX*, *MEN1*, *NF1*, *RET*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *SDHAF2*, *TMEM127*, *VHL*).

A tervezés során összesen 509 különböző méretű fragmens fedte le a fentebb nevezett géneket. A teljes vizsgálati szekvencia összesen 126116 nukleotid volt. A panel klinikai felhasználhatóság tesztelése szempontjából ismert genetikai háttérrel rendelkező minták vizsgálatára került sor (validálási csoport, lásd alább).

A panel validálásához 17 beteg mintáit használtuk fel. A minták *RET*, *VHL*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *MAX* és *TMEM127* génjeit a "Módszerek" fejezetben ismertetett módon a panelszekvenálás előtt Sanger szekvenálással vizsgáltuk. Közöttük 12 eset hordozott korábban már igazolt patogén mutációt (2 *RET*, 5 *SDHB*, 2 *TMEM127*, 2 *MEN1* és 1 *VHL*), míg 5 eset a *RET*, *SDHB*, *SDHD*, *VHL* és *TMEM127* génekben nem hordozott betegség- okozó variánst. A szekvenálás során a vizsgált régiók lefedettsége elérte és meghaladta az allélonkénti > 20 readet (6. ábra).

Tekintettel arra, hogy a Phaeo/PGL betegségek patogenezisében főképpen a kódoló régiók eltérései játszanak szerepet, kizártuk a variánsok közül a 3' és 5' UTR (untranslated region-nem átíródó régió) variánsokat, az intron régiót érintő variánsokat illetve a szinonim kódoló variánsokat. Kizártuk továbbá azon variánsokat, amelyek nem érték el az allélonkénti 10 read-számot. A panelszekvenálás előtt validált géneket tekintve összesen 62891 db variánsnak megfelelő kódoló régiót vizsgáltunk. A kódoló régiókat tekintve 41 db variáns volt valódi pozitív, 114 fals pozitív, 0 db fals negatív és 62736 valódi negatív variánst igazoltunk. A 114 fals pozitív hívásból 17 db a *MEN1* génhez volt köthető: egy *MEN1* p.T546A (rs2959656) variáns fals pozitív hívása a referencia genomban tapasztalható hibához volt visszavezethető. A *MEN1* gén referenciagenomja eltérő a különböző adatbázisokban, így ennek ellenőrzése külön feldolgozásban is szükséges volt.

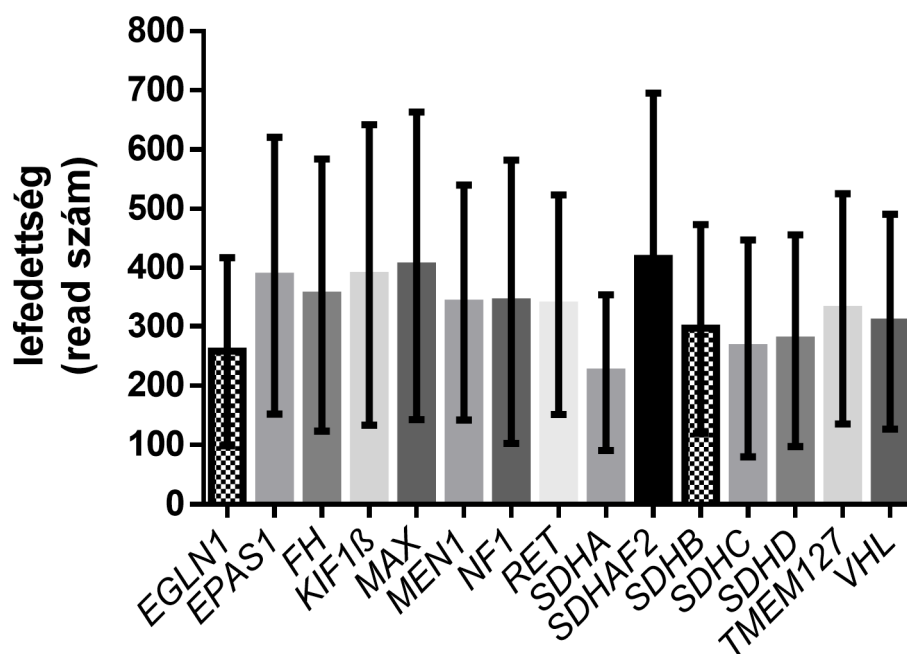
A fals pozitívak és a vizsgálni kívánt variánsok számának csökkentése céljából read-szám megoszlási szűrést alkalmaztunk. Mivel heterozigóta genotípust feltételeztünk a betegség genetikai etiológiáját tekintve, az ideális, 50%-os allélonkénti read-szám megoszlástól $\pm 30\%$ -al eltérő hívásokat az összes pozitív variánsból kizártuk, így a fals pozitívak száma a korábban említett *MEN1* variánsok kizárása után 68 darabra csökkent.

A 12 korábban már ismert patogén eltérés mindegyike beazonosításra került. Kettő, ismeretlen jelentőségű bíró, ún. VUS-t (variant of uncertain significance) találtunk, míg 25 esetben aminosavcsere okozó jóindulatú génpolimorfizmust mutattunk ki. Mindezek alapján az Endogén Panel 1.0 szenzitivitása 100%-nak, specificitása $> 99\%$ -nak adódott.

4.2.1.1 Az Endogén Panel 1.0 prospektív csoportja

A klinikai gyakorlati hasznát az Endogén Panel első verziójának 24 mintán teszteltük, melyek korábban nem rendelkeztek genetikai diagnózissal. Az előző fejezetben ismertetett kritériumok szerint szűrtük a variánsokat, így végül 62 variánst azonosítottunk. Összesen 24 fals pozitív hívást észleltünk, ismételtén a korábban ismertetett *MEN1* variáns esetében (*MEN1* p.T546A (rs2959656)). A 24 mintában,

összesen 10 esetben mutattuk ki összesen 11 patogén géneltérést (1 esetben *VHL*, 3 esetben *SDHB*, 7 esetben *NF1* génmutációt). A megmaradt 28 variáns aminosavcserét okozó benignus hatással jellemzett génvariáns. Érdemes kiemelni, hogy egy beteg esetében két különálló *SDHB* mutációnak azonosított a panel szekvenálás, és a Sanger szekvenálást követően igazolódott is, hogy ez a beteg két különböző patogén mutációt hordozott: az p.R90 kereteltolódással járó mutációján felül egy *SDHB* p.T88I variánst szintén validáltunk a páciensnél. Egy fiatal női páciens esetében a nyaki paragangliómájának hátterében egy feltételezhetően patogén *VHL*-mutációt azonosítottunk.



6. ábra: Az Endogén Panel 1.0 lefedettségi adatai génenként válogatva. Az adatok átlag±szórásként értendők.

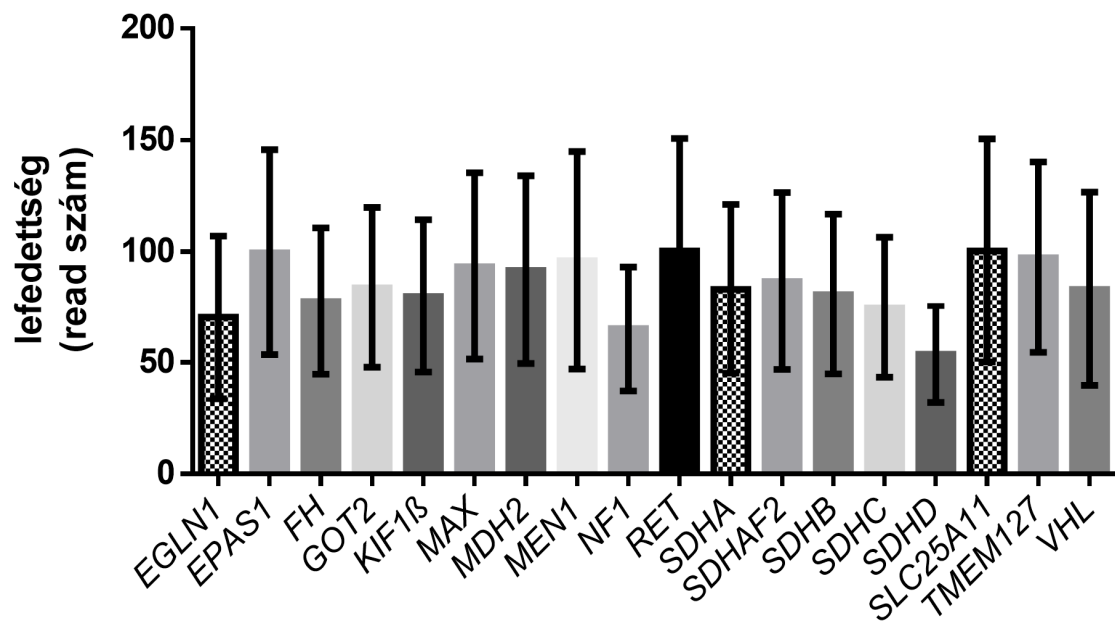
4.2.2 Az Endogén Panel 2.0 kifejlesztése

Az Endogén Panel 1.0 fejlesztése során szerzett tapasztalataink alapján átalakítottuk a szekvenálás protokollját, illetve kibővítettük a szekvenált gének számát az alábbi génekkel: *GOT2*, *MDH2* és *SLC25A11*. Így összesen 18 gén egyidejű vizsgálatát tette

lehetővé a továbbfejlesztett panel. Továbbfejlesztettük továbbá a bioinformatikai analízist is, hogy a relatíve alacsony lefedettségű régiókban se vesszenek el valódi pozitív variánsok. Az Endogén Panel 2.0 klinikai felhasználhatóságának vizsgálatába 38 Phaeo/PGL beteg mintáit vontuk be. Költséghatékonyság céljából egy olcsóbb, de némileg kisebb lefedettséget biztosító szekvenáló kitre váltottunk (MiSeq nano). Mintáink egytől egyig ismeretlen genetikával rendelkeztek, így klinikai gyakorlatban tudtuk kipróbálni a panelünket. A korábban ismertetett szűrési kritériumokat alkalmazva összesen 198 variánst azonosítottunk. A 38 betegben 63 olyan variáns hívás történt, ahol további elemzés volt szükséges. 38 esetben a *MEN1* szekvencia korábban ismertetett hibája miatt fals pozitív eredményt kaptunk. 25 esetben a továbbfejlesztett bioinformatikai algoritmus alacsony lefedettség vagy nem megfelelő allélmegoszlás miatt kellett további validációs vizsgálatokat elvégeznünk. A 25 esetből 22 esetben a feltételezett variáns Sanger szekvenálással igazolódott, 3 esetben pedig nem. Így összesen 41 fals pozitív hívás történt (3. Táblázat).

Patogén mutációt 10 esetben (26%) azonosítottunk. 3 mutációt az *SDHB* génben, 2 mutációt az *FH* génben, 4 betegben *NFI* és 1 betegben *VHL* mutációt igazoltunk. Nyolc, ún. nem bizonyított klinikai hatású variánst (VUS) is kimutattunk. Ezek közül 3-t olyan betegekben találtunk, amelyek bizonyítottan már patogén mutációt is hordoztak. Három VUS esetében felmerül a patogenetikai szerep, mert ezek nem szerepelnek egyik genetikai adatbázisban sem, a funkcionális predikciók alapján benignus vagy patogénikus hatásuk nem eldöntött (4. Táblázat).

Az Endogén Panel 2.0 szekvenálásai során az egyes gének lefedettségét a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra: Az Endogén Panel 2.0 lefedettségi adatai génenkénti bontásban. Az adatok átlag±szórásaként értendők.

3. Táblázat: Az Endogén Panel fejlesztése. *: Szelektálás után a patogén variánsok, az ismeretlen jelentőséggel bíró variánsok és a benignus polimorfizmusok száma

	Endogén Panel 1.0 validálási csoport	Endogén Panel 1.0 prospektív csoport	Endogén Panel 2.0
Vizsgált gének száma	15	15	18
Minták száma	17	24	38
Beazonosított variánsok*	39	38	135

4.2.3 A másodlagos variánsok jelentősége

Az egyértelműen patogén mutációk mellett, ismeretlen klinikai jelentőséggel bíró variánst is azonosítottunk (4. Táblázat). Bizonyos variánsok önmagukban jóindulatúnak

vannak jellemezve a szakirodalomban, azonban más mutációkhoz társulva feltételezéseink szerint fenotípust módosító hatással rendelkezhetnek.

Az Endogén Panel 1.0 betegek között egy MEN2B szindrómás betegnél egy ritka, de a MEN2B fenotípusért felelős *RET* p.M918T mutáció állt az alapbetegség hátterében. A betegség egyetlen manifesztációja egy egyoldali Phaeo volt. A beteg patogén mutációján felül egy, az irodalmi adatok szerint feltehetőleg jóindulatú *SDHD* p.H50R mutációt azonosítottunk.

Egy bilaterális Phaeo fenotípust mutató betegünkénél a patogén *VHL* p.F136C mutációhoz társultan egy *SDHD* p.G12S mutációt is találtunk. Egy esetünkben egy kereteltolódással járó *NFI* mutációhoz egy *RET* p.R982C (rs17158558) mutáció társult. A *RET* variáns klinikai jelentőségéről a szakirodalomban egyértelmű konszenzus nincs. Egy másik, korábban sporadikus Phaeo-t hordozó beteg esetében patogén mutációt nem sikerült azonosítani, azonban egy rs számmal nem rendelkező, új *SDHA* variánst (*SDHA* p.G416S) detektáltunk.

Az Endogén Panel 2.0 kibővített génkészletének segítségével egy malignus Phaeo fenotípust mutató páciensben egy ritka (MAF az európai populációban: 0,0013), feltehetőleg patogén, de a szakirodalomban ismeretlen jelentőséggel bíró *GOT2* variánst (R393Q; rs151225545) azonosítottunk. A korábban már említett *SDHD* p.G12S variánst patogén mutációhoz nem társultan egy egyoldali benignus Phaeo esetében, illetve egy neurofibromatózis 1 szindrómás betegben *NFI* frameshift mutációhoz társultan is igazoltunk. *NFI* mutációhoz társultan egy másik betegünkénél egy új, rs szám nélküli, *SDHC* p.T32A mutáció igazolódott. Benignus, egyoldali Phaeo-hoz társultan *RET* p.Y791F (rs77724903), *SDHA* p.M279I (rs746145822), *MDH2* p.R229G (rs373614243) és *EPAS1* p.S12L (rs376889179) variánsokat is validáltunk betegeinkben. Egy páciensben az *SDHB* c.286+2T>A (splice) mutációjához társultan egy *KIF1B* p.T873I variáns került azonosításra.

4. Táblázat: Az Endogén Panel első (1.0) illetve második (2.0) verziója során leírt variánsok és a hozzájuk tartozó fenotípusok. Az EP 1.0V (validációs) csoportba tartozó betegek a vizsgálat előtt genetikai diagnózissal rendelkeztek. Az EP 1.0P (prospektív) csoportba tartozó betegek genetikai diagnózissal nem rendelkeztek a szekvenáláskor. EP: Endogén Panel; Phaeo: phaeochromocytóma; PGL: paraganglióma; MEN: multiplex endokrin neoplázia; NF1: neurofibromatózis 1-es típusa; VUS: variant of uncertain significance (ismeretlen klinikai jelentőséggel bíró variáns).

Minta azonosító	Panel	Fenotípus	Patogén mutáció	VUS	Benignus polimorfizmusok
IL001	EP 1.0V	malignus PGL	SDHB p.C243Y	-	EGLN1 p.C127S; KIF1B p.Y1087C; KIF1 c.*5019T>C
IL002	EP 1.0V	Phaeo	-	-	KIF1B p.Y1087c
IL004	EP 1.0V	malignus PGL	SDHB p.C196G	-	SDHA p.V629F; SDHA p. 657I
IL005	EP 1.0V	malignus PGL	-	-	-
IL006	EP 1.0V	Phaeo	-	-	SDHA p.Y629F
IL008	EP 1.0V	MEN2	RET p.C611Y	-	SDHA D38V
IL009	EP 1.0V	Phaeo	TMEM12 7 p.C140Y	-	EGLN1 Q157H
IL010	EP 1.0V	Phaeo	-	-	SDHA p.V629F; SDHA p.V657I

Minta azonosító	Panel	Fenotípus	Patogén mutáció	VUS	Benignus polimorfizmusok
IL012	EP 1.0V	malignus PGL	SDHB p.C249R	-	SDHA p.Y629F; SDHA p.V657I; EGLN1 p.Q157H
IL013	EP 1.0V	malignus PGL	SHDB p.R217C	-	KIF1β p.V1554M; RET p.R982C; RET p.G691S
IL014	EP 1.0V	malignus PGL	SDHB p.C253Y	-	SDHA p.V629F; SDHA p.V657I
IL015	EP 1.0V	MEN2B	RET p.M918T;	SDHD p.H50R	; KIF1β p.Y1087C
IL016	EP 1.0V	MEN1	MEN1: p.E392 Frame shift	-	RET p.Y791F
IL017	EP 1.0V	MEN1	MEN1 p.R521P Frame shift	-	SDHA p.Y629F; SDHA p.V657I
IL018	EP 1.0V	Phaeo	TMEM12 7 p.T191 Frame shift	-	-
IL019	EP 1.0V	VHL- Bilaterális Phaeo	VHL p.F136C	SDHD p.G12S	-
IL020	EP 1.0P	Phaeo	-	-	RET p.G691S

Minta azonosító	Panel	Fenotípus	Patogén mutáció	VUS	Benignus polimorfizmusok
IL021	EP 1.0V	Phaeo	-	-	SDHA p.Y629F; SDHA p.V657I; EPAS1 p.T766P
IL022	EP 1.0P	Phaeo	-	-	-
IL023	EP 1.0P	Phaeo	-	-	KIF1B Y1087c
IL052	EP 1.0P	malignus PGL	SDHB c. 286+2T> A splice	-	-
IL024	EP 1.0P	PGL	-	-	-
IL025	EP 1.0P	NF1	NF1 g. 29550493 p.LT585 Frame shift	-	KIF1B p.T1462P; KIF1B p.Y1087C
IL026	EP 1.0P	NF1	NF1 W1664G	-	SDHC p.E144Q; RET p.G691S
IL027	EP 1.0P	NF1	NF1 g.2958541 7delCC, FL1389 Frame shift	-	RET p.R982C; RET p.G691S
IL028	EP 1.0P	NF1	NF1 Y489C	-	EGLN1 p.C127S

Minta azonosító	Panel	Fenotípus	Patogén mutáció	VUS	Benignus polimorfizmusok
IL029	EP 1.0P	NF1	NF1 g.2955370 3G>A splice site variant	-	RET p.G691S; MEN1 p.R176
IL030	EP 1.0P	NF1	NF1 g.2 29679283 insG frame shift	-	RET G691S
IL031	EP 1.0P	Phaeo	-	-	-
IL032	EP 1.0P	NF1	NF1 V1371V? Frame shift	-	-
IL033	EP 1.0P	Phaeo	-	-	-
IL035	EP 1.0P	Phaeo	-	-	SDHA p.G416S; RET p.G691S; SDHA p.Y581F
IL036	EP 1.0P	Phaeo	-	-	SDHA p.V657I; SHDA p.Y629F; RET p.G691S
IL037	EP 1.0P	Phaeo	-	-	KIF1B p.Y1087C
IL038	EP 1.0P	Phaeo	-	-	SDHA: p.D38V; KIF1B: p.Y1087C; RET: p.G691S

Minta azonosító	Panel	Fenotípus	Patogén mutáció	VUS	Benignus polimorfizmusok
IL039	EP 1.0P	PGL-glomus caroticum	VHL E37ESGP EE	-	-
IL040	EP 1.0P	Phaeo	-	-	EGLN1: p.Q157H; RET p.G691S
IL041	EP 1.0P	malignus PGL	SDHB c.263C>T; SDHB c.268C>G c.269- 271delGA A	-	-
IL042	EP 1.0P	Phaeo	-	-	
IL044	EP 1.0P	Phaeo	-	-	MEN1 p.R176Q; RET p.G691S
IL045	EP 1.0P	Phaeo	-	-	EGLN1 p.C127S; RET: p.G691S
endo2_01	EP 2.0	Phaeo	-	EPAS1 p.S12L	EGLN1 p.C127S; GOT2: p.V346G; MDH2 A9V
endo2_02	EP 2.0	Phaeo	SDHB p.L65F	-	EGLN1: p.Q157H; EGLN1 p.C127S; GOT2: p.V346G; RET: p.G691S

Minta azonosító	Panel	Fenotípus	Patogén mutáció	VUS	Benignus polimorfizmusok
endo2_03	EP 2.0	Phaeo	-	-	EGLN1 p.C127S; EPAS1 p.T766P; SDHA: p.Y629F; SDHA p.V657I; RET p.G691S; GOT2 p.V346G
endo2_04	EP 2.0	Phaeo	-	SDHD p.G12S	EGLN1 p.C127S; MDH2 p.A9V; GOT2: p.A2S; GOT2 p.V346G
endo2_05	EP 2.0	Phaeo	-	-	SDHA: p.Y629F (rs6960); p.V657I (rs6962); GOT2: p.V346G (rs30842)
endo2_06	EP 2.0	Phaeo	-	-	GOT2 p.V346G
endo2_08	EP 2.0	Phaeo	-	-	EGLN1 p.C127S; GOT2 p.A2S; GOT2 p.V346G
endo2_09	EP 2.0	Phaeo	-	-	-
endo2_19	EP 2.0	Phaeo/PGL	VHL: c.576delA	-	GOT2 p.G188S; GOT2 p.V346G
endo2_20	EP 2.0	Phaeo	-	-	MDH2 p.A9V, GOT2 p.V346G
endo2_22	EP 2.0	Phaeo és PGL	SDHB c.286+2T> A (splice)	KIF1B p.T873I	MDH2 p.K301R, GOT2 p.V346G

Minta azonosító	Panel	Fenotípus	Patogén mutáció	VUS	Benignus polimorfizmusok
endo2_24	EP 2.0	Phaeo	FH: p.Q376P	-	KIF1B p.Y1133C; SDHA p.Y629F; SDHA p.V657I; EGLN1 p.C127S; RET p.G691S; MDH2 p.K301R; GOT2 p.V346G
endo2_25	EP 2.0	Phaeo	-	-	SDHA: p.Y629F; SDHA p.V657I; GOT2 p.A2S; GOT2 p.V346G
endo2_27	EP 2.0	Phaeo	-	-	EGLN1 p.C127S; RET G691S; GOT2 p.V346G
endo2_28	EP 2.0	hasi PGL	SDHB p.R230H	-	SDHA p.D38V; GOT2 p.V346G; MDH2 p.A9V
endo2_30	EP 2.0	Phaeo	-	-	SDHA p.Y629F; SDHA p.V657I; RET p.G691S ; GOT2 p.A2S; GOT2 p.V346G
endo2_31	EP 2.0	Phaeo	-	-	KIF1B p.Y1133C; SDHA p.V657I; GOT2 p.A2S; SDHA p.V346G; MDH2 p.K301R

Minta azonosító	Panel	Fenotípus	Patogén mutáció	VUS	Benignus polimorfizmusok
endo2_32	EP 2.0	Malignus Phaeo	-	GOT2: p.R393Q	MDH2 p.A9V; GOT2 A2S; GOT2 p.V346G
endo2_34	EP 2.0	Phaeo	-	-	MDH2 p.A9V; GOT2 p.V346G
endo2_37	EP 2.0	Phaeo	-	-	RET p.G691S
endo2_39	EP 2.0	nyaki PGL	-	-	SDHA p.V657I
441-19	EP 2.0	NF1	NF1: c.3455_34 56insA (p.L1153fs)	-	SDHA: p.Y629F; SDHA p.V657I; RET p.G691S; RET p.R982C; MDH2 p.A9V; GOT2 p.V346G; MDH2 p.K301R
P7-20	EP 2.0	Phaeo	-	-	RET p.G691S; MDH2 p.A9V
225-19	EP 2.0	NF1	NF1 c.e8+2T> G, splice mutáció	SDHD G12S	RET p.G691S; GOT2 p.V346G; MDH2 p.A9V
P468-19	EP 2.0	Phaeo	-	-	EGLN1 p.Q157H; EGLN1 p.C127S; GOT2 p.V346G; MDH2 p.A9V
P81-20	EP 2.0	Leiomyoma- tosis	FH: c.1256C> T	-	GOT2 p.A2S; GOT2 p.V346G

(p.S419L)

Minta azonosító	Panel	Fenotípus	Patogén mutáció	VUS	Benignus polimorfizmusok
P28-20	EP 2.0	Phaeo	-	-	MEN1 p.R171Q; GOT2: p.G188S; GOT2 p.V346G
311-19	EP 2.0	Phaeo	-	MDH2: p.R229G	SDHA p.Y629F; SDHA p.V657I; GOT2 p.V346G; MDH2 p.K301R
P365-19	EP 2.0	Phaeo	-	SDHA p.M279I	SDHA p.D38V; EGLN1 p.C127S; RET p.G691S; GOT2 p.G188S; GOT2 p.V346G; MDH2 p.A9V
P455-19	EP 2.0	Phaeo	-	-	RET p.G691S; GOT2 p.V346G
182-19	EP 2.0	Phaeo	-	-	RET p.G691S; GOT2 p.V346G; MDH2 p.K301R

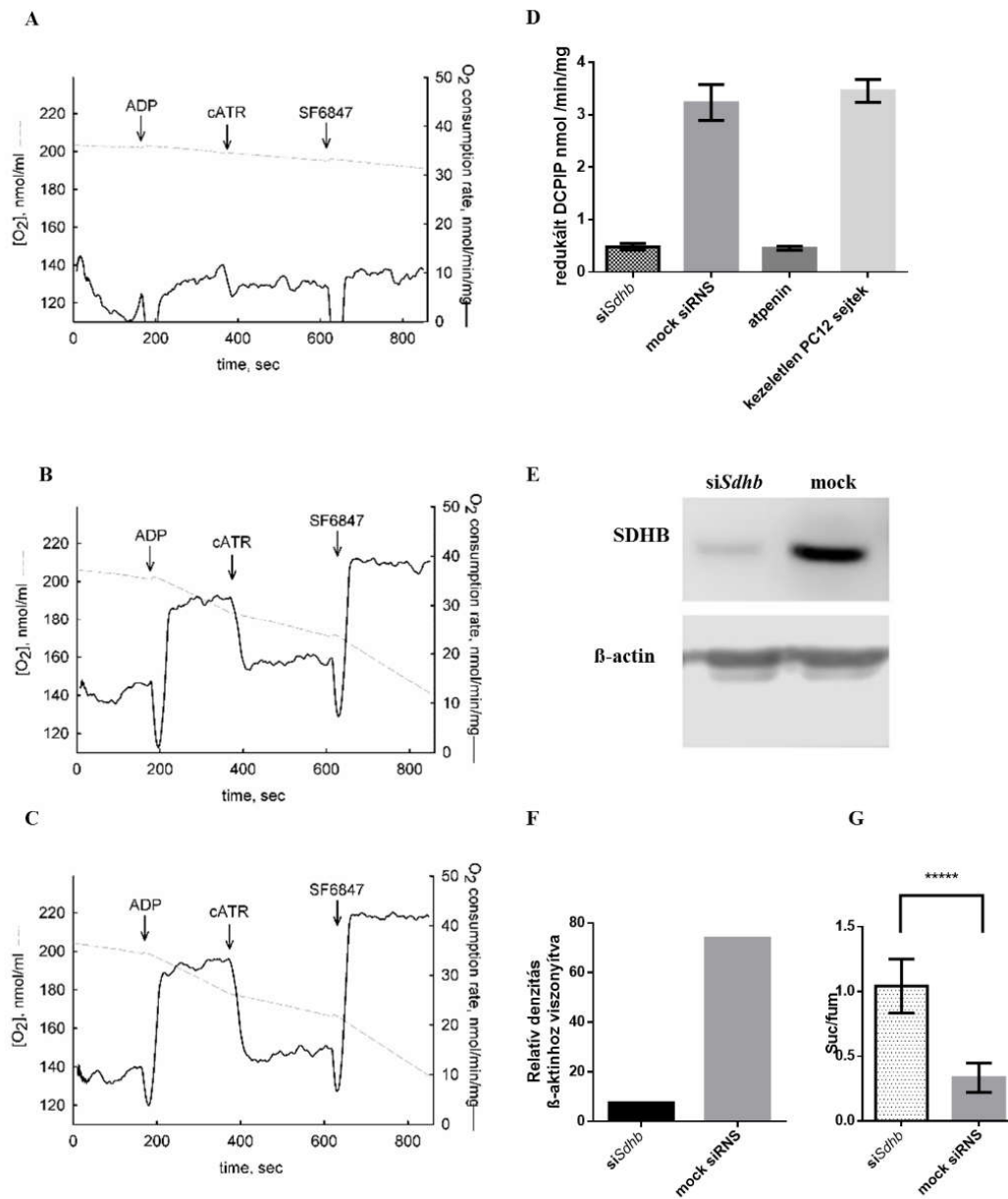
Minta azonosító	Panel	Fenotípus	Patogén mutáció	VUS	Benignus polimorfizmusok
P467-19	EP 2.0	Phaeo	-	RET p.Y791F	MDH2 p.K301R; GOT2 p.G188S; GOT2 p.V346G
307-19	EP 2.0	NF1	NF1 c.6850_68 53delACT T	SDHC p.T32A	GOT2 p.A2S; GOT2 p.G188S; GOT2 p.V346G; MDH2 A9V
284-19	EP 2.0	Phaeo	-	-	SDHA p.Y629F; p.V657I; GOT2 p.V346G
276-19	EP 2.0	Phaeo	-	-	RET p.G691S; GOT2 p.V346G
208-19	EP 2.0	Phaeo	-	-	RET p.G691S; MDH2 p.A9V; GOT2 p.V346G
298-19	EP 2.0	NF1	NF1 c.e23- 1G>C (splice mutáció)	-	RET p.G691S; GOT2 p.V346G

Tumorbiológiai vizsgálatok eredményei

4.2.4 Az *Sdhb* csendesítése hatékonyan csökkenti az SDH aktivitást

PC12 sejteket két különböző, *Sdhb* gént célzó kis interferáló RNS-sel transzfektáltunk, majd 48 óra inkubálást követően vizsgáltuk a SDH enzimaktivitását, illetve az SDHB fehérje szintjét. A SDH aktivitás hatékony gátlását értük el a mock transzfektált és a kezeletlen sejtekhez képest (8. ábra). A két csendesítő siRNS alkalmazásával

hatékonyan csökkentettük az SDHB alegység expresszióját. A szukcinát/fumarát arányt kutatócsoportunk sikerrel alkalmazta *SDHB/SDHD* mutáns paragangliómák elkülönítése esetében [123], ezért ezt az aránypárt használtuk fel az SDH enzimgátlás hatékonyságának követésére. Szignifikánsan magasabb szukcinát/fumarát arányt értünk el az *Sdhb* csendesített PC12 sejtekben a mock transzfektált sejtekhez képest. (8. ábra)

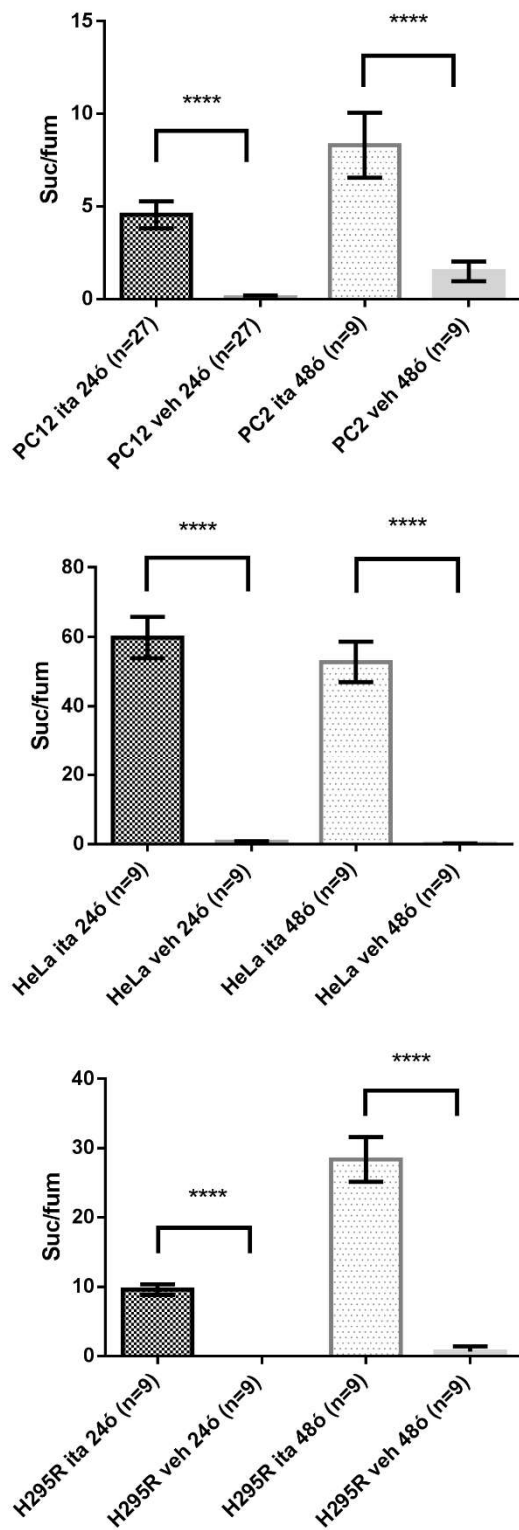


8. ábra. Az *Sdhb* gátlás hatásai PC12 kromaffin sejtekben. A-C: PC12 sejtek oxigénfogyasztása. A szürke vonal jelzi az oxigén koncentráció időbeli változását a

mitokondrium egységnyi térfogati tömegével osztva. A hozzáadott reagenseket nyilak jelölik. A reagensek koncentrációi: ADP: 0,2 mM; cATR: 2 μ M; SF 6847: 1 μ M. **Panel A:** siSdhb transzfektált PC12 sejtek respirációja. **Panel B:** mock siRNS-sel transzfektált PC12 sejtek respirációja. **Panel C:** Kezeletlen PC12 sejtek respirációja. **Panel D:** SDH aktivitás siSdhb transzfekció, mock siRNS transzfekció, atpenin kezelt és kezeletlen PC12 sejtekben. Az siSdhb transzfekció hatékonyságát az ismert SDH gátló atpeninéhez hasonlítottuk. **Panel E:** SDHB fehérje Western-blot vizsgálata siSdhb transzfekciót követően. **Panel F:** Az SDHB fehérje denzitometriás kvantifikálása siSdhb transzfekciót vagy mock siRNS transzfekciót követően PC12 sejtekben. suc/fum: szukcinát-fumarát arány. ****: $p < 0,0001$

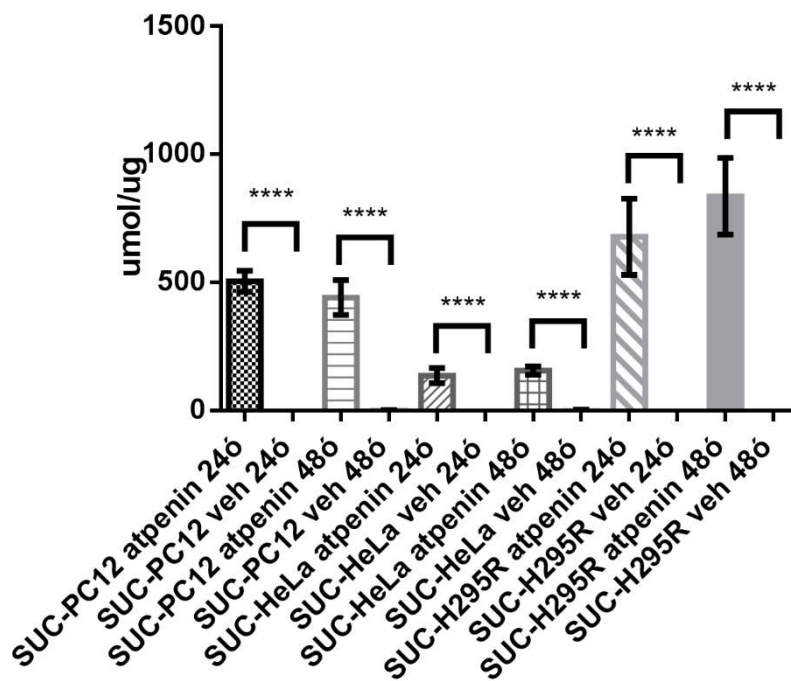
4.2.5 Az itakonát kezelés sikeresen gátolta az összes vizsgált sejtvonal SDH aktivitását

Az itakonát kezelés szignifikánsan megnövelte a PC12 sejtek szukcinát/fumarát arányát 24 óra ($p < 0,0001$) és 48 óra ($p < 0,0001$) kezelést követően. Hasonló eredményt kaptunk HeLa sejtek 24 órás ($p < 0,0001$) és 48 órás ($p < 0,0001$) itakonát kezelése során, valamint H295R sejtek 24 órás ($p < 0,0001$) és 48 órás ($p < 0,0001$) itakonát kezelését követően is. (9. ábra)



9. ábra: Szukcinát-fumarát arány itakonát kezelés hatására PC12, HeLa és H295R sejtekben. Ita: itakonát; veh: vivőanyag; suc/fum: szukcinát-fumarát arány. ****: $p < 0,0001$

4.2.6 Az atpenin kezelés sikeresen gátolta az összes vizsgált sejtvonal SDH aktivitását Szukcinát/fumarát arányokat atpenin kezelések esetén nem tudtuk megadni, mivel a kezelés hatására a fumarát koncentrációk méréshatáron aluli tartományba kerültek. Azonban PC12 sejtek esetén az SDH aktivitás vizsgálata (8. ábra) és a normalizált szukcinát koncentrációk (10. ábra) alapján hatékony SDH gátlást értünk el. Hasonlóan a PC12 sejtekhez, az atpenin szignifikáns szukcinát koncentráció emelkedést idézett elő HeLa és H295R sejtekben is. (10. ábra)



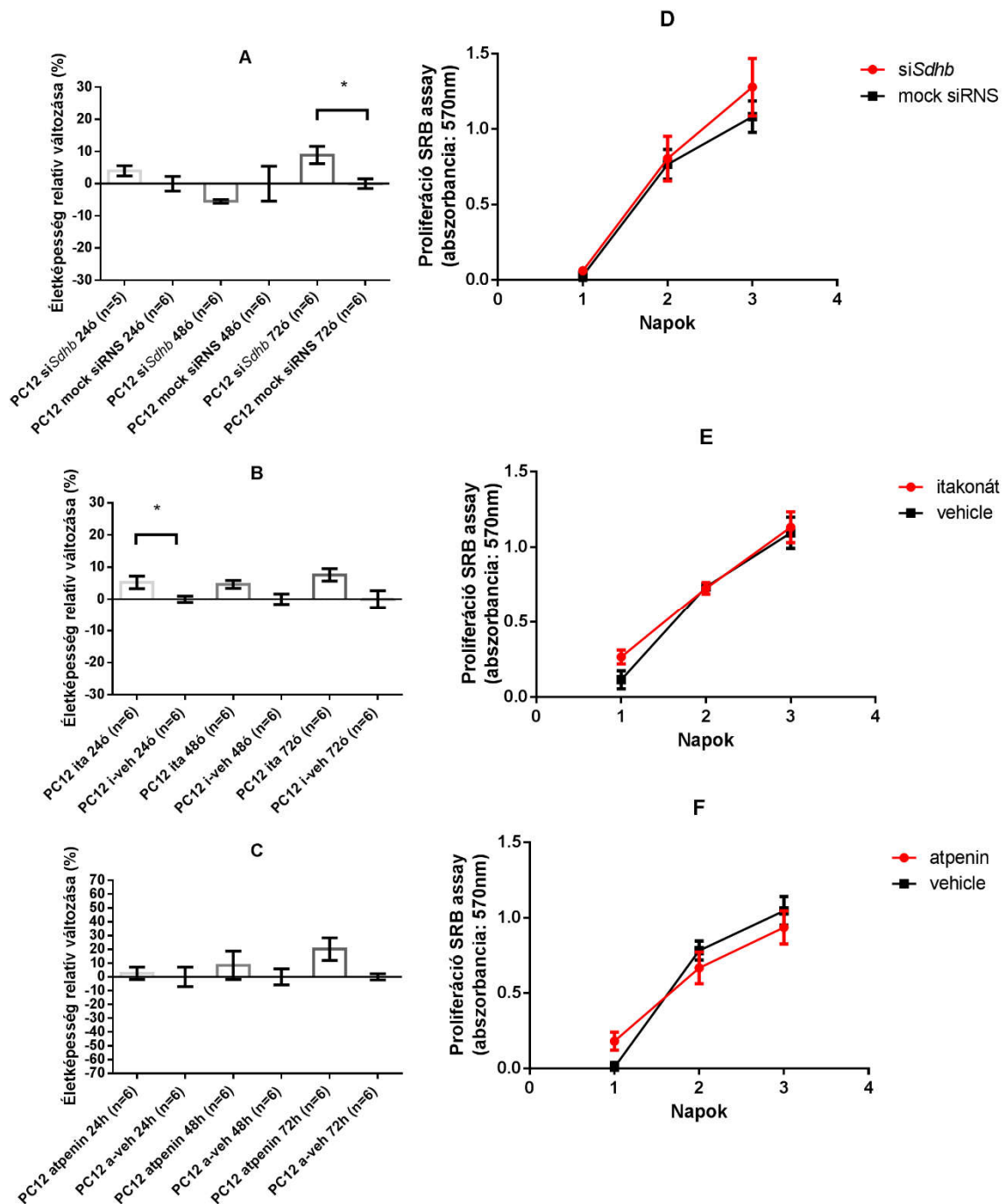
10. ábra: Normalizált szukcinát koncentrációk atpenin kezelés hatására PC12, HeLa és H295R sejtekben. SUC: szukcinát; veh: vivóanyag. ****: $p < 0,0001$

4.2.7 A SDH gátlása összességében pozitív hatással van a PC12 sejtek életképességére és nincs hatással a proliferációjukra

Az *Sdhb* gén csendesítése szignifikánsan növelte a PC12 sejtek életképességét 72 óra inkubációt követően ($p=0,04$). Az életképesség szignifikáns növekedését figyeltük meg

PC12 sejtek 24 órás itakonát kezelése után is ($p=0,026$). Az atpenin kezelés is pozitív hatással volt a PC12 sejtek életképességére, azonban a különbség egyik inkubációs időpontban sem mutatott szignifikáns értéket. (11. ábra)

A PC12 sejtek proliferációjára nem volt szignifikáns hatással az Sdhd gén csendesítése, itakonát vagy atpenin kezelés sem. (11. ábra)



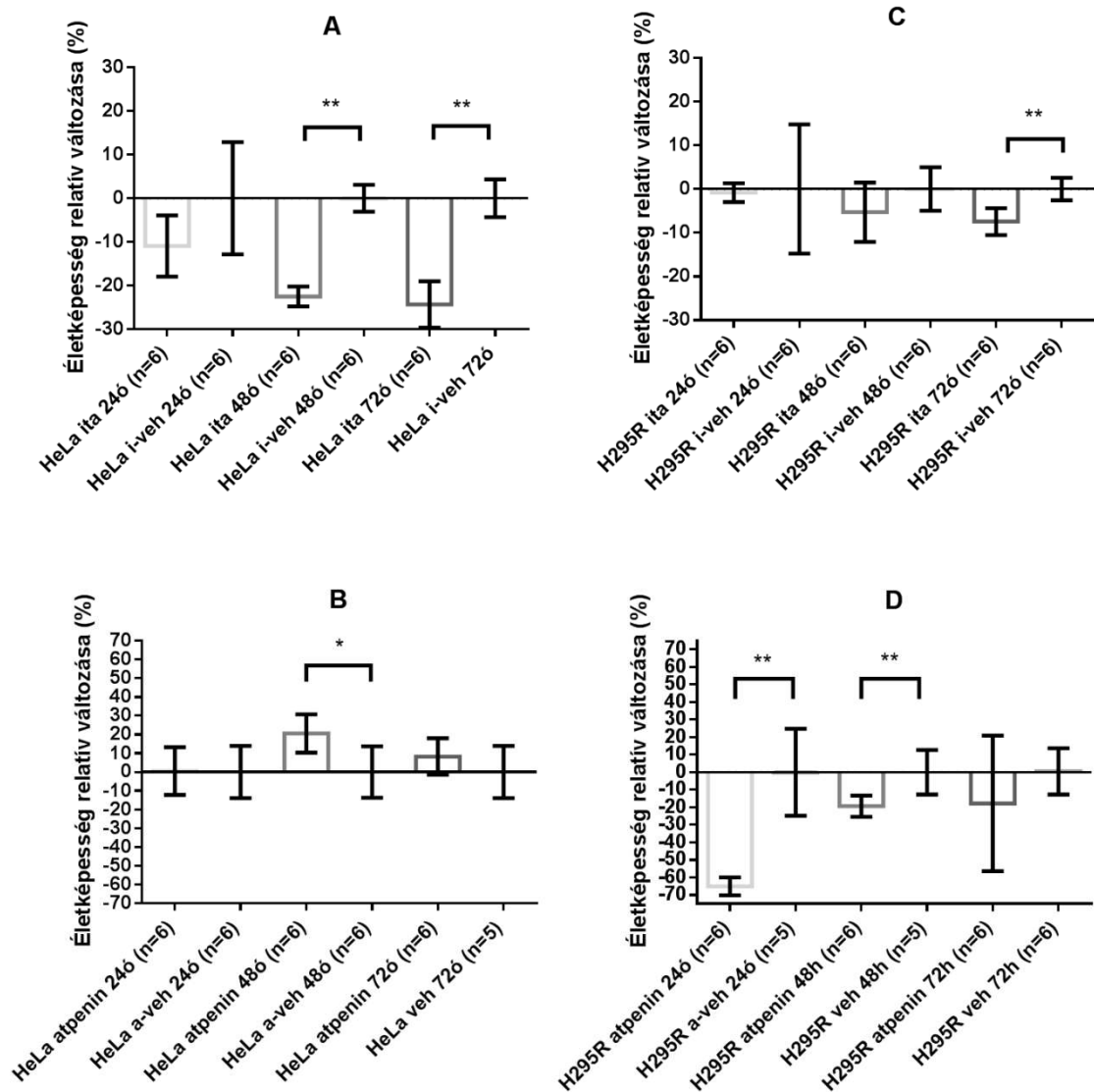
11. ábra: Az SDH gátlás hatása a PC12 sejtek életképességére és proliferációjukra. Az adatok átlag±standard hiba átlagaként vannak feltüntetve. A sejt életképesség értékei az adott kontrollokra vannak normalizálva. Az értékekből 100%-ot kivonva a változást ábrázoltuk kezelés hatására %-ban. **Panel A-C:** Életképesség relatív változása siSdhb, itakonát és atpenin kezelés hatására PC12 sejtekben 24, 48 és 72 óra inkubációt követően. **Panel D-F:** PC12 sejtek proliferációja siSdhb, itakonát és atpenin kezelést

követően. Ita: Itakonát; i-veh : itakonát vivőanyag ; a-veh : atpenin vivőanyag. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

4.2.8 Az itakonát csökkentette a HeLa és H295R sejtek életképességét, míg az atpenin csak a H295R sejtek életképességére gyakorolt negatív hatást

Az itakonát kezelés hatására a HeLa sejtek életképessége szignifikánsan csökkent 48 óra ($p=0,0022$) és 72 óra ($p=0,0022$) inkubációt követően. Ezzel ellentétben, az atpenin kezelés összességében pozitív hatással volt a HeLa sejtek életképességére, szignifikáns különbség 48 óra kezelés után ($p=0,015$) mutatkozott.

A H295R sejtek életképességére mindkét SDH gátló módszer negatív hatással volt: az itakonát 72 óra után ($p=0,0043$), az atpenin pedig 24 ($p=0,0043$) és 48 óra ($p=0,0173$) után csökkentette szignifikánsan a H295R sejtek életképességét. (12. ábra)



12. ábra. Az SDH gátlás hatása a HeLa és H295R sejtek életképességére. Az adatok $\text{átlag} \pm \text{standard hiba}$ átlagaként vannak feltüntetve. A sejt életképesség értékei az adott kontrollokra vannak normalizálva. Az értékekből 100%-ot kivonva a változást ábrázoltuk kezelés hatására %-ban. **Panel A-B:** Sejt életképesség relatív változása itakonát és atpenin kezelés hatására HeLa sejtekben 24, 48 és 72 óra inkubációt követően. **Panel C-D:** Sejt életképesség relatív változása itakonát és atpenin kezelés hatására H295R sejtekben 24, 48 és 72 óra inkubációt követően.

4.2.9 A glutamát és laktát koncentrációban mutatkozó változások SDH gátlószer és sejtípus specifikusak

PC12 sejtek esetében az Sdhb csendesítés laktát akkumuláció nélkül szignifikánsan csökkentette az intracelluláris glutamát szinteket ($p < 0,0001$) (5. Táblázat és 6. Táblázat). Itakonát kezelés esetében 24 óra után csökkent szignifikánsan a glutamát koncentráció ($p = 0,008$). Laktát akkumuláció sem 24, sem 48 óra itakonát kezelés után sem jelentkezett (5. táblázat és 6. táblázat).

PC12 sejtek esetében az atpenin kezelés szignifikáns glutamátszint csökkenéssel társult 24 óra ($p < 0,0001$) és 48 óra kezelést követően is ($p < 0,0001$). Ehhez, az itakonát kezeléssel ellentétben laktát akkumuláció is társult mind 24 óra ($p = 0,004$) mind 48 óra kezelést követően ($p < 0,0001$) (7. táblázat és 8. táblázat).

Szemben a PC12 sejtekkel, HeLa sejtek esetében 24 óra itakonát kezelést követően szignifikánsan emelkedtek a glutamát ($p = 0,004$) és laktát koncentrációk ($p = 0,013$). A fenti koncentráció emelkedések 48 óra kezelés után is megmaradtak a glutamát ($p < 0,0001$) és laktát koncentrációk ($p = 0,0181$) esetében is (5. táblázat és 6. táblázat).

Az atpenin kezelés a PC12 sejtekhez hasonlóan szignifikánsan csökkentette a glutamát koncentrációkat 24 ($p < 0,0001$) és 48 órát követően ($p < 0,0001$) ami szignifikáns laktát koncentráció emelkedéssel társul 24 ($p = 0,0039$) és 48 óra elteltével is ($p < 0,0001$) (7. táblázat és 8. táblázat).

H295R sejtek esetében a HeLa sejtekhez hasonló eredmények születtek: 24 óra itakonát kezelést követően szignifikánsan emelkedtek a glutamát ($p = 0,018$) és laktát koncentrációk ($p < 0,001$) (5. táblázat és 6. táblázat).

Az atpenin kezelés hasonló eredményt hozott H295R sejtek esetében is: szignifikánsan csökkent a sejten belüli glutamát koncentráció 24 ($p < 0,0001$) és 48 órát követően ($p < 0,0001$) ami szignifikáns laktát koncentráció emelkedéssel társul 24 ($p < 0,0001$) és 48 óra elteltével is ($p = 0,004$) (7. táblázat és 8. táblázat).

A további különbségeket a metabolit koncentrációkban a 13. 14. és a 15. ábrák szemléltetik.

5. Táblázat Intracelluláris normalizált metabolit koncentrációk ($\mu\text{mol}/\text{ug}$). Minden adat átlag \pm szórásként van megadva. ita: itakonát; veh: vehicle (vivőanyag) kezelés; FUM: fumarát; LAC:laktát; MAL: malát; PYR: piruvát; NA: nem alkalmazható.

Minta	FUM	<i>p</i>	LAC	<i>p</i>	MAL	<i>p</i>	PYR	<i>p</i>
PC12 ita 24ó	7,9 \pm 1,1		278,1 \pm 58,6		20,2 \pm 2,5		109,4 \pm 41	
PC12 veh 24ó	9,9 \pm 1 24ó	< 0,0001	264,3 \pm 66,6	0,47	20,1 \pm 2,1	0,9	88,9 \pm 24,8	0,25
PC12 ita 48ó	2,1 \pm 0,7		295,1 \pm 112,9		0		109,6 \pm 39,2	
PC12 veh 48ó	2 \pm 0,5 48ó	0,75	287,4 \pm 130,2	0,9	0	NA	91,7 \pm 39,4	0,35
PC12 <i>siSdhb</i>	2,8 \pm 0,7		217,4 \pm 100		33,9 \pm 10,1		45,2 \pm 17,9	
PC12 mock <i>siRNS</i>	3,7 \pm 0,1	0,001	238,4 \pm 70,5	0,83	43,1 \pm 3,43	0,03	50,5 \pm 11,9	0,71
HeLa ita 24ó	2,8 \pm 0,8		355,8 \pm 106,5		46 \pm 5,9		13,6 \pm 2,8	
HeLa veh 24ó	6,9 \pm 0,7	< 0,0001	243,7 \pm 24,6	0,014	35,2 \pm 8	0,02	8,8 \pm 1,5	0,0001
HeLa ita 48ó	2,5 \pm 0,3		1517,5 \pm 835,4		23,2 \pm 5,5		12,3 \pm 3,7	
HeLa veh 48ó	4,4 \pm 0,7	< 0,0001	877,9 \pm 90,3	0,02	26,2 \pm 3,7	0,53	11,8 \pm 1,6	0,73

Minta	FUM	<i>p</i>	LAC	<i>p</i>	MAL	<i>p</i>	PYR	<i>p</i>
H295R	2,5±		110,6±36,4		0		52±14,5	
ita 246	0,3			<		NA		<
H295R		0,001		0,0001				0,0001
veh	3±0,3		26,4±6,5		0		18,5±2,3	
246								
H295R	2,7±		278±115,9		38,1±6		24,5±9,9	
ita 486	0,4			0,19		0,71		0,14
H295R		0,001						
veh	3,6±		201,5±91,4		40,8±8,8		18,6±5,5	
486	0,5							

6. táblázat: Intracelluláris normalizált metabolit koncentrációk ($\mu\text{mol}/\text{ug}$). Minden adat átlag \pm szórásként van megadva. ita: itakonát; veh: vehicle (vivőanyag) kezelés; SUC: szukcinát; ASP:aszpartát; GLU: glutamát; CIT: citrát; NA: nem alkalmazható.

Minta	SUC	<i>p</i>	ASP	<i>p</i>	GLU	<i>p</i>	CIT	<i>p</i>
PC12 ita 24ó	35,2 \pm 3,8		209,3 \pm 27,3		849,8 \pm 74,2		31,16 \pm 2,2	
PC12 veh 24ó	0,9 \pm 1,1	< 0,0001	207,9 \pm 16,2	0,43	895, 2 \pm 40,6	0,008	33,75 \pm 2,2	< 0,0001
PC12 ita 48ó	16,7 \pm 3,5		85,3 \pm 19,9		455,1 \pm 90,7		55,4 \pm 13,6	
PC12 veh 48ó	2,8 \pm 0,4	< 0,0001	94,2 \pm 9,2	0,25	474,8 \pm 23,9	0,54	41,4 \pm 2,2	0,08
PC12 si <i>Sdhb</i>	2,8 \pm 0,4		122,5 \pm 26,7		496,5 \pm 110,2		0	
PC12 mock siRNS	1,2 \pm 0,4	< 0,0001	208,3 \pm 31,2	< 0,0001	743,5 \pm 71,7	< 0,0001	0	NA
HeLa ita 24ó	169 \pm 49,8		35 \pm 7,2		489,7 \pm 113,5		21,5 \pm 2,7	
HeLa veh 24ó	3,5 \pm 0,7	< 0,0001	44,1 \pm 15,2	< 0,0001	328 \pm 63,7	0,047	9,6 \pm 7,2	< 0,0001
HeLa ita 48ó	130,9 \pm 24,2		16,2 \pm 2,8		496,3 \pm 49,5		0	
HeLa veh 48ó	0,9 \pm 0,08	< 0,0001	45,4 \pm 4,1	< 0,0001	328,2 \pm 34,3	< 0,0001	0	NA

Minta	SUC	<i>p</i>	ASP	<i>p</i>	GLU	<i>p</i>	CIT	<i>p</i>
H295R ita 24ó	24,2±2,7		92±17,3		174,5±24,5		41,4±4,6	
H295R veh 24ó	0,007± 0,02	0,0001	96±7	0,25	151,2±9,6	0,02	38,5±2,2	0,102
H295R ita 48ó	76,9±11		67,9±8,8		309,4±41,4		13±1	
H295R veh 48ó	2,65± 3,38	0,0001	101,7±12,3	0,0001	294,8±35,4	0,48	7,5±5,7	0,0001

7. táblázat. Intracelluláris normalizált metabolit koncentrációk (µmol/ug). Minden adat átlag±szórásként van megadva. ita: itakonát; veh: vehicle (vivőanyag) kezelés; FUM: fumarát; LAC:laktát; NA: nem alkalmazható.

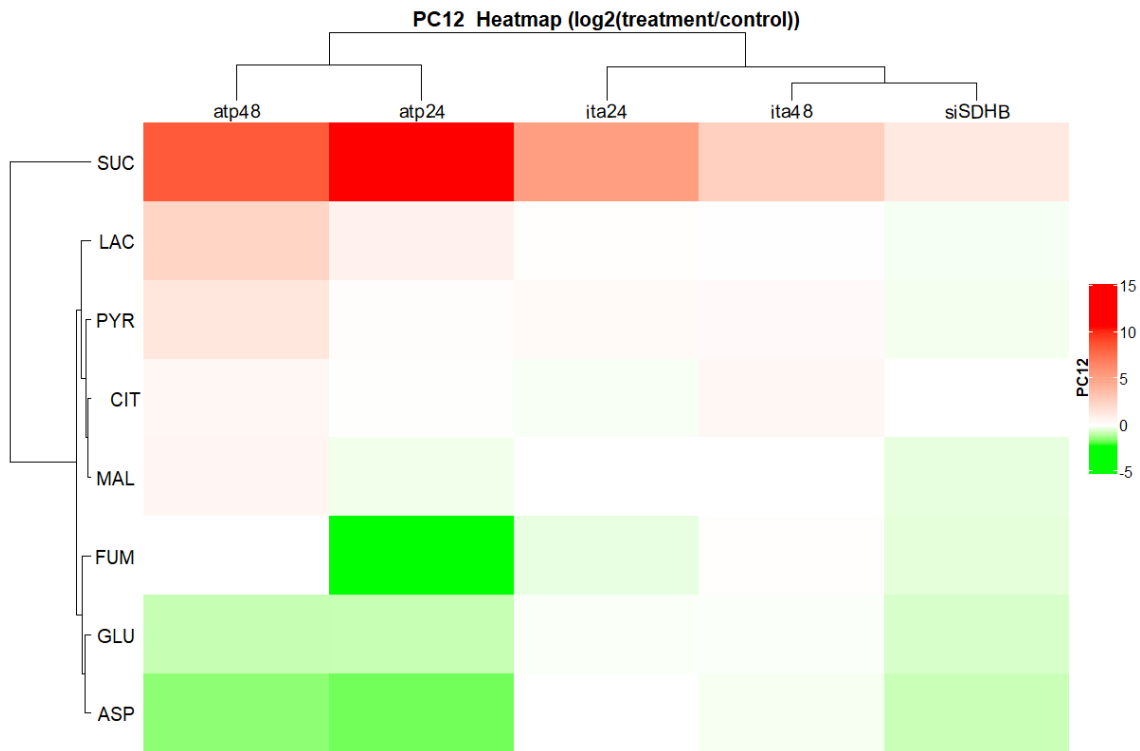
Minta	FUM	<i>p</i>	LAC	<i>p</i>	MAL	<i>p</i>	PYR	<i>p</i>
PC12 atpenin 24ó	1,3± 0,5	< 0,0001	198,3±58		19±0,9		66±18	
PC12 veh 24ó	5,6± 0,6		122,1±48	0,004	22,2±0,9	< 0,0001	61,4±19	0,91
PC12 atpenin 48ó	0		332,2±240,2		14±2		51,6±36,4	
PC12 veh 48ó	1,7± 0,2	0,0001	67±36,8	0,0001	10±0,3	< 0,0001	20,7±10,1	0,023

Minta	FUM	<i>p</i>	LAC	<i>p</i>	MAL	<i>p</i>	PYR	<i>p</i>
HeLa								
atpenin	0		297,7±33,3		16±2,4		12,6±1,7	
24ó		<		0,004		0,6		0,9
HeLa	1,9±	0,0001						
veh	0,3		197,7±77,5		16,5±1,8		12,7±4,3	
24ó								
HeLa								
atpenin	0		785,2±188,4		35,8±4,2		4,5±1,5	
48ó		<		<		<		0,0003
HeLa	5,1±	0,0001		0,0001		0,0001		
veh	0,8		785,2±188,4		15,7±1,7		8,3±1,9	
48ó								
H295R								
atpenin	0		372,7±166,4		35,5±1,5		23,8±6,7	
24ó		<		<		<		0,02
H295R	3,5±	0,0001		0,0001		0,0001		
veh	0,7		70,9±56,8		28,1±2,8		29,5±14,3	
24ó								
H295R								
atpenin	0		1473,1±761,1		73,9±10,6		29,5±14,3	
48ó		<		0,004		<		0,08
H295R	3,8±	0,0001				0,0001		
veh	0,7		454,5±236,8		37,9±1,4		48,1±26,8	
48ó								

8. táblázat. Intracelluláris normalizált metabolit koncentrációk ($\mu\text{mol}/\text{ug}$). Minden adat átlag \pm szórásként van megadva. ita: itakonát; veh: vehicle (vivőanyag) kezelés; SUC: szukcinát; ASP:aszpartát; GLU: glutamát; CIT: citrát; NA: nem alkalmazható.

Minta	SUC	<i>p</i>	ASP	<i>p</i>	GLU	<i>p</i>	CIT	<i>p</i>
PC12								
atpenin	504,4 \pm 40,7		42,6 \pm 2,9		334,8 \pm 12,7		15,1 \pm 0,1	
24ó		<		<		<		<
PC12		0,0001		0,0001		0,0001		0,0001
veh	0,4 \pm 0,9		139,1 \pm 11,4		582,1 \pm 36,1		15,3 \pm 0,0	
24ó								
PC12								
atpenin	441 \pm 68,4		18,4 \pm 4,5		138,7 \pm 18,5		10,2 \pm 1,1	
48ó		<		<		<		<
PC12		0,0001		0,0001		0,0001		0,0001
veh	1,3 \pm 0,3		50,6 \pm 1,3		244,6 \pm 9		7,4 \pm 0,3	
48ó								
HeLa								
atpenin	136 \pm 29,5		6,8 \pm 1,3		51,8 \pm 10,2		10,4 \pm 1,2	
24ó		<		<		<		0,7142
HeLa		0,0001		0,0001		0,0001		
veh	0,4 \pm 0,6		14,8 \pm 2		93,1 \pm 11,2		10,2 \pm 1,1	
24ó								
HeLa								
atpenin	155,3 \pm 16,2		2,8 \pm 0,4		85 \pm 8,7		0	
48ó		<		<		<		NA
HeLa		0,0001		0,0001		0,0001		
veh	2 \pm 0,7		20,6 \pm 4		224,5 \pm 40,7		0	
48ó								

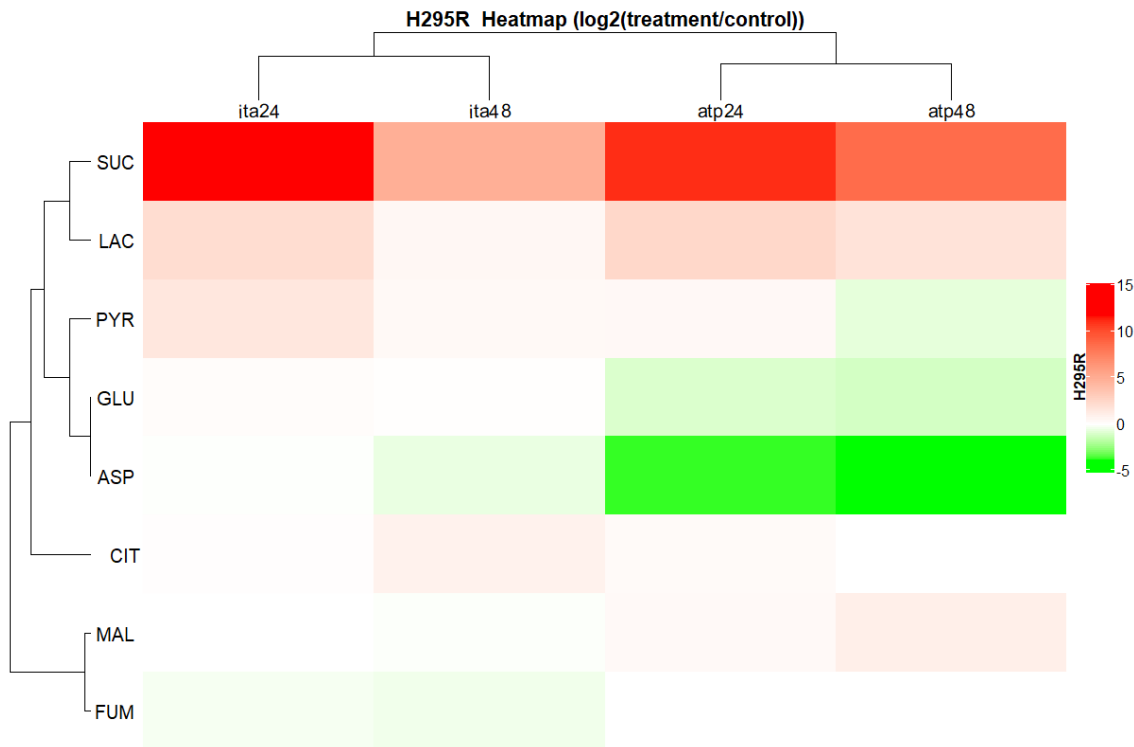
Minta	SUC	<i>p</i>	ASP	<i>p</i>	GLU	<i>p</i>	CIT	<i>p</i>
<hr/>								
H295R								
atpenin	678±148,7		7,4±0,7		83,5±3,4		22,2,	
24ó		<		<		<	±1,3	<
H295R		0,0001		0,0001		0,0001		0,0001
veh	0,3±0,9		100,7±20		165,2±30,7		17,8±1,3	
24ó								
<hr/>								
H295R								
atpenin	836±150		5,5±1,1		122,8±15,4		0	
48ó		<		<		<		NA
H295R		0,0001		0,0001		0,0001		
veh	0		85±9,9		277,1±18,3		0	
48ó								
<hr/>								



13. ábra: PC12 sejtekben mért metabolitkoncentrációk hőtérképes ábrázolása. Az egyes kezelések során mért koncentrációkat a kontrolljaik metabolit koncentrációival osztottuk. A kapott „fold change” eredmények log₂ értékeivel ábrázoltuk a változásokat a megfelelő színekkel (piros: növekedés; fehér: változatlan; zöld: csökkenés). atp24: 24 órás atpenin kezelés; atp48: 48órás atpenin kezelés; ita24: 24órás itakonát kezelés; ita48: 48 órás itakonát kezelés; siSDHB: Sdhb csendesítés; SUC: szukcinát; LAC: laktát; PYR: piruvát; CIT: citrát; MAL: malát; FUM: fumarát; GLU: glutamát; ASP: aszpartát.



14. ábra HeLa sejtekben mért metabolitkoncentrációk hőtésképes ábrázolása. Az egyes kezelések során mért koncentrációkat a kontrolljaik metabolit koncentrációival osztottuk. A kapott „fold change” eredmények log₂ értékeivel ábrázoltuk a változásokat a megfelelő színekkel (piros: növekedés; fehér: változatlan; zöld: csökkenés). atp24: 24 órás atpenin kezelés; atp48: 48órás atpenin kezelés; ita24: 24órás itakonát kezelés; ita48: 48 órás itakonát kezelés; SUC: szukcinát; LAC: laktát; PYR: piruvát; CIT: citrát; MAL: malát; FUM: fumarát; GLU: glutamát; ASP: aszpartát.

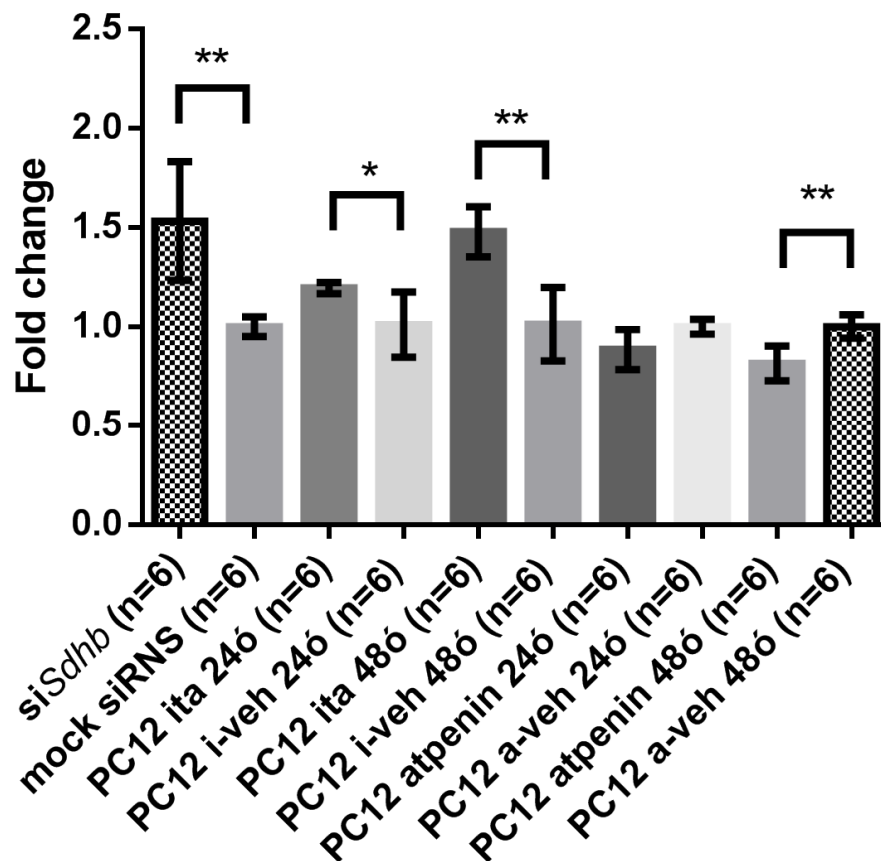


15. ábra **H295R sejtekben mért metabolitkoncentrációk hőtésképes ábrázolása.** Az egyes kezelések során mért koncentrációkat a kontrolljaik metabolit koncentrációival osztottuk. A kapott „fold change” eredmények log₂ értékeivel ábrázoltuk a változásokat a megfelelő színekkel (piros: növekedés; fehér: változatlan; zöld: csökkenés). atp24: 24 órás atpenin kezelés; atp48: 48órás atpenin kezelés; ita24: 24órás itakonát kezelés; ita48: 48 órás itakonát kezelés; SUC: szukcinát; LAC: laktát; PYR: piruvát; CIT: citrát; MAL: malát; FUM: fumarát; GLU: glutamát; ASP: aszpartát.

4.2.10 A GLS-1 gén expressziója összefüggést mutat a SDH enzim gátlásával

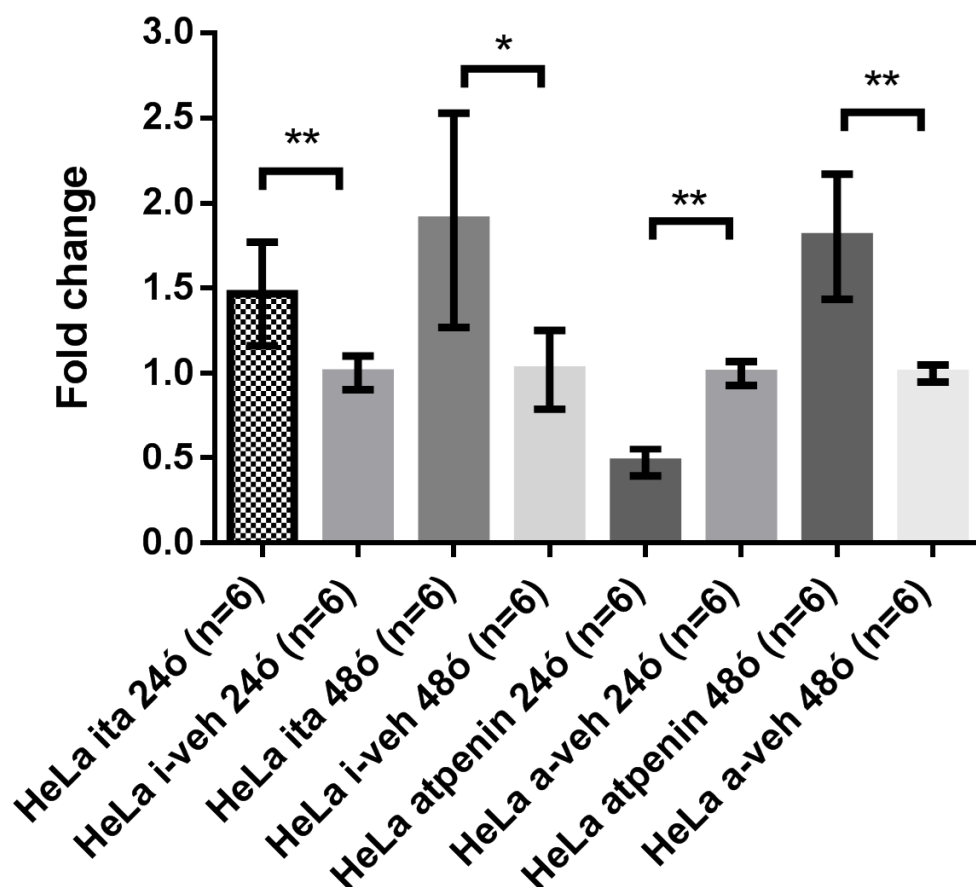
Az SDH gátlás utáni eltérő metabolit profilok nyomán a glutamin/glutamát anyagsere egyik kulcsenzimét, a mitokondriális glutamináz-1 (GLS-1) enzimet vizsgáltuk.

Szignifikáns növekedést mértünk PC12 sejtek GLS-1 génexpressziójában *Sdhb* gén csendesítését követően (fold change: $1,53 \pm 0,3$; $p=0,002$) illetve itakonát kezelés hatására ((24 fold change: $1,2 \pm 0,03$; $p=0,015$) és 48 órát követően is (fold change $1,48 \pm 0,13$; $p=0,002$)). Ezzel ellentétben az atpenin kezelés csökkentette a GLS-1 gén kifejeződését 24 óra után (fold change: $0,89 \pm 0,1$; $p=0,065$), 48 óra elteltével szignifikánsan (fold change: $0,82 \pm 0,09$; $p=0,002$) (16. ábra).



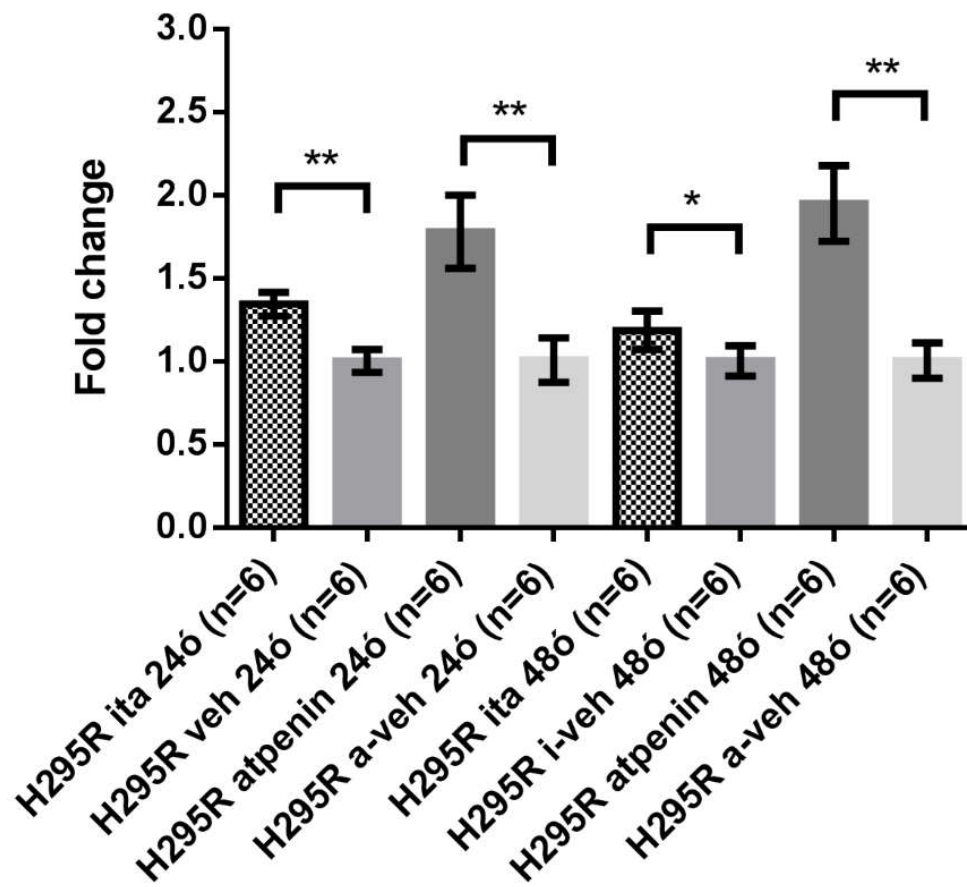
16. ábra: PC12 sejtek GLS-1 expresszió változása SDH gátlás után. Minden érték a kezelésnek megfelelő kontrollra van normalizálva. *siSdhb*: *Sdhb* géncsendesítés; *mock siRNS*: *siSdhb* géncsendesítés kontrollja; *ita*: itakonát; *i-veh*: itakonát kontroll; *a-veh*: atpenin kontroll. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

HeLa sejtek itakonát kezelésére hasonlóképpen reagáltak GLS-1 expresszió tekintetében: mind 24 (fold change: $1,47 \pm 0,3$, $p=0,002$) mind 48 (fold change: $1,9 \pm 0,63$, $p=0,015$) óra elteltével szignifikánsan nőtt a GLS-1 expresszió. Atpenin kezelés hatására 24 óránál szignifikáns csökkenést (fold change: $0,47 \pm 0,1$, $p=0,0022$), majd 48 óra elteltével szignifikáns növekedést (fold change: $1,8 \pm 0,4$, $p=0,002$) mértünk a sejtek GLS-1 expressziójában (17. ábra).



17. ábra: HeLa sejtek GLS-1 expresszió változása SDH gátlás után. Minden érték a kezelésnek megfelelő kontrollra van normalizálva. ita: itakonát; i-veh: itakonát kontroll; a-veh: atpenin kontroll. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

A H295R sejtek GLS-1 expressziója szintén szignifikánsan nőtt 24 óra (fold change: $1,34 \pm 0,1$; $p=0,0022$) és 48 óra (fold change: $1,19 \pm 0,1$, $p=0,0152$) itakonát kezelés hatására. Az atpenin kezelés szignifikánsan növelte a GLS-1 expressziót 24 (fold change: $1,78 \pm 0,2$; $p=0,0022$) és 48 órát követően is ($1,95 \pm 0,2$; $p=0,0022$). (18. ábra)



18. ábra: H295R sejtek GLS-1 expresszió változása SDH gátlás után. Minden érték a kezelésnek megfelelő kontrollra van normalizálva. ita: itakonát; i-veh: itakonát kontroll; a-veh: atpenin kontroll. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

4.2.11 A GLS és az SDHB immunhisztokémiai vizsgálata a GLS-1 enzim fontos szerepére utal

Az *in vitro* talált eredményeink nyomán Phaeo/PGL daganatok metszetein is megvizsgáltuk a GLS-1 és az SDHB expresszió, valamint a malignitás közötti összefüggéseket. Két csírasejtes mutációhoz társuló (*SDHB* és *RET*) daganatok metszeteit, illetve jóindulatú és rosszindulatú daganatok metszeteit hasonlítottuk össze GLS-1 festés tekintetében. Az SDHB fehérje csökkent jelenlétét igazoltuk *SDHB* mutáns tumorok esetében, míg pozitív festődést figyeltünk meg *RET* mutációhoz társult daganatok metszetein (9. Táblázat és 19. Ábra).

A *RET* mutációhoz társult és a sporadikus etiológiájú tumorokhoz képest erősebb GLS-1 festés volt megfigyelhető az *SDHB* mutációhoz társuló daganatokban, az eredmény azonban nem adódott szignifikánsnak (H-score: $87,8 \pm 64$ vs. $59 \pm 82,4$ *SDHB*-mutáns vs. *RET*-mutáns, $p=0,22$; H-score: $87,8 \pm 26$ vs. $53,6 \pm 47,8$ *SDHB*-mutáns vs. sporadikus, $p=0,15$). Az alacsony *SDHB* expressziót mutató tumorok 54%-a (7 a 13-ból) mutatott magas GLS-1 festődést, míg a magas *SDHB* festést mutató tumoroknak összesen csak a 22%-a (5 a 22-ből) mutatott magas GLS-1 festést ($p=0,07$).

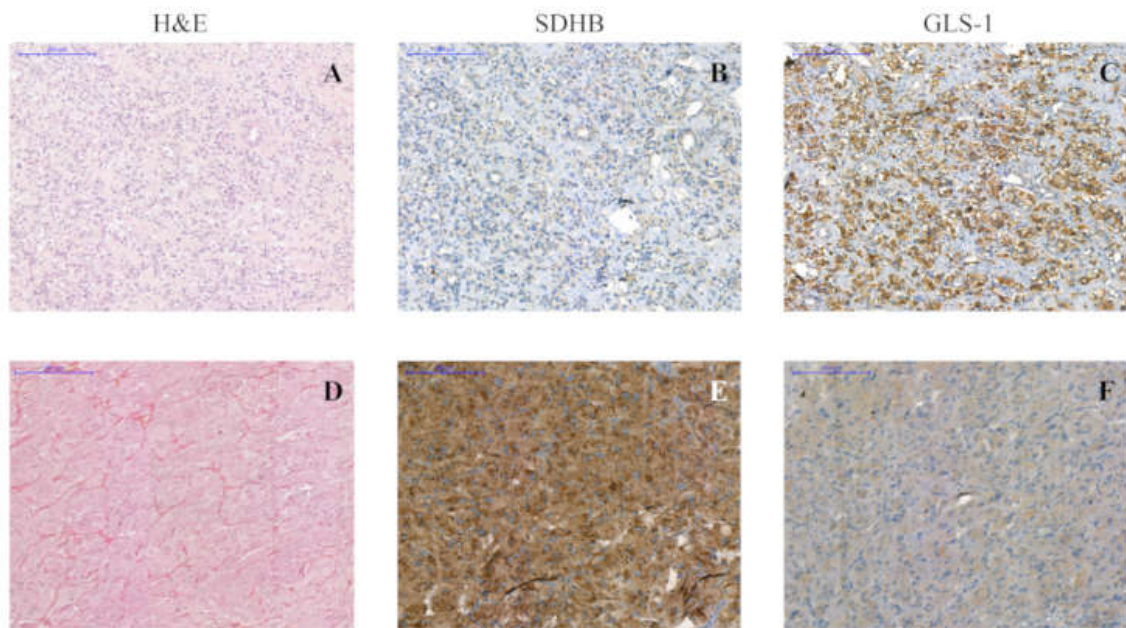
Három *RET*-mutációhoz társuló mintában mértünk erősebb GLS-1 expressziót. A háromból két daganatban nyilvánult malignusnak a tumor, a 4. (20. ábra) és 5. számú páciens visszatérő, lokális inváziót mutató és metasztázist adó tumorjai esetében. A harmadik daganatot, a 6. számú, MEN2A szindrómás páciens esetén bilaterális Phaeo igazolódott, a vizsgált minta a jobb oldali phaeochromocytóma volt.

A három malignus sporadikus tumor esetében kettő esetében volt mérhető magas *SDHB* score, miközben egyik tumor sem mutatott erősebb GLS-1 festést. A benignus sporadikus minták esetében a 4 alacsony *SDHB* festődést mutatóból kettőben volt erősebb GLS-1 expresszió kimutatható immunhisztokémiával. (9. táblázat)

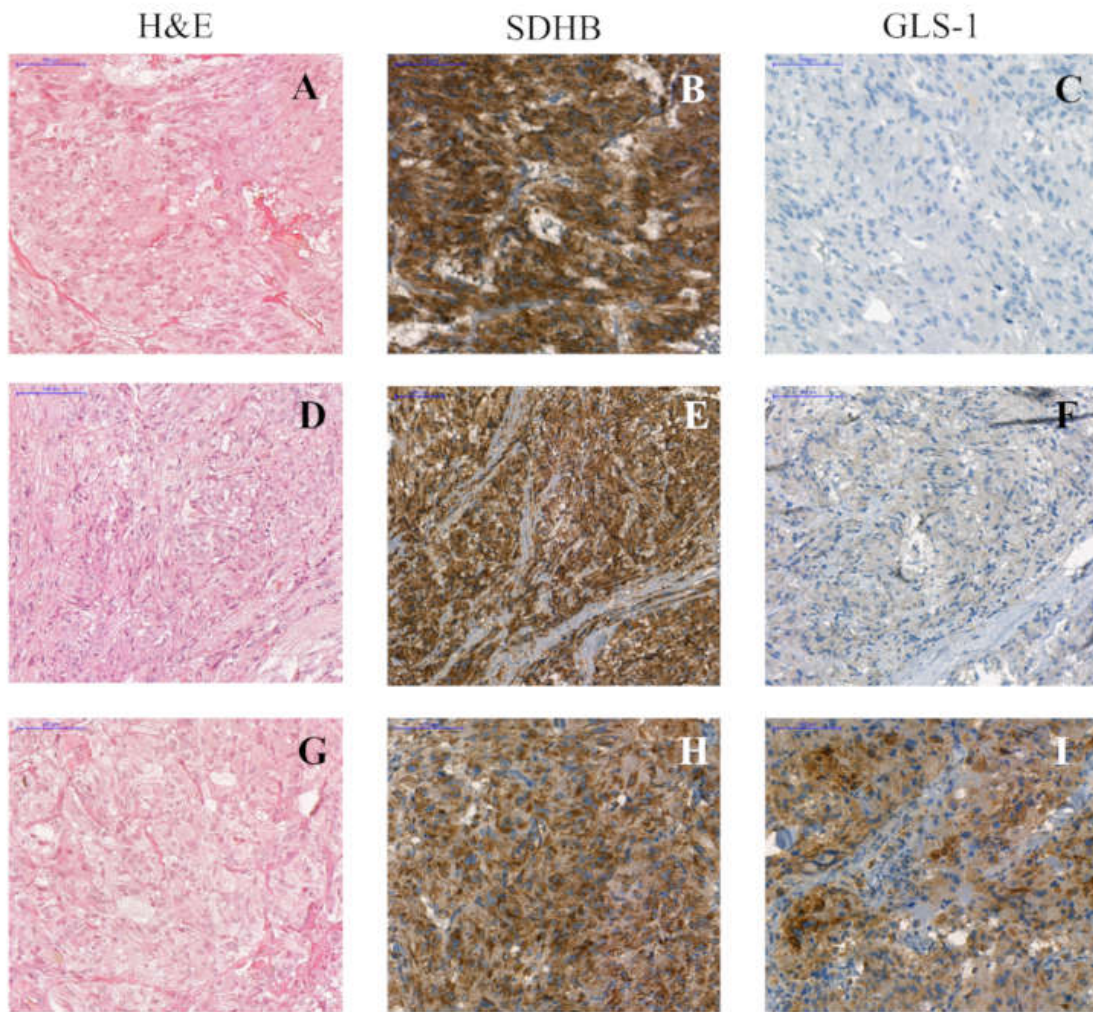
9. táblázat: Phaeo/PGL minták immunhisztokémiai vizsgálata. A tumorokat malignusnak véleményeztük, ha a tumor visszatérő volt vagy lokális invázióval, esetleg távoli metasztázisa jelentkezett. * A páciens egy 16x13x9cm-es Phaeoval jelentkezett, mely a szövettani vizsgálaton nem mutatott malignitásra utaló jelet, azonban preoperatív MRI vizsgálat multiplex csontmetasztázisokat igazolt. Phaeo: pheochromocytoma, PGL: paraganglióma.

Nr.	Tumor típusa	Biológiai viselkedés	Csírasejtes mutáció	Életkor műtét évében	SDHB	GLS-1
					H-Score	H-Score
1.1	PGL	Malignus	<i>SDHB</i> p.C243Y	32	0	15
1.2	PGL	Malignus		34	65	150
2	PGL	Malignus	<i>SDHB</i> p.C196G	32	10	160
3.1	Phaeo	Malignus *	<i>SDHB</i> p.T88I and R90 frame shift	14	90	110
3.2	Phaeo	Malignus		15	70	130
4.1	Phaeo	Benignus	<i>RET</i> p.C634R	18	160	0
4.2	Phaeo	Malignus		21	155	5
4.3	Phaeo	Malignus		22	210	10
4.4	Phaeo	Malignus		25	150	110
5.1	Phaeo	Benignus	<i>RET</i> p.C634W	31	123	37
5.2	Phaeo	Malignus		34	190	160
6	Phaeo	Benignus (bilateral)	<i>RET</i> p.C634R	46	200	240
7	Phaeo	Benignus	<i>RET</i> p.C634Y	34	115	20
8	Phaeo	Benignus	<i>RET</i> p.C609S	42	100	10
9	Phaeo	Benignus	<i>RET</i> p.C634Y	63	157	7
10	Phaeo	Benignus	sporadikus	49	110	10
11	Phaeo	Malignus	sporadikus	56	80	20
12	Phaeo	Benignus	sporadikus	47	140	120
13	Phaeo	Benignus	sporadikus	27	30	55

Nr.	Tumor típusa	Biológiai viselkedés	Csírasejtes mutáció	Életkor műtét évében	SDHB	GLS-1
					H-Score	H-Score
14	PGL	Malignus	<i>SDHB</i> c.424-1G>A	54	0	40
15	Phaeo	Benignus	sporadikus	62	180	95
16	PGL	Malignus	sporadikus	82	160	10
17	Phaeo	Malignus	sporadikus	18	120	10
18	Phaeo	Benignus	sporadikus	55	90	105
19	Phaeo	Benignus	sporadikus	56	110	10
20	PGL	Benignus	sporadikus	30	10	135
21	Phaeo	Benignus	sporadikus	41	115	10
22	Phaeo	Benignus	sporadikus	79	110	5
23	Phaeo	Benignus	sporadikus	53	200	105
24	Phaeo	Benignus	sporadikus	43	180	20
25	Phaeo	Benignus	sporadikus	71	-	90
26	Phaeo	Benignus	<i>SDHB</i> p.Q109X	47	10	10
27	Phaeo	Benignus	sporadikus	54	190	20
28	Phaeo	Benignus	sporadikus	65	140	30
29	Phaeo	Benignus	sporadikus	59	90	115



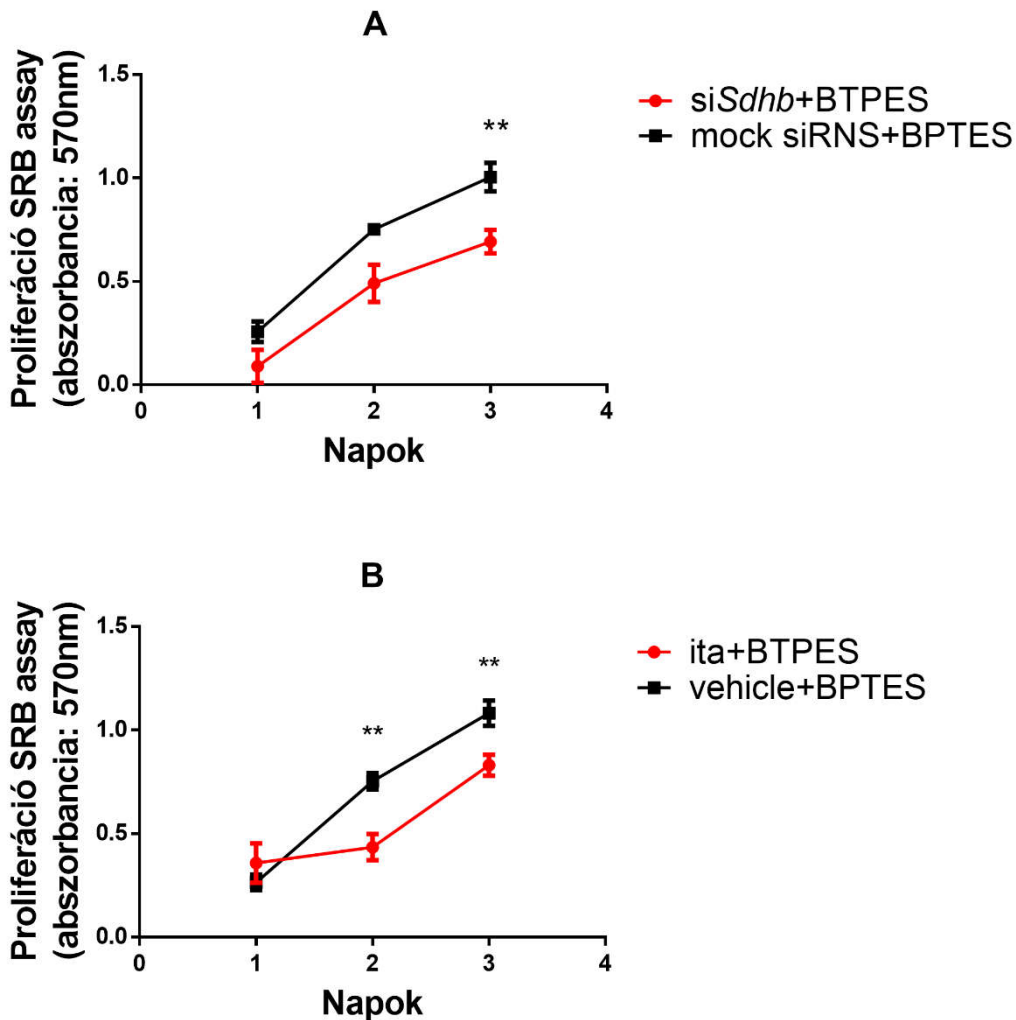
19. ábra: *SDHB* mutációhoz társuló malignus paraganglióma (A,B,C) és benignus *RET p.C634W* mutációhoz társuló pheochromocytóma (D,E,F) immunhisztokémiai elemzése. Csökkent mértékű SDHB festődés figyelhető meg az *SDHB* mutáns tumor metszetén (B), míg a *RET* mutációhoz társuló daganat erős SDHB festést ad (E). Erős GLS-1 festés figyelhető meg a malignus daganat esetében (C), ami a benignus tumor esetén nem mutatkozik (F). Skála: 200 μ m. H&E: hematoxilin és eozin festés; SDHB: SDHB fehérje specifikus festés; GLS-1: GLS-1 fehérje specifikus festés.

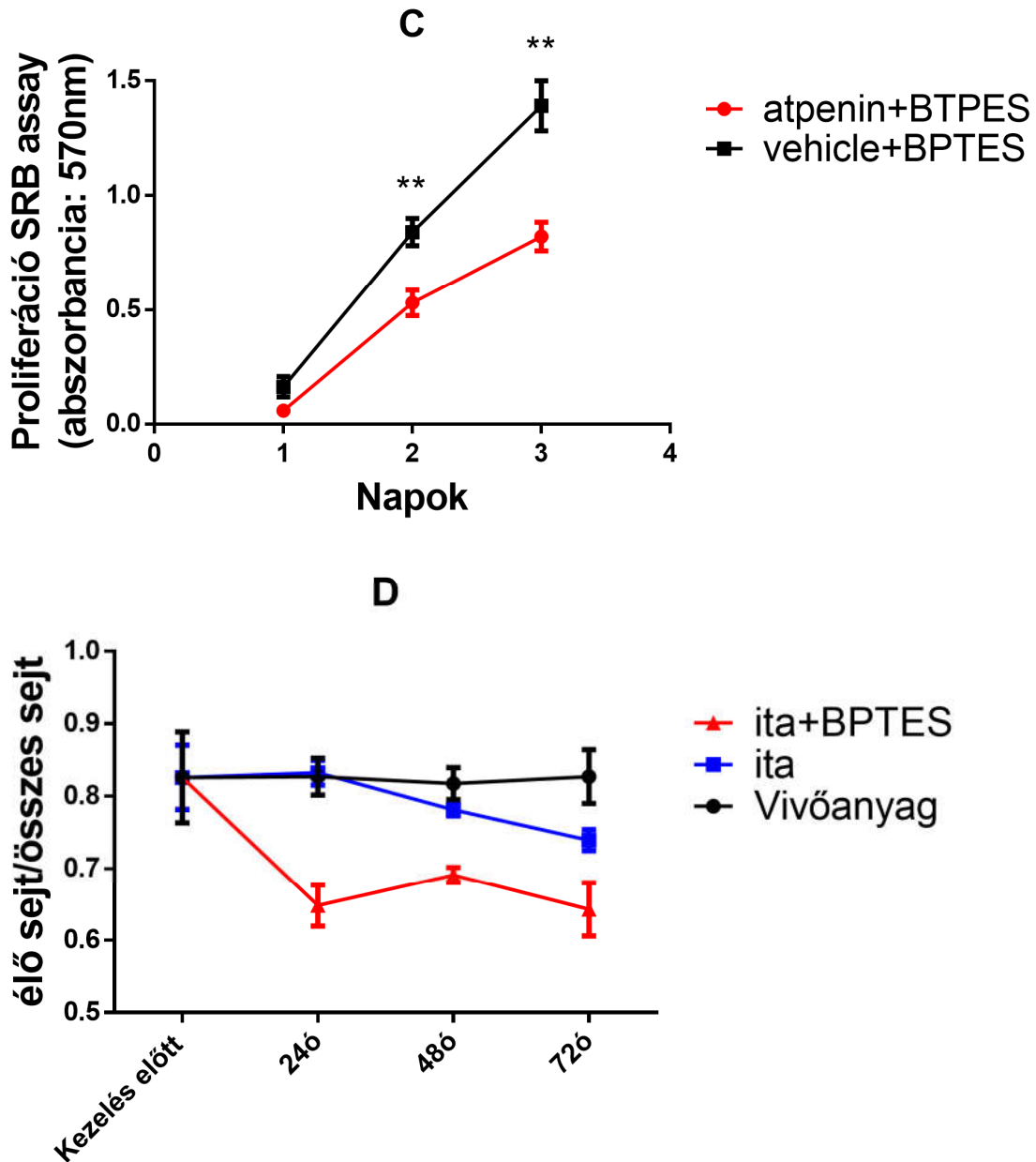


20. ábra: *RET* p.C634R mutációt hordozó beteg 3 különböző daganatának immunhisztokémiai elemzése. Erős SDHB festődés figyelhető meg (B,E,H). GLS-1 nem mutat erős jelet a primer (A,B,C), benignusnak véleményezett tumorban (C). Az első rekurrens daganat (D,E,F) enyhe (F), majd a távoli metasztázis (G,H,I) erős GLS-1 fehérje jelet mutat (I). Skála: 200 μ m. H&E: hematoxinin és eozin festés; SDHB: SDHB fehérje specifikus festés; GLS-1: GLS-1 fehérje specifikus festés.

4.2.12 Az SDH enzim és a GLS-1 együttes gátlása csökkenti a PC12 sejtek proliferációját

A GLS-1 fontosságát gátolt SDH funkció esetén *in vitro* sejtproliferáció vizsgálatával elemeztük. A GLS-1 gátláshoz bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2il)-etil szulfidot (BPTES), egy szelektív GLS-1 inhibitor, alkalmaztunk. A PC12 sejtek proliferációja BPTES kezelés hatására szignifikánsan csökkent Sdhb gén csendesítés esetén, 72 óra inkubációt követően ($p=0,009$); itakonát kezelés esetén 48 óra ($p=0,009$) és 72 óra ($p=0,009$) inkubációt követően; atpenin kezelés esetén 48 óra ($p=0,009$) és 72 óra ($p=0,002$) inkubációt követően (21. ábra).





21. ábra: A PC12 sejtek proliferációja BPTES kezelés hatására. A proliferációt szulforodamin B (SRB) mérésel értékeltük. (A–C) A BPTES kezelés hatása hagyományos egyrétegű PC12 sejtek esetében SDH gátlást követően. A kísérleteket hat biológiai párhuzamossal végeztem. (D) A BPTES és az itakonát hatása 3D szferoid PC12 sejttenyészetben. Az élő és összes sejt arányát ábrázoltuk a kezelés megkezdése előtt majd 24, 48 és 72 óra inkubációt követően. Minden csoport esetében legalább hat

párhuzamos kísérlet történt. Az értékek az átlag \pm standard hibát jelölik. SRB: szulforodamin B ; BPTES: bis-2-(5-fenilacetamido-1,3,4-tiadiazol-2il)-etil szulfid; Ita: itakonát; **: $p < 0,01$.

4.2.13 A 3D szferoid PC12 modellben a BPTES növeli a halott sejtek számát a kontrollhoz képest

Annak érdekében, hogy egy a daganatot jobban modellező *in vitro* környezetben is megvizsgáljuk feltevéseinket, 3D szferoid PC12 sejtmodell esetében vizsgáltuk a BPTES hatását az SDH itakonáttal történő gátlása mellett. Az itakonát kezelés önmagában nem csökkentette szignifikánsan az élő sejtek számát: a kontrollhoz képest 3 %-al 48 óra kezelés után és 9 %-al 72 óra kezelést követően. Azonban amikor az itakonátot BPTES-sel kombináltuk, 24 óránál 18%, 48 óránál 12%, 72 óránál pedig 18% csökkenést mértünk az élő sejtek arányában a vivőanyaghoz képest (minden mért pont esetén $p < 0,0001$) (21. ábra).

4.2.14 Oxigénfogyasztásos mérések

Az SDH gátlás biokémiai karakterizálása után a mitokondriális légzést vizsgáltuk SDH gátlást követően SeaHorse rendszerrel. Az *Sdhb* géncsendesítés hatásait „mock” transzfektált sejtek adataihoz, míg az itakonát és az atpenin kezelését kezeletlen PC12 sejtekéhez viszonyítottuk.

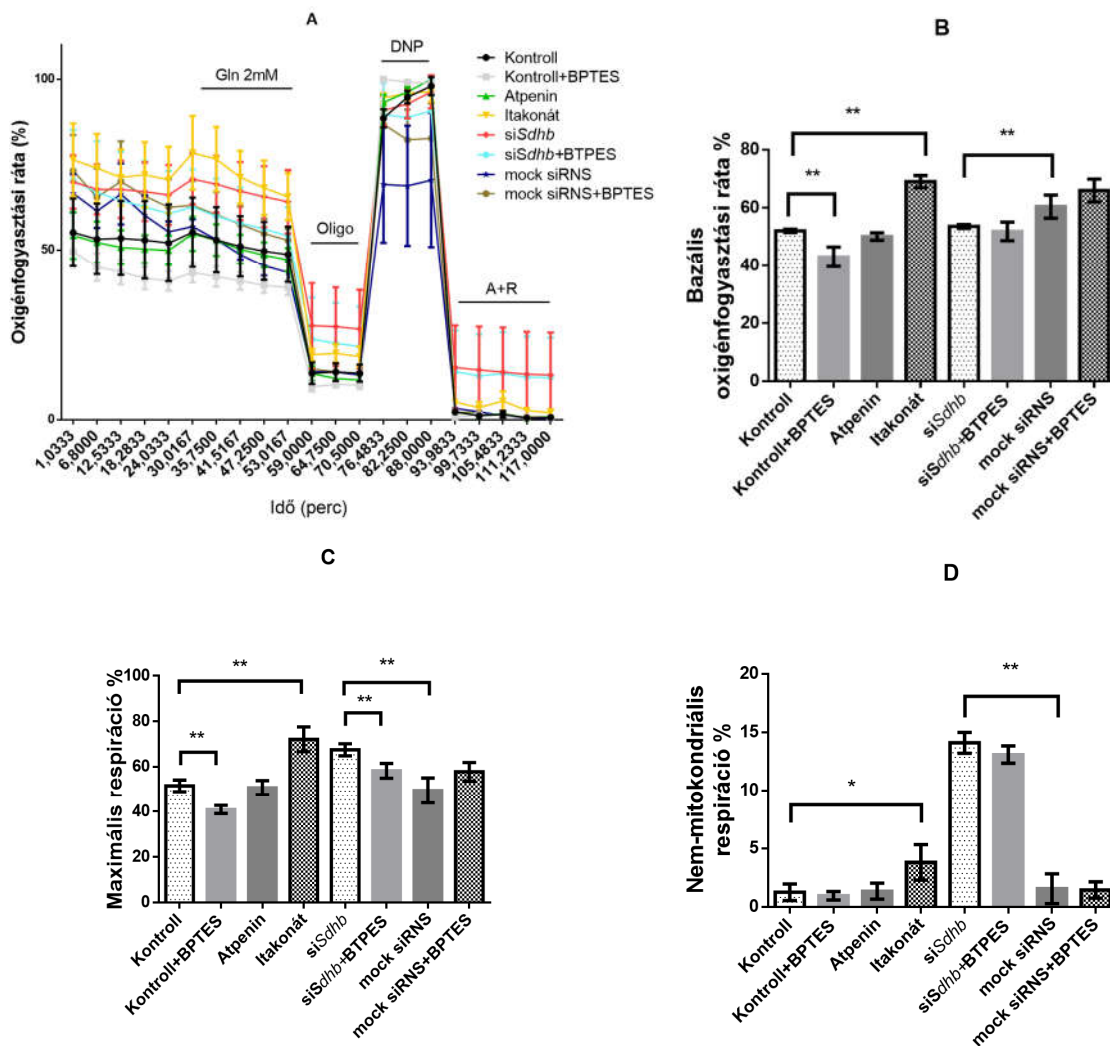
A BPTES-sel kezelt kontroll sejtek esetében volt a legalacsonyabb bazális respiráció, míg itakonát esetében a legmagasabb. A kontroll sejtekhez viszonyítva az itakonát kezelt PC12 sejtek szignifikánsan magasabb bazális oxigénfogyasztást mutattak ($p=0,007$), míg az *Sdhb* csendesítés szignifikánsan alacsonyabb bazális értékeket hozott „mock” transzfektált sejtekhez képest ($p=0,0079$). A transzfektált sejtek esetében a BPTES kezelés nem hozott szignifikáns különbséget.

A bazális respirációt 2mM glutamin adása után is megvizsgáltuk. Kismértékű változásokat figyeltünk meg a bazális respirációhoz képest itakonát (1,4%), atpenin (1,7%) és *Sdhb* csendesített (0,5%) PC12 sejtek esetén. Ennek az értéknek a szignifikáns csökkenését BPTES kezelés hatására csak az *Sdhb* csendesített sejtek PC12 sejtekben figyeltük meg ($p=0,0079$). Szignifikáns ($p=0,0079$) különbséget tapasztaltunk

glutamin pótlást követően az *Sdhb* csendesített és a „mock” transzfektált PC12 sejtek között. A BPTES kezelés hatására azonban ez a szignifikáns különbség eltűnt.

A maximális respiráció a 2,4-dinitrofenol (DNP) és az antimycin+roteton (A+R) kezelés közötti oxigénfogyasztási értékek különbsége. Az itakonát kezelés és az *Sdhb* csendesítés szignifikánsan növelte ezt az értéket ($p=0,0079$). A BPTES kezelés a kontroll ($p=0,0079$) és az *Sdhb* csendesített sejtek esetében csökkentette a maximális respirációt ($p=0,0079$).

A nem-mitokondriális légzés mértékét az I-es és a III-as komplex gátlása után kapjuk meg A+R kezelés hatására. Az *Sdhb* csendesített PC12 sejtek esetében mértük a legmagasabb értékeket, amelyet a BPTES kezelés sem csökkentett szignifikánsan. Mind az itakonát ($p = 0.0159$), mind az *Sdhb* csendesítés ($p=0,0079$) szignifikánsan növelte a nem-mitokondriális légzést a kontrollokhöz képest.



22. ábra: **PC12 sejtek oxigénfogyasztási vizsgálatai.** (A) A PC12 sejtek oxigénfogyasztási rátáinak kezelésre adott válasza. A mutatott értékek %-ban értendők. (B) Bazális respiráció: a nem-mitokondriális légzés kivonása az alapvonal respiráció értékeiből. (C) Maximális respiráció: a 2,4-dinitrofenol (DNP) kezelés és az antimycin+roteton (A+R) kezelés közötti értékek különbsége. (D) Nem-mitokondriális légzés: az oxigénfogyasztási ráta az I-es és a III-as komplex gátlása után A+R kezeléssel. Gln: glutamin; Oligo: oligomycin; DNP: 2,4-dinitrofenol; A+R: antimycin+roteton. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$.

5. Megbeszélés

A phaeochromocytómák és paragangliómák (Pheo/PGL) a tumorok egy genetikailag sokszínű csoportját képezik, a mellékvesevelőből vagy az extraadrenális, szimpatikus vagy paraszimpatikus paraganglionokból erednek. Ezen tumorok jelenlegi ismereteink szerint 40%-a autoszomális domináns úton öröklődik a Pheo/PGL gének csírasejtes mutációja következtében [26, 34].

Az SDH a mitokondrium belső membránjához horgonyzott enzim, mely a citrát-ciklusban betöltött helyén kívül a mitokondriális légzési lánc II-es komplexét (CII) képezi. Az *SDHB* mutációi a leggyakrabban detektáltak az SDH-t érintő mutációk közül [124-126], és gyakran malignitással asszociálnak [23]. A genetikai heterogenitás illetve az *SDHB* mutációkhoz társult malignus kórlefolyás mind a klinikai diagnosztika mind pedig a terápia területén új vizsgálatokat és beavatkozásokat igényelnek. Az újgenerációs szekvenálás napi diagnosztikába történő beépülése következménye az az óriási genetikai adatmennyiség, amelynek helyes interpretációja elengedhetetlen a hatékony diagnosztikai és terápiás döntések kiválasztásában. A régi hipotézis, amely alapján egy gén-egy fenotípus alapszabály átértékelődik, a több gén és az egyéni betegség lefolyás irányába. Ahogy bővülnek genetikai ismereteink egy-egy daganat esetében, úgy bővülnek a kezelési lehetőségek is. Napjainkban az egyénre szabott terápia a leghatékonyabb módszer a rákbetegségek kezelésében.

PhD munkám fő fókuszában a heterogén genetikai háttérrel rendelkező Phaeo/PGL-ák pontosabb megismerését tűztem ki célul. Munkám két fő pilléren áll: 1.) a genetikai háttér új, korszerű genetikai vizsgálati módszerrel történő vizsgálatával a genetikai okok fenotípusra gyakorolt hatását elemeztem, illetve egy a napi munkában is alkalmazott új módszer kifejlesztésében és analitikai tesztelésében vettem részt; 2.) *in vitro* vizsgálatokkal új terápiás célpontok beazonosítását céloztam meg, amivel az *SDHB* mutációkhoz társult rosszindulatú Phaeo/PGL betegek kezelése is eredményesebbé válhat.

5.1 Összetett genetikai háttér, esettanulmány

PhD munkám elején felismerésre került az első olyan beteg, akiben *RET* és *BRCA1* mutációk együttesen fordulnak elő. A fenti és ehhez hasonló extrém ritka esetek jelentős kihívást jelentenek mind diagnosztikai, terápiás és utánkövetési szempontokból. A MEN2 szindróma prevalenciája 1:30000 [127] míg a *BRCA1/2* mutációk prevalenciáját 1:330-500 közé teszik [122]. Így ezen mutációk együttes jelenlétének esélye, hogy egy egyénben előforduljon kb. 1 a tízmillióhoz. Két különböző tumorszindrómára hajlamosító mutációk együttes fennállása a szakirodalomban szereplő adatok alapján is rendkívül ritka. Stradella és munkatársai által összeállított adatbázis [128] összesen 39 ilyen esetet tartalmaz. Shin és munkatársai által készített 64 gént lefedő panel szekvenálás során a kutatásba bevont 252 emlőrákos páciens 26,8%-a (67 páciens) hordozott összesen 77 patogén mutációt (12 *BRCA1*, 13 *BRCA2*, 9 *CHD1*, 3 *FH*, 5 *MSH2*, 2 *MSH6*, 4 *NAT1*, 6 *PTCH1*, 3 *RAD51*, 7 *RET*, 4 *SPINK1*, 3 *TP53* és 1-1 *ALK*, *BRIP1*, *CHEK2*, *MLH2*, *MUTYH* és *PTEN* génekben). Ebben a tanulmányban a *RET* mutációk nem társultak *BRCA1/2* mutációval, a kimutatott *RET* variánsok, jóindulatú SNP-k voltak. A genetikai szűrővizsgálatok eredménye alapján a páciens az édesanyjától örökölhette *RET* és *BRCA1* mutációit. A *RET* p.Cys634Trp mutációhoz társultan a halál az esetek 50%-ban Phaeo miatt, 19%-ban MTC- miatt következik be. [4] Az ajánlott betegkövetési módszerekkel [121], esetünkben sem Phaeora, sem mellékpajzsmirigy túlműködésre utaló jel nem ábrázolódott. Tekintettel a beteg feltehetőleg édesanyjától örökölt (és valószínűleg édesanyja és édesanyja lánytestvérének haláláért felelős) *BRCA1* mutációjára, a beteget a szakirodalomban előírt módon emlő és petefészek daganatra is rendszeresen ellenőrzik [129]. Egy klinikai tanulmány alapján nem várható súlyosabb fenotípus kialakulása ahhoz képest, ami az egyedi mutációkhoz kapcsolódna [128], azonban a tumor szemszögéből vizsgálva nincs bizonyítva, hogy *RET* és *BRCA1* mutációk együttes fennállása ne lenne hatással a fenotípusra. A petefészek és az emlő is expresszálják a *RET* fehérjét és a *BRCA1* protein is expresszálódik a pajzsmirigyben [130]. Számos tirozin-kináz szignál transzdukciós útvonalhoz kötött tumorszuppresszor közül a p53 fehérje is szerepet játszik a MTC patogenezisében [131]. A p53 tumorszuppresszor fehérje képes a sejtciklus megállítására a DNS-t ért károsodás kijavítása céljából, vagy javíthatatlan

károsodás esetén a sejtek apoptózisát is képes indukálni [132]. A fiziológias p53 funkció hiánya hozzájárul a *RET* mutáció talaján kialakuló MTC kifejlődéséhez [131]. A *BRCA1* és p53 proteinek stabil komplexet képeznek illetve a BRCA1 a p53-dependens *p21* és *BAX* gének koaktivátora; így a BRCA1 kritikus a p53 tumorszuppressziós funkcióját tekintve [133]. A klinikum alapján a betegnél *TP53* csírasejtes mutációja következtében kialakuló Li-Fraumeni szindróma nem merült fel, azonban *TP53* mutáció potenciónalis patogén szerepére tekintettel a *TP53* gén teljes kódoló szakaszának vizsgálatát is elvégeztük. Patogén variánst nem sikerült azonosítanunk, a kimutatott Pro72 variáns sem a betegben, sem pedig a beteg testvérében, nem eredményez fenotípust módosító hatást. Összességében a fent részletezett eredmények tükrében feltételezzük, hogy a *BRCA1* mutáció a beteg esetében egy agresszívabb MTC megjelenését eredményezte (testvérehez képest fiatalabb korban alakult ki nyirokcsomó metasztázisokkal). Mindazonáltal kizárni teljes mértékben nem lehet, hogy a *RET* p.C634W mutáció miatt figyelhető meg a családon belüli fenotípusban jelentkező különbség, mivel ez a mutáció változatos klinikai megjelenést mutat [4].

Terápiás szempontból nézve kritikus fontosságú elkülöníteni a MTC-hoz társuló metasztázist egyéb tumoros manifesztációtól. Pajzsmirigyen kívüli daganatok (pl emlő- és agydaganat) ritkán társulnak MTC-hez [134]. Gagel és társai [135] egy korábbi tanulmányuk keretein belül beszámoltak egy MEN2A szindrómás, metasztatikus MTC-vel rendelkező páciensről, aki metasztatikus emlőrák miatt hunyt el, de a *BRCA1/2* mutáció státuszról nem állt rendelkezésre információ.

Az előbbieken részletezett további komplex esetek felbukkanására lehet számítani már a közeljövőben is az újgenerációs szekvenáló technológiák előretörésével, valamint egyre több váratlan, akár fenotípust módosító variáns leírására is számíthatunk.

5.2 Az Endogén szekvenáló Panel klinikai felhasználhatósága

Az új generációs szekvenálás, azon belül is bizonyos kromoszómarégiók és gének célzott szekvenálása Phaeo/PGL betegek esetén az utóbbi időben előtérbe került mind a kutatás, mind a klinikai gyakorlat terén [25, 136-139]. Habár a teljes exomot, vagy akár

a teljes genomot lefedő újgenerációs szekvenáló módszerek is elérhetőek, a klinikai gyakorlatban főleg a sokkal költséghatékonyabb, célzott gének szekvenálását lehetővé tevő panel vizsgálatok terjedtek el [140-142].

Több örökletes szindróma első manifesztációja lehet Phaeo/PGL megjelenése. Az örökletes megbetegedés jegyeit mutató betegek számára elengedhetetlen a genetikai konzultáció, illetve az egészséges családtagok számára a szűrővizsgálatok elvégzése. A mutációt hordozó, de egészséges páciensek élethosszig tartó monitorizálása is létfontosságú a szindróma manifesztációinak korai felismerésére és az esetleges tumorok időbeli azonosítására. Az érintett génektől függően akár gyerekekben, illetve prenatálisan is el kell végezni a klinikai szűrővizsgálatokat a lehetséges súlyos következmények kiszűrése érdekében. Különösen fontos a szűrés az *SDHB* és *FH* mutációk esetében, mivel ezen gének variánsai nagymértékben malignus megbetegedéssel társulnak [22, 23]. További jelentőséget tulajdonít a fenti gének szűrésének, hogy jelenleg nem áll rendelkezésre megbízható marker a tumor malignitásának igazolására a metasztázisok jelenlétét és a lokális inváziót leszámítva [143].

A pontos genetikai diagnózis a betegség további, specifikus manifesztációinak szűrése céljából is elengedhetetlen. A tumorok genetikai hátterének ismerete lehetővé teszi a célzott, személyre szabott, hatékony terápia alkalmazását is [144].

Mivel a minimális lefedettség nagyban függ a szekvenáló eszköztől és assay-től ezért univerzális ajánlás a minimális lefedettségre nem meghatározható. A különbségek az adott módszerek felépítésében és könyvtárkészítésében a lefedettségben, szenzitivitásban és specificitásban való különbségekben tükröződnek. A variánsok megfelelő felismerése nagyban függ a megfelelő lefedettségüktől. Az alacsony read-szám fals pozitív eredményre utalhat, ezért a laboratóriumoknak maguknak kell meghatározni a minimális lefedettséget [145]. A túlzottan magas lefedettség sem optimális, mivel az nagyobb anyagi ráfordítást igényel és a magas lefedettség is emeli a fals pozitív találatok számát. Kutatásunk során laboratóriumunk a minimális 20 read (allélonként 10) számot határozott meg, mint optimális lefedettséget variánsenként.

Egyedi, házon belül szekvenáló panel kifejlesztése esetén az Európai Humán Genetikai Társaság ajánlását kell követni, miszerint csak ismert genotípus-fenotípus kapcsolatot mutató géneket szabad diagnosztikus célból vizsgálni [146]. Az Endogén Panel első verziója 2015-ben 15 endokrin, főképpen Phaeo/PGL kialakulására hajlamosító gén egyidejű vizsgálatát tette elérhetővé. A lefedett gének közé tartozott többek között a neurofibromatózis patogenezisében szerepet játszó *NF1* is, melyet korábban a klinikai gyakorlatban Sanger szekvenálással, nagy mérete miatt nem vizsgáltak- a diagnózis kizárólag a klinikai képen alapult. Az analitikai alkalmazhatóság első lépésében a validációs csoport olyan mintáit használtuk, amelyekben korábban Sanger szekvenálással igazolt patogén mutációk kerültek beazonosításra. A keresztvalidáció során sikerült azonosítani panel szekvenálással az összes korábban már felfedezett variánst. Negatív, mutációt nem hordozó esetekben a panel szekvenálás sem igazolt új, betegség- okozó eltérést. A korábban ismeretlen, nívum variánsokat szintén sikerült validálni. Az analitikai csoport mintáin szerzett tapasztalataink után nagy biztonsággal tudtuk a klinikai gyakorlatban is kipróbálni a panelünk hatékonyságát genetikai diagnózissal még nem rendelkező mintákon. Panelünk a megfelelő informatikai beállítások mellett nagy hatékonysággal mutatta ki a szekvenált génekben előforduló variánsokat, így elkerülve a fals negatív eredményeket. A 100%-os szenzitivitás és >99% specificitás megegyezik a korábban már leírt Pheo/PGL panelek teljesítőképességével, de az általunk kifejlesztett panel fedte le az akkoriban ismert összes Phaeo/PGL gént. Fals pozitív esetek természetes velejárói a magas szenzitivitásnak, de ezek mellett, minden olyan esetben, amikor felmerül patogén génvariáns jelenléte, hagyományos Sanger szekvenálást kell végezni, így biztosítva a pontos genetikai diagnózist [147].

PhD munkám során jelentek meg azok a tanulmányok, amelyek újabb gének patogenetikai szerepére utaltak (*MDH2*, *GOT2*, *SLC25*), így panelünket a klinikai követelményeknek megfelelően bővítettük a szekvenált gének számát, illetve költséghatékonyság céljából egy kisebb lefedettséget lehetővé tevő szekvenáló kitre váltottunk. Habár a magasabb mintaszám ellenére a variánsok teljes száma csökkent, a kódoló régiót érintő variánsokra történő szűkítést követően összességében a megnövelt

mintaszámmal és gének számával arányosan mutattunk ki potenciálisan fenotípust módosító variánsokat.

5.2.1 Patogén variánsok

A jelenlegi nemzetközi ajánlások szerint fenotípus alapján ajánlott a genetikai szűréseket elvégezni [33]. A genetikai diagnózissal még nem rendelkező páciensek 32%-ban igazoltunk patogén mutációt. Ez az adat összhangban van a bevezetőben tárgyalt irodalmi megfigyelésekkel. Fontos megjegyezni, hogy az azonosított, összesen 20 db patogén mutáció (illetve ha a metodikai csoport 12 patogén mutációját is idevesszük, akkor 32) mindegyike különbözött. Ebből következik, hogy hazánkban nem jellemzőek az ún. „founder”, avagy alapító mutációk, tehát patogén mutációt hordozó Phaeo/PGL betegek esetében az esetleges jellegzetes fenotípusokon kívül más érdemi segítség nem áll a klinikus rendelkezésére a vizsgálandó génpaletta szűkítése érdekében. A helyes diagnózis felállítását tovább nehezítik az egyedi esetek: vizsgálataim során több esetben is igazolódtak ritka és kivételes genotípus-fenotípus korrelációk. Nyaki paragangliómával, mint egyedüli tünettel jelentkező páciensünk esetében a *VHL* gén szűrése csak sokadik vonalbeli szűrésként merülhetett volna fel a klinikai diagnózis felállításakor [148], de a panel használatával korábban igazolást nyert ez a biztosan patogén génhiba. Egy multicentrikus tanulmány alapján az *SDHx* mutációkat leszámítva a *VHL* gén mutációi játszanak közre legnagyobb számban az örökletes nyaki PGL-ák kialakulásában, azonban a páciensek szűrését a von Hippel-Lindau szindróma halmozódása, vagy a betegség egyéb tüneteinek megjelenése esetén javasolják [149]. Mivel páciensünk esetében a fentiek közül egyik sem teljesült, a hivatalos ajánlások alapján elvégzett Sanger szekvenálásokkal csak rengeteg idő és anyagi ráfordítás segítségével jutottunk volna a megfelelő diagnózishoz. Hasonlóképpen, Phaeo/PGL esetében az esetek csak kevesebb, mint 2%-ban előforduló [103], FH gént érintő mutációt azonosítottunk, mely szintén csak magas diagnosztikus terhek mellett nyert volna bizonyítást a hagyományos géndiagnosztikai módszerekkel.

Az Endogén Panel segítségével egy malignus Phaeo háttérben álló egyedülálló genetikai jelenséget is megfigyeltünk: páciensünk aminosavcserevel járó *SDHB*

mutációját (p.T88I) egy kereteltolódással járó mutáció (R90) követte. A variánsokat Sanger szekvenálással megerősítettük és az irodalomban elsőként közöltük együttes előfordulásukat. Egy másik betegünkben a leiomiomatózis fenotípushoz a szekvenálás egy *FH* mutációt azonosított. Az örökletes leiomiomatózis egy rendkívül ritka megbetegedés, a világon csak néhány száz család esetében dokumentálta a szakirodalom [150]. Az *FH* mutáció mellett immunhisztokémiával a dagantszövetben igazolták az *FH* hiányát is, alátámasztva a beazonosított variáns patogén voltát.

5.2.2 Ismeretlen jelentőséggel bíró variánsok

Nem minden beteg esetében igazolódott egyértelmű patogén mutáció, de több betegben találtunk az irodalomban ismeretlen jelentőséggel jelzett variánsokat. Az egyes variánsok klinikai szerepének interpretálására az amerikai (American College of Medical Genetics and Genomics) és az európai (European Society of Human Genetics) genetikai társaságok ajánlását kell követnie minden diagnosztikai laboratóriumnak új generációs szekvenálás esetén [146, 151, 152]. A legtöbb kihívást az ismeretlen szignifikanciával rendelkező variánsok (Variant of Uncertain Significance (VUS)) klinikai szerepének értelmezése jelenti. Minden egyes esetben ugyanis számos faktort (a variáns gyakorisága, *in silico* predikció a variáns fehérjére kifejtett hatására és egyéb kiegészítő funkcionális vizsgálatok) kell figyelembe venni az interpretáció során. Ezek a vizsgálatok, mivel magas anyagi és munkabeli ráfordítást igényelnek, általában variánsokként történnek meg különböző kutatások keretei között.

Az *SDHD* p.G12S variáns fenotípusra gyakorolt módosító hatásáról MEN2 szindrómás beteg esetében már korábban is vizsgálta munkacsoportunk [153]. Eredményeink szerint a MEN2 szindrómás populációban szignifikánsan gyakrabban fordul elő ez a variáns, mint az egészséges populációban. Ez a variáns két betegünkben is előfordult, egyik esetben *VHL*, másik esetben *NFI* mutációhoz társultan. MEN2, azon belül is B altípushoz társulva azonban egyik betegünkben az *SDHD* gén egy másik, p.H50R mutációját találtuk. A jövőben a családfák szoros megfigyelése lehetővé teheti majd ezeknek a variánsoknak a fenotípust módosító hatásainak felderítését. Jelenlegi interpretációjuk, mint „modifier” variánsok tűnik a leghelyesebbnek.

Egy betegünkben a malignus Phaeo fenotípust mögött egyértelmű patogén mutációt nem sikerült azonosítani, de egy ritka, a szakirodalomban egy alkalommal jelentett, eddig benignusnak véleményezett *GOT2* p.R393Q variánst validáltunk. A beteg további két benignus *GOT2* és egy *MDH2* variánst is hordozott. Nem egyértelmű tehát, hogy az eddig benignusnak vélt *GOT2* p.R393Q variáns klinikai szerepe szorul felülvizsgálásra, vagy több mitokondriális enzimet érintő multiplex variánsok vezethettek-e a fenotípus kialakulásához. Mitokondriális enzimeket tekintve az adott variáns ritkasága és a patogén mutáció hiánya miatt az *MDH2* p.R229G és az *SDHA* p.M279I variánsok esetében is felmerül a patogén szerep lehetősége. Ezekben az esetekben a tumorszövet metabolit tartalma, illetve az adott enzimek immunhisztokémiai vizsgálata segíthet a patogenitás eldöntésében.

Külön érdemes megemlíteni a *KIF1B* p.T873I variánst, amelyet a szakirodalom benignusnak véleményez Charcot-Marie-Tooth betegség esetében, azonban ismeretlen jelentőségűnek titulál örökletes neuroblasztóma esetében. Vizsgálataink során ezt a variánst egy szimultán Phaeo és PGL fenotípust mutató, *SDHB* patogén mutációt hordozó betegben azonosítottuk. Mivel a neuroblasztóma, csakúgy, mint a Phaeo/PGL is neuroendokrin sejtes tumor, joggal feltételezhetjük, hogy fenotípust módosító hatással bír ez a variáns Phaeo/PGL esetében is.

Ezen ismeretlen szignifikanciával rendelkező, ritka variánsok esetében tehát felmerül a gyanú, hogy közrejátszottak a betegek fenotípusának kialakulásában. A jövőben az ehhez hasonló genomiális eltérések rengeteg kutatási lehetőséget fognak jelenteni, klinikai interpretálásuk pedig nagy kihívások elé fogja állítani mind a klinikust, mind a genetikuszt a családszűrés és a betegség további kezelésének szempontjából.

5.3 A mellékvesevelő és a paraganglionok tumorbiológiai jellemzői szukcinát dehidrogenáz károsodása esetén

5.3.1 A kutatásainkhoz felhasznált sejtvonalak rövid összefoglalója

Kutatásunk során háromféle sejtvonallal dolgoztam, mivel az SDH hiány hatása az utóbbi időben több típusú daganat esetében is felmerült, de az eddigi vizsgálatok onkopatológiai szerepet elsősorban a kromaffin sejtekre igazoltak.

A PC12 sejtek patkány mellékvesevelőben kialakult phaeochromocytóma sejtekből izolálták, melyek az ektodermális eredetű velőcsőből alakulnak ki. Ezek a sejtek nagyon könnyen differenciálódnak neuronszerű sejtekké. A PC12 sejtek is hajlamosak idegi eredetű növekedési faktor vagy dexametazon hatására, illetve nem megfelelő tápfolyadék esetén az osztódásukat leállítani, majd ezt követően differenciálódni [154]. A sejtek differenciálódását legkönnyebben fénymikroszkóp alatt figyelhetjük meg, amikor a sejtek axonokat növesztenek. A kutatásunk sikerességéhez a PC12 sejtek differenciálódásának megakadályozására kellett törekednünk, morfológiájukat fénymikroszkóppal ellenőriztük a kezelések alatt. A PC12 sejtvonal a neuroendokrin daganatok in vitro modellezésében az egyik leggyakrabban használt sejtípus.

A HeLa sejteket 1951-ben egy 31 éves nő epiteliális cervix karcinómájából hozták létre, tehát a sejtek embrionálisan mezodermális eredetűek. Gyorsan osztódnak, a saját sejtszámukat akár egyetlen nap alatt is megduplázzhatják, ezért a kutatásokban előszeretettel használják [155]. Gyors és agresszív növekedésük miatt könnyen kontaminálhatnak más sejtvonalakat. Halhatatlanságuk egy túlzottan aktív telomeráznak köszönhető, mely a sejtek osztódásával a telomereket visszaépíti, ezzel megelőzve a sejtöregedést [156].

A H295R sejtvonal humán mellékvesekéreg daganat eredetű. A sejtvonalat egy adrenokortikális karcinómával diagnosztizált nőbeteg nagy, invazív daganatának sejteiből hozták létre 1990-ben [157]. Radioimmun- és kromatográfiás, illetve tömegspektrometriás mérések alapján ez a sejtvonal különféle mineralokortikoidokat, glükokortikoidokat és androgén hormonokat szekretál [157].

5.3.2 A szukcinát akkumuláció modellezésének jelentősége és hatása a különböző sejtvonalakra

Az *SDHx* mutációt hordozó Phaeo/PGL daganatokban az akkumulálódó szukcinát onkometabolitként van számontartva, azonban a pontos patomechanizmus, illetve az *SDHB* mutációhoz társuló malignus fenotípus oka a számos kutatás ellenére a mai napig nem tisztázott [158-160]. A kérdések feloldása érdekében könnyen hozzáférhető, nagy mennyiségű vizsgálat elvégzés lehetőségét biztosító, olcsó és a daganatok viselkedését jól tükröző modellekre van szükség. Azonban az *SDHB* mutáció *in vitro* és *in vivo* modellezése kromaffin sejtek esetében ezeknek a feltételeknek megfelelő modell megalkotása nehézségekbe ütközött [161].

Annak érdekében, hogy az *SDHB* inhibíció hatásait tanulmányozzuk, az SDH enzimet itakonáttal kompetitíven gátoltuk. Az itakonát *in vitro* képes az SDH aktivitásának csökkentésére [95], de egyéb mitokondriális útvonalakra nincs hatással [162].

A szukcinát-dehidrogenáz aktivitásának csökkenése miatt a sejtben a szukcinát felhalmozódik, nem tud fumaráttá alakulni [47]. Kvantitatív és kvalitatív vizsgálataink alapján az *Sdhb* gén csendesítése hatékony SDH gátlást idézett elő. A kutatásunkhoz használt mindhárom sejtvonalba fokozott szukcinát, illetve csökkent fumarát koncentráció alapján arra következtethetünk, hogy mind az atpeninnel, mind az itakonáttal eredményesen tudtuk gátolni az SDH enzimet. Így az általunk alkalmazott rendszerek jól modellezik az SDH hiányát vagy csökkent működését eredményező, SDH-alegységek mutációjából fakadó állapotokat.

A szukcinát-dehidrogenáz különféle gátlásai után vizsgáltuk a sejtek életképességét különböző inkubációs időpontokban. A kapott eredményeinkhez hasonlóan a PC12 sejtekben az *Sdhb* gén csendesítése után csökkent apoptózist már igazolták korábban [163]. Kísérleteink során az *Sdhb* csendesítéshez hasonlóan szintén javuló életképességet mértünk PC12 sejtek itakonát és atpenin kezelése esetében is.

A kromaffin sejtekkel ellentétben az itakonáttal kezelt HeLa és H295R sejtek szignifikánsan rosszabb viabilitást mutattak. Korábban HepG2 sejtekben szukcinát akkumuláció mellett fokozott apoptózist és a sejtek csökkent viabilitását figyelték meg, mely valószínűleg a kaszpáz-3 vagy a kaszpáz-7 apoptotikus útvonal aktiválódásának

tudható be [64]. Ez a mechanizmus lehetséges, hogy HeLa és H295R sejtekben is szerepet játszik a szukcinát felhalmozódásának következtében, a sejtek csökkent életképességét okozza. Az atpenin kezelés a HeLa sejtek életképességét fokozta, míg a H295R sejtvonal életképességére ez az SDH gátló módszer is negatív hatással volt.

Adataink alapján úgy gondoljuk, a szukcinát-dehidrogenáz gátlása, legyen az itakonát, atpenin vagy *Sdhb* csendesítés által, tumoros sejtvonaltól függően másként hat a sejtek életképességére.

PC12 sejtek esetében vizsgáltuk, hogy a sejt életképességbeli eltérései a proliferációban is tetten érhetőek-e. Hagyományos, egyrétegű sejttenyészet esetén egyik SDH gátló módszer sem okozott szignifikáns különbséget a sejtek proliferációjában. 3D sejttenyésztés esetén az itakonát kezelés nem növelte szignifikánsan a halott sejtek arányát. Ezekre az eredményekre alapozva kijelenthetjük, hogy az SDH gátlása önmagában nincs szignifikáns hatással a PC12 sejtekre sem egyrétegű, sem 3D sejttenyészet esetén.

5.3.3 Az SDH gátlás hatása a sejtek metabolikus profiljaira

Következő lépésként azt vizsgáltuk, hogy a különböző sejtvonalak életképességbeli eltérései visszavezethetőek-e a metabolit profiljukban mérhető különbségekre SDH gátlás esetén. Korábbi megfigyelések alapján az SDH inhibíció esetén az anaerob glikolízis előtérbe kerülésére számítottunk, ahogy itakonát kezelés esetén is leírták már a laktát felhalmozódását [164]. Ennek ellenére és a HeLa és H295R sejtekben tapasztaltakkal ellentétben, a várható laktát akkumuláció elmaradt PC12 sejtvonalban *Sdhb* géncsendesítés és itakonát kezelés után is. Az *Sdhb* géncsendesítés és az itakonát kezelés szignifikánsan csökkentette a PC12 sejtek intracelluláris glutamát koncentrációját. Ez a megfigyelés összhangban van a korábban *SDHx* mutációval rendelkező tumorokban leírtakkal, miszerint ezen daganatokban csökkent glutamát szintek mérhetőek [77], és az *Sdhb* mutáció következtében erősödik a glutamin metabolizmus [78]. Szintén alátámasztja eredményeinket, hogy *SDHB* mutáns UOK269 sejtek esetében a glutamint fő energiaforrásként jelölték meg, mely szerepet játszik a HIF-1 α stabilizálásában és a DNS hipermetilációjában [165]. Ezen kívül *in vivo*¹⁸ F-

glutamin PET használatával az *SDHB*^{-/-} vesesejtes karcinómák fokozott glutaminfelvételét figyelték meg [78].

Phaeo/PGL esetében nincs adatunk a mitokondriális szétkapcsoló protein 2 (mitochondrial uncoupling protein 2: UCP2) expressziójáról, melyet korábban a sejtek metabolikus szenzoraként emeltek ki tápanyagigény esetén [166]. Feltételezzük, hogy az *SDH* deficiens PC12 sejtek gyors alkalmazkodása és a glutamin metabolizmus előtérbe kerülése összefüggésben lehet ennek a fehérjének a szerepével, mely ígéretes kutatási alapanyagot nyújthat a közeljövőben.

PC12 sejtekkel ellentétben HeLa és H295R sejtvonalaik esetében intracelluláris glutamát felhalmozódást figyeltünk meg itakonát kezelés hatására. Mindkét sejtvonalaik esetében ezt laktát akkumuláció kísérte, így a korábbi tanulmányokban leírtaknak megfelelően viselkedtek ezek a sejtek. Feltehetőleg a HeLa és H295R sejtekben az *SDH* enzim itakonáttal történő gátlásának következtében nem alakul ki glutamátfüggőség, a szükséges energiát a sejt glikolízis útján termeli. Nem minden tumoros sejt glutaminfüggő, egyes sejtvonalaik képesek kizárólag glükózból szerzett energiát használva túlélni és proliferálni. Ezekben a sejtvonalaikban szignifikánsan emelkedett glutamát koncentrációk valószínűleg a *GLS1* enzim fokozott aktivitásának következtében alakulnak ki, azonban a sejtek nem képesek arra, hogy ezt a metabolitot használják fel energiatermelésére.

Atpeninrel történő gátlás esetében uniformis metabolit profilokkal szembesültünk: mindhárom sejtvonalaik esetében szignifikáns intracelluláris glutamát szint csökkenést és szignifikáns laktát felhalmozódást mértünk. A különböző *SDH* gátló módszerek így arra világítanak rá, hogy nem csak a sejtvonalaik, hanem a gátló módszer megfelelő alkalmazása is létfontosságú, ha megfelelően akarjuk modellezni az *SDHx* mutáns tumorokat.

5.3.4 A glutamin/glutamát metabolizmus jelentősége in vitro kísérleteinkben és Phaeo/PGL daganatok esetében

Az *SDHB* mutációhoz társuló Phaeo/PGL daganatok esetében nem csak a kemoterápiás kezelések hatástalansága, hanem a pontos prognosztikai faktorok hiánya is rontja a

betegség várható kimenetelét. Több új lehetséges terápiás megközelítésről számoltak be a szakirodalomban pl. a glutation szintézis gátlása az *SDHB* mutációhoz társuló emelkedett reaktív oxigéngyökök DNS károsító hatásához járult hozzá [167]. Az I-es és a III-as komplex egyidejű gátlása érzékenyebbé tette ezeket a tumorokat a DNS károsító kemoterápiás szerekre [168]; a szukcinát és a fumarát emelkedett intracelluláris koncentrációi pedig a homológ DNS rekombinációs javító útvonalakat gátolják, így érzékenyebbek poli(ADP)-ribóz polimeráz gátló kezelésekre. [169].

Prognosztikai faktorok tekintetében a terápia szempontjából kritikus lenne a betegség agresszivitásának előrejelzésére. Korábbi próbálkozások kimutatták, hogy a Phaeo/PGL daganatok sokszínűsége miatt nehézségekbe ütközik egy univerzális marker megtalálása [170].

A fenti célkitűzésekkel és a kutatásunkhoz használt sejtvonalak metabolikus profiljai alapján a glutamin/glutamát metabolizmus szerepét vizsgáltuk tovább SDH funkciójában károsodott PC12 sejtekben.

Jól ismert, hogy a daganatsejtek az ún. Warburg effektus révén oxigénkínálattól függetlenül anaerob glikolízis útján termelnek ATP-t [171]. A gyors proliferációhoz azonban az anabolikus folyamatok energiaigényét is ki kell elégítenie, így a tumorsejtek nem csak glükózból, hanem glutaminból is termelnek ATP-t oxidatív foszforilációval. [68]

A glutamin egy nem esszenciális aminosav, mely szén- és nitrogénforrásként szolgál aminosavak, nukleotidok és hexoaminok képzéséhez [66], metabolizmusa pedig a sejtproliferációt támogatja NADPH szolgáltatásával [67], ezenkívül energiaforrásként is szolgál. A glutamátnek széleskörű szerepe van a sejt metabolizmusában [172] továbbá a citrát ciklus károsodása esetén több tanulmány is rámutatott a redukzív glutamin metabolizmus fontosságára [173-175].

A PC12 kromaffin sejtek glutamin jelenlétében hatékonyan váltottak glikolízisről glutaminolízisre a bazális oxigénfogyasztási ráta emelkedése mellett. A kapott eredményeink összhangban vannak korábbi tanulmányok következtetéseivel, miszerint az oxigénfogyasztási ráta emelkedése csak akkor volt megfigyelhető mitokondriális szétkapcsolás esetén, ha glükóz vagy piruvát mellett glutamin is jelen volt a rendszerben. Zhdanov és társai kutatásában továbbá a glutaminolízis sejtspecifikus

hatásai szintén kutatásunk eredményeit erősítik meg [68]. A maximális és a nem-mitokondriális respirációs eltéréseket az itakonát kezeléssel ellentétben atpenin kezelésnél nem figyeltük meg, így tovább erősítve az itakonát, mint hatékony *in vivo* modell szerepét *SDHB* mutációhoz társuló Phaeo/PGL tumorok esetén.

A glutamint a mitokondriumban a glutamináz (GLS-1) konvertálja glutamáttá, ami alfa-ketoglutaráttá metabolizálódik tovább. A GLS-1 megnövekedett szintjét írták le különféle daganatokban, a szabályozatlan glutamin/glutamát metabolizmus pedig több tumor számára létfontosságú a növekedéshez [73-76]. Megvizsgáltuk a GLS-1 *in vivo* expresszióját a különféle SDH gátlásokat követően. A PC12 sejtek *Sdhb* csendesítés és itakonát kezelés után is emelkedett GLS-1 expressziót mutattak. Érdekes módon atpenin kezelés hatására ennek az ellenkezőjét figyeltük meg a kromaffin sejtekben. A HeLa sejtek esetében itakonát kezelésre hasonló változásokat figyelhettünk meg GLS-1 expresszió tekintetében, továbbá 24 órás atpenin kezelés után, a PC12 sejtekhez hasonlóan szintén szignifikánsan csökkent a GLS-1 szint. Ez a hasonlóság azonban 48 óra elteltével az ellenkezőjére fordult. A H295R sejtvonal esetében mind az itakonát, mind az atpenin szignifikánsan növelte a GLS-1 expresszióját 24 és 48 óra inkubációt követően is. Ezek az eredmények tovább erősítik az SDH gátlás sejtspecifikus következményeit, valamint az itakonát hatékony *Sdhb* mutációt modellező tulajdonságát. A PC12 sejtekkel ellentétben az emelkedett GLS-1 szintek nem feltétlenül jártak együtt az intracelluláris glutamátszintek csökkenésével. Kutatásaink alapján úgy gondoljuk, hogy habár a glutamin bejutása fokozódik SDH gátlás hatására, a glutamát nincs effektíven felhasználva ezekben a sejtekben itakonát kezelés hatására, amely szintén tovább erősíti a megfelelő *in vitro* modellezéshez használt rendszer választását.

5.3.5 A GLS-1 gátlás hatékonyan csökkenti az SDH funkciójában károsodott PC12 sejtek proliferációját

A fenti eredmények alapján megvizsgáltuk az SDH funkciójában károsodott PC12 sejtek GLS-1 függőségét. A GLS-1 gátlásához egy erős gátlószert, a BPTES-t használtunk. Az SDH gátlás PC12 sejtekben önmagában nem volt szignifikáns hatással a proliferációra egyik gátlószer esetén sem. Azonban ha BPTES-t is alkalmaztunk, a

PC12 sejtek növekedése szignifikánsan csökkent károsodott SDH funkció esetén hagyományos, egyrétegű sejt kultúrában. Ezen megfigyeléseinkkel összhangban a PC12 sejtek 3D sejt kultúrájában szignifikánsan nőtt a halott sejtek aránya BPTES kezelés hatására SDH gátlás mellett.

Jelen értekezés írásakor a CB-839, egy másik GLS-1 gátló áll klinikai alkalmazhatóság vizsgálata alatt *SDHx* mutációhoz társuló gasztrointesztinális és más stromális tumorokkal kapcsolatban. Azonban egy korábbi kutatás a CB-839 limitált alkalmazhatóságát mutatta ki hasnyálmirigy rák esetében [176]. Mindezek alapján feltételezhető, hogy különböző GLS-1 gátlószerek eltérő hatással lehetnek a kromaffin sejtek proliferációjára is, így az etiológiához megfelelő gátlószer megtalálása a jövő kutatásainak egy fontos célja lehet.

5.3.6 A GLS-1 jelentősége *in vivo* különböző etiológiájú Phaeo/PGL metszetek immunhisztokémiai vizsgálata alapján

Ahhoz, hogy az *in vitro* kapott eredményeinket a klinikai gyakorlatba is átültessük megvizsgáltuk a GLS-1 expresszióját különféle etiológiájú Phaeo/PGL tumorok metszeteit immunhisztokémiai eljárásokkal. Az *in vitro* kísérleteinkkel összhangban az *SDHB* mutációhoz társuló tumorokban erősebb GLS-1 festés ábrázolódott a nem *SDH* mutációhoz köthető tumorokéhoz képest. Továbbá a *RET* mutációhoz társuló malignus tumorok szintén magasabb GLS-1 expressziót mutattak a benignus *RET*-t asszociált tumorokhoz és sporadikus Phaeo/PGL-hoz képest. Meg kell azonban említeni, hogy néhány esetben az emelkedett GLS-1 expresszió nem társult malignitással. A malignitás megállapítása Phaeo/PGL esetén nehézségekbe ütközik, mivel nem áll rendelkezésre definitív szövettani marker az elkülönítésére. Számos tanulmány, többek között Stenman és társai által vizsgált PASS (Pheochromocytoma of the Adrenal Gland Scaled Score) és GAPP (Grading System for Adrenal Pheochromocytoma and Paraganglioma) osztályozó rendszer hibái mutatnak rá a megfelelő klinikai elkülönítő algoritmus hiányára [170]. A kutatásunk során malignus természetűnek nyilvánítottuk az újból megjelenő, helyi vagy távoli metasztázist adó tumorokat. Az *in vitro* kísérleteink során a megnövekedett GLS-1 expresszió nem feltétlen társult megnövekedett életképességgel így utalva arra, hogy a proliferáció elősegítéséhez más tényezők is szükségesek. A GLS-

1 feltételezéseink szerint az *SDH*-mutációhoz társuló daganatokban bír a legnagyobb jelentőséggel, ahol az *SDH* elégtelensége melletti *GLS-1* gátlás citotoxikus lehet. Az *SDHB* heterogén fenotípusait alátámasztó *in vivo* tanulmány- melyben *Caenorhabditis elegans* állatmodellben vizsgálták a mutációk fenotípusra gyakorolt hatását- rávilágít arra, hogy az *SDHB* génen belüli különböző mutációk nem feltétlen vezetnek ugyanahhoz a fenotípushoz. A kutatásban *Sdhb* deléciónhoz fejlődésében gátolt fenotípus társult, míg a *Sdhb* pontmutáció esetén csak infertilitás volt megfigyelhető [177]. Ez tovább erősíti azt a klinikai igényt, hogy még az adott génen belül akár kodon vagy mutáció-specifikus terápiás döntések szükségesek az optimális hatás elérése céljából.

6. Következtetések

6.1 Az újgenerációs szekvenáló metódusok előretörése önmagában nem garantálja a megfelelő diagnosztikát

Az újgenerációs szekvenáló módszerek klinikai előretörése napjainkban alapvetően határozza meg a klinikai genetikai diagnosztikát. Mindazonáltal ezek a módszerek önmagukban nem váltják ki a megfelelő genetikai konzultációt örökletes megbetegedések esetében. Esettanulmányunkban egy olyan páciens és családját mutattuk be, ahol a *MEN2* szindrómájának hátterében álló *RET* mutációjához egy örökletes emlő- és petefészek rákra hajlamosító *BRCAl* mutáció társult. A *BRCAl* mutáció szűrésére semmilyen indok nem szolgált a genetikai és családi anamnézis felvételéig. Ezeket követően viszont célzottan tudtuk vizsgálni az érintett géneket, így kimutatva a páciens és családja által hordozott mutációkat. A teljes genom, vagy akár önmagában csak a genom kódoló régióinak szekvenálása a klinikai gyakorlatban túlzottan idő- és pénzigényes, tehát genetikai szűrésre hatékonyan nem alkalmazható. A jövőben az NGS módszerek előretörése mellett is csak megfelelő és alapos orvosi munkával kiegészülve biztosíthat nagy hatékonyságú diagnosztikai apparátust.

6.2 Az Endogén Panel, mint hatékony klinikai diagnosztikus eszköze az örökletes endokrin tumorszindrómáknak

Az Endogén Panellel szerzett tapasztalataink arra engednek következtetni, hogy a segítségével gyorsan, pontosan és költséghatékonyan szűrhetőek olyan megbetegedések, melyek háttérben genetikai eltérések állhatnak. A szekvenálási módszer mindenkori limitációt figyelembe véve a panel könnyen bővíthető további génekkel, melyek segítségével más betegségeket, vagy újonnan leírt, daganatokra hajlamosító genetikai eltéréseket is ki tudunk szűrni a jövőben költséghatékony módon. A célzott, több gén szimultán szekvenálását lehetővé tevő módszer esetében a legfontosabb a 100%-os szenzitivitás. Míg a fals pozitív eredményeket könnyen ellenőrizhetjük a hagyományos Sanger szekvenálással, úgy az álnegatív eredmények kiszűrésére hatékony módszer nem létezik.

Több gén célzott szekvenálása arra is rávilágított, hogy még alacsony mintaszám esetén is előfordulnak ritka vagy váratlan genotípus-fenotípus összefüggések. Ezeknek a genetikai variánsnak az egymásra gyakorolt hatása, illetve klinikai interpretálása a közeljövő egyik nagy kihívása lesz mind a klinikai genetikában mind pedig az onkológiában.

6.3 A GLS-1 mint szövettani prediktora a malignus betegségnek

Az SDH gátlás, akár farmakológiai úton itakonáttal vagy *SDHB* géncsendesítés által csak a kromaffin PC12 sejtek életképességére volt pozitív hatással. Ennek oka a sejtek eltérő glutamin/glutamát metabolizmusára vezethető vissza. Tanulmányunk egyik fő célja egy költséghatékony, megbízható modell létrehozása volt, mely új prognosztikus faktorok keresésében és terápiás célpontok megtalálásában nyújthat segítséget ezen ritka betegség esetében. Kutatásunk publikálásakor nem állt még rendelkezésre megbízható állatmodell az *SDHB* deficiens tumorok modellezésére [161], azonban jelen disszertáció írásakor biztató eredményeket közöltek egy *SDHB*-deficiens patkány modelltől [178]. Ugyanakkor az általunk bevezetett itakonát kezeléssel olcsón és könnyen lehet modellezni az SDH gátlást sejtspecifikusan.

Az immunhisztokémiai vizsgálataink során tapasztalt eltérések az *SDHB* expresszióban arra engednek következtetni, hogy még az *SDHB*-hez köthető tumorok is heterogének.

Ezt erősíti, az a megfigyelés is, hogy a szukcinát/fumarát arány is eltérő ezekben a tumorokban arra utalva, hogy a megmaradt SDH aktivitás mértéke is különböző a tumorokban [123]. A megmaradó, reziduális SDH aktivitás *in vivo* modellezését tette lehetővé az siRNS-sel történő géncsendesítés is, ami így a nem teljes SDH gátlás megfelelő modellje lehet. Mivel a PC12 sejtek itakonát kezelése hatékonyan utánozta az *SDHB* csendesítés következményeit, ezért hatékony *in vitro* modellként felhasználható. A glutamin/glutamát jelentőségét SDH-deficiens tumorok esetében igazoltuk. Kísérleteink során a GLS-1 expressziójának növekedését mutattuk ki SDH gátlás követően, illetve a proliferáció csökkenését okozta a GLS-1 gátlás SDH-gátolt sejtekben. Megfigyeléseinket alátámasztottuk Phaeo/PGL tumorok metszeteinek immunhisztokémiai vizsgálatával is, miszerint a GLS-1 expressziója fokozott volt a malignus tumorokban a benignusokban mértékhez képest. A kutatási eredményeink arra engednek következtetni, hogy a GLS-1 egy hatékony prognosztikus és terápiás célpont lehet a malignus Phaeo/PGL kezelésében, ahol jelenleg a terápiás lehetőségek rendkívül limitáltak.

7. Összefoglalás

PhD munkám során beigazolódott, hogy az örökletes tumorszindrómák tudományos kutatása és klinikai kezelése egy sokrétű és multidiszciplináris tevékenységet feltételez. A klinikus szerepe bármilyen új módszer és kézi munkát nem igénylő diagnosztikai tevékenységek mellett továbbra is a legfontosabb ezekben a betegségekben is. A klinikai genetikai diagnosztika során az új technológiák gyorsabb, pontosabb és szélesebb lehetőségeket biztosítanak, de a kapott eredményeknek a klinikai munkába történő integrálásához több szakterület összehangolt munkája szükséges.

A közeljövőben feltételezhetően egyre nagyobb klinikai szerep jut majd az újgenerációs szekvenáló módszereknek. Ezen nagy áteresztőképességű és költséghatékony eszközök segítségével eddig ismeretlen genetikai eltérések leírására, illetve váratlan genotípus-fenotípus összefüggések felismerésére kerül majd sor. Az új módszerek alkalmazásánál a valódi patogén eltérések kiszűrése a mindenkori cél, hiszen az álnegatív eredmény nem csak a betegekre, hanem a betegségek örökletes mivolta miatt családtagjaira is rendkívül veszélyes.

Jelenleg nem áll rendelkezésünkre specifikus prognosztikai faktor és terápiás ágens a malignus Phaeo/PGL megbetegedések kezelésére. Ritkaságuk miatt kulcsfontosságú ezeket a megbetegedéseket hűen tükröző megfelelő modellek létrehozása. Az *in vitro* és *in vivo* modellek a transzlációs medicina úttörőiként működhetnek, mivel általuk a megbetegedés alacsony esetszámából következő hiányos megfigyeléseink laboratóriumi körülmények között pótolhatóak.

8. Summary

The scientific research and the clinical management of hereditary cancer syndromes require a multidisciplinary and multi-layered approach. The clinician has the most important role beside any novel diagnostic approach. The new technologies permit a faster, more accurate and more diverse options for the diagnosis of genetic diseases, but to integrate the results correctly into the everyday clinical practice, the combined work of multiple specialities is required.

Presumably, the next generation sequencing technologies will assume a greater role in the common clinical practice in the near future. With these high-throughput and cost-effective tools, uncommon genotype-phenotype correlations and new genetic alterations will be recognised. The ultimate goal with these techniques is to detect the real pathogene variants because the false negative result is not only critical to the patient, but for the patient's family as well.

Currently there is no specific prognostic factor and therapeutic agent for the management of malignant pheochromocytomas and paragangliomas. Due to their rarity, the establishment of proper models to investigate these cancers is mandatory. The *in vitro* and *in vivo* models serve as groundbreakers of translational medicine as they can compensate our lack of knowledge with the opportunity to study these unique diseases within laboratory conditions.

9. Irodalomjegyzék

1. Igaz, P. and A. Patócs, Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes. Springer, Budapest, 2019: p. 29-32.
2. Mathew, C.G.P., K.S. Chin, D.F. Easton, K. Thorpe, C. Carter, G.I. Liou, S.L. Fong, C.D.B. Bridges, H. Haak, A.C.N. Kruseman, S. Schifter, H.H. Hansen, H. Telenius, M. Telenius-Berg, B.A.J. Ponder (1987) A linked genetic marker for multiple endocrine neoplasia type 2A on chromosome 10. *Nature*, 328: 527
3. Machens, A., M. Brauckhoff, H.J. Holzhausen, P.N. Thanh, H. Lehnert, H. Dralle (2005) Codon-specific development of pheochromocytoma in multiple endocrine neoplasia type 2. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 3999-4003
4. Milos, I.N., K. Frank-Raue, N. Wohllk, A.L. Maia, E. Pusiol, A. Patocs, M. Robledo, J. Biarnes, M. Barontini, T.P. Links, J.W. de Groot, S. Dvorakova, M. Peczkowska, L.A. Rybicki, M. Sullivan, F. Raue, I. Zosin, C. Eng, H.P. Neumann (2008) Age-related neoplastic risk profiles and penetrance estimations in multiple endocrine neoplasia type 2A caused by germ line RET Cys634Trp (TGC>TGG) mutation. *Endocr Relat Cancer*, 15: 1035-1041
5. Whitworth, J., A.B. Skytte, L. Sunde, D.H. Lim, M.J. Arends, L. Happerfield, I.M. Frayling, R. van Minkelen, E.R. Woodward, M.D. Tischkowitz, E.R. Maher (2016) Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome: A Case Series and Review. *JAMA Oncol*, 2: 373-379
6. Whitworth, J., P.S. Smith, J.E. Martin, H. West, A. Luchetti, F. Rodger, G. Clark, K. Carss, J. Stephens, K. Stirrups, C. Penkett, R. Mapeta, S. Ashford, K. Megy, H. Shakeel, M. Ahmed, J. Adlard, J. Barwell, C. Brewer, R.T. Casey, R. Armstrong, T. Cole, D.G. Evans, F. Fostira, L. Greenhalgh, H. Hanson, A. Henderson, J. Hoffman, L. Izatt, A. Kumar, A. Kwong, F. Laloo, K.R. Ong, J. Paterson, S.M. Park, R. Chen-Shtoyerman, C. Searle, L. Side, A.B. Skytte, K. Snape, E.R. Woodward, M.D. Tischkowitz, E.R. Maher (2018) Comprehensive Cancer-Predisposition Gene Testing in an Adult Multiple Primary Tumor Series Shows a Broad Range of Deleterious Variants and Atypical Tumor Phenotypes. *Am J Hum Genet*, 103: 3-18

7. Stradella, A., J. Del Valle, P. Rofes, L. Feliubadalo, E. Grau Garces, A. Velasco, S. Gonzalez, G. Vargas, A. Izquierdo, O. Campos, E. Tornero, M. Navarro, J. Balmana-Gelpi, G. Capella, M. Pineda, J. Brunet, C. Lazaro (2018) Does multilocus inherited neoplasia alleles syndrome have severe clinical expression? *J Med Genet*, 56: 521
8. Lendvai, N., M. Toth, Z. Valkusz, G. Beko, N. Szucs, E. Csajbok, P. Igaz, B. Kriszt, B. Kovacs, K. Racz, A. Patocs (2012) Over-representation of the G12S polymorphism of the SDHD gene in patients with MEN2A syndrome. *Clinics (Sao Paulo)*, 67 Suppl 1: 85-89
9. Welander, J., P. Soderkvist, O. Gimm (2011) Genetics and clinical characteristics of hereditary pheochromocytomas and paragangliomas. *Endocr Relat Cancer*, 18: R253-276
10. Stein, P.P. and H.R. Black (1991) A simplified diagnostic approach to pheochromocytoma. A review of the literature and report of one institution's experience. *Medicine (Baltimore)*, 70: 46-66
11. Pacak, K., W.M. Linehan, G. Eisenhofer, M.M. Walther, D.S. Goldstein (2001) Recent advances in genetics, diagnosis, localization, and treatment of pheochromocytoma. *Ann Intern Med*, 134: 315-329
12. Beard, C.M., S.G. Sheps, L.T. Kurland, J.A. Carney, J.T. Lie (1983) Occurrence of pheochromocytoma in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979. *Mayo Clin Proc*, 58: 802-804
13. Bravo, E.L. (1991) Pheochromocytoma: new concepts and future trends. *Kidney Int*, 40: 544-556
14. Plouin, P.F., G. Chatellier, I. Fofol, P. Corvol (1997) Tumor recurrence and hypertension persistence after successful pheochromocytoma operation. *Hypertension*, 29: 1133-1139
15. Goldstein, R.E., J.A. O'Neill, Jr., G.W. Holcomb, 3rd, W.M. Morgan, 3rd, W.W. Neblett, 3rd, J.A. Oates, N. Brown, J. Nadeau, B. Smith, D.L. Page, N.N. Abumrad, H.W. Scott, Jr. (1999) Clinical experience over 48 years with pheochromocytoma. *Ann Surg*, 229: 755-764; discussion 764-756

16. Hamidi, O., W.F. Young, Jr., N.M. Iniguez-Ariza, N.E. Kittah, L. Gruber, C. Bancos, S. Tamhane, I. Bancos (2017) Malignant Pheochromocytoma and Paraganglioma: 272 Patients Over 55 Years. *J Clin Endocrinol Metab*, 102: 3296-3305
17. Jimenez, C., E. Rohren, M.A. Habra, T. Rich, P. Jimenez, M. Ayala-Ramirez, E. Baudin (2013) Current and future treatments for malignant pheochromocytoma and sympathetic paraganglioma. *Curr Oncol Rep*, 15: 356-371
18. Astuti, D., F. Latif, A. Dallol, P.L. Dahia, F. Douglas, E. George, F. Skoldberg, E.S. Husebye, C. Eng, E.R. Maher (2001) Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma. *Am J Hum Genet*, 69: 49-54
19. Baysal, B.E., R.E. Ferrell, J.E. Willett-Brozick, E.C. Lawrence, D. Myssiorek, A. Bosch, A. van der Mey, P.E. Taschner, W.S. Rubinstein, E.N. Myers, C.W. Richard, 3rd, C.J. Cornelisse, P. Devilee, B. Devlin (2000) Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*, 287: 848-851
20. Burnichon, N., J.J. Briere, R. Libe, L. Vescovo, J. Riviere, F. Tissier, E. Jouanno, X. Jeunemaitre, P. Benit, A. Tzagoloff, P. Rustin, J. Bertherat, J. Favier, A.P. Gimenez-Roqueplo (2010) SDHA is a tumor suppressor gene causing paraganglioma. *Hum Mol Genet*, 19: 3011-3020
21. Cascon, A., I. Comino-Mendez, M. Curras-Freixes, A.A. de Cubas, L. Contreras, S. Richter, M. Peitzsch, V. Mancikova, L. Inglada-Perez, A. Perez-Barrios, M. Calatayud, S. Azriel, R. Villar-Vicente, J. Aller, F. Setien, S. Moran, J.F. Garcia, A. Rio-Machin, R. Leton, A. Gomez-Grana, M. Apellaniz-Ruiz, G. Roncador, M. Esteller, C. Rodriguez-Antona, J. Satrustegui, G. Eisenhofer, M. Urioste, M. Robledo (2015) Whole-exome sequencing identifies MDH2 as a new familial paraganglioma gene. *J Natl Cancer Inst*, 107
22. Castro-Vega, L.J., A. Buffet, A.A. De Cubas, A. Cascon, M. Menara, E. Khalifa, L. Amar, S. Azriel, I. Bourdeau, O. Chabre, M. Curras-Freixes, V. Franco-Vidal, M. Guillaud-Bataille, C. Simian, A. Morin, R. Leton, A. Gomez-Grana, P.J. Pollard, P. Rustin, M. Robledo, J. Favier, A.P. Gimenez-Roqueplo (2014)

- Germline mutations in FH confer predisposition to malignant pheochromocytomas and paragangliomas. *Hum Mol Genet*, 23: 2440-2446
23. Gimenez-Roqueplo, A.P., J. Favier, P. Rustin, C. Rieubland, M. Crespin, V. Nau, P. Khau Van Kien, P. Corvol, P.F. Plouin, X. Jeunemaitre (2003) Mutations in the SDHB gene are associated with extra-adrenal and/or malignant pheochromocytomas. *Cancer Res*, 63: 5615-5621
 24. Niemann, S. and U. Muller (2000) Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3. *Nat Genet*, 26: 268-270
 25. Remacha, L., I. Comino-Mendez, S. Richter, L. Contreras, M. Curras-Freixes, G. Pita, R. Leton, A. Galarreta, R. Torres-Perez, E. Honrado, S. Jimenez, L. Maestre, S. Moran, M. Esteller, J. Satrustegui, G. Eisenhofer, M. Robledo, A. Cascon (2017) Targeted Exome Sequencing of Krebs Cycle Genes Reveals Candidate Cancer-Predisposing Mutations in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *Clin Cancer Res*, 23: 6315-6324
 26. Gimenez-Roqueplo, A.P., P.L. Dahia, M. Robledo (2012) An update on the genetics of paraganglioma, pheochromocytoma, and associated hereditary syndromes. *Horm Metab Res*, 44: 328-333
 27. Neumann, H.P., B. Bausch, S.R. McWhinney, B.U. Bender, O. Gimm, G. Franke, J. Schipper, J. Klisch, C. Althoefer, K. Zerres, A. Januszewicz, C. Eng, W.M. Smith, R. Munk, T. Manz, S. Glaesker, T.W. Apel, M. Treier, M. Reineke, M.K. Walz, C. Hoang-Vu, M. Brauckhoff, A. Klein-Franke, P. Klose, H. Schmidt, M. Maier-Woelfle, M. Peczkowska, C. Szmigielski, C. Eng (2002) Germ-line mutations in nonsyndromic pheochromocytoma. *N Engl J Med*, 346: 1459-1466
 28. Wadt, K., J. Choi, J.Y. Chung, J. Kiilgaard, S. Heegaard, K.T. Drzewiecki, J.M. Trent, S.M. Hewitt, N.K. Hayward, A.M. Gerdes, K.M. Brown (2012) A cryptic BAP1 splice mutation in a family with uveal and cutaneous melanoma, and paraganglioma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 25: 815-818
 29. Castro-Vega, L.J., C. Lepoutre-Lussey, A.P. Gimenez-Roqueplo, J. Favier (2016) Rethinking pheochromocytomas and paragangliomas from a genomic perspective. *Oncogene*, 35: 1080-1089

30. Curras-Freixes, M., L. Inglada-Perez, V. Mancikova, C. Montero-Conde, R. Leton, I. Comino-Mendez, M. Apellaniz-Ruiz, L. Sanchez-Barroso, M. Aguirre Sanchez-Covisa, V. Alcazar, J. Aller, C. Alvarez-Escola, V.M. Andia-Melero, S. Azriel-Mira, M. Calatayud-Gutierrez, J.A. Diaz, A. Diez-Hernandez, C. Lamas-Oliveira, M. Marazuela, X. Matias-Guiu, A. Meoro-Aviles, A. Patino-Garcia, S. Pedrinaci, G. Riesco-Eizaguirre, C. Sabado-Alvarez, R. Saez-Villaverde, A. Sainz de Los Terreros, O. Sanz Guadarrama, J. Sastre-Marcos, B. Scola-Yurrita, A. Segura-Huerta, L. Serrano-Corredor Mde, M.R. Villar-Vicente, C. Rodriguez-Antona, E. Korpershoek, A. Cascon, M. Robledo (2015) Recommendations for somatic and germline genetic testing of single pheochromocytoma and paraganglioma based on findings from a series of 329 patients. *J Med Genet*, 52: 647-656
31. Favier, J., L. Amar, A.P. Gimenez-Roqueplo (2015) Paraganglioma and phaeochromocytoma: from genetics to personalized medicine. *Nat Rev Endocrinol*, 11: 101-111
32. Bjorklund, P., K. Pacak, J. Crona (2016) Precision medicine in pheochromocytoma and paraganglioma: current and future concepts. *J Intern Med*, 280: 559-573
33. Lenders, J.W., Q.Y. Duh, G. Eisenhofer, A.P. Gimenez-Roqueplo, S.K. Grebe, M.H. Murad, M. Naruse, K. Pacak, W.F. Young, Jr. (2014) Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*, 99: 1915-1942
34. Dahia, P.L.M. (2014) Pheochromocytoma and paraganglioma pathogenesis: learning from genetic heterogeneity. *Nat Rev Cancer*, 14: 108-119
35. Kim, W.Y. and W.G. Kaelin (2004) Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol*, 22: 4991-5004
36. Dahia, P.L., K.N. Ross, M.E. Wright, C.Y. Hayashida, S. Santagata, M. Barontini, A.L. Kung, G. Sanso, J.F. Powers, A.S. Tischler, R. Hodin, S. Heitritter, F. Moore, R. Dluhy, J.A. Sosa, I.T. Ocal, D.E. Benn, D.J. Marsh, B.G. Robinson, K. Schneider, J. Garber, S.M. Arum, M. Korbonits, A. Grossman, P. Pigny, S.P. Toledo, V. Nose, C. Li, C.D. Stiles (2005) A HIF1alpha regulatory

- loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet*, 1: 72-80
37. Xiao, M., H. Yang, W. Xu, S. Ma, H. Lin, H. Zhu, L. Liu, Y. Liu, C. Yang, Y. Xu, S. Zhao, D. Ye, Y. Xiong, K.-L. Guan (2012) Inhibition of α -KG-dependent histone and DNA demethylases by fumarate and succinate that are accumulated in mutations of FH and SDH tumor suppressors. *Genes Dev*, 26: 1326-1338
 38. Santoro, M., F. Carlomagno, A. Romano, D.P. Bottaro, N.A. Dathan, M. Grieco, A. Fusco, G. Vecchio, B. Matoskova, M.H. Kraus (1995) Activation of RET as a dominant transforming gene by germline mutations of MEN2A and MEN2B. *Science*, 267: 381-383
 39. Asai, N., T. Iwashita, M. Matsuyama, M. Takahashi (1995) Mechanism of activation of the ret proto-oncogene by multiple endocrine neoplasia 2A mutations. *Mol Cell Biol*, 15: 1613-1619
 40. Viskochil, D., A.M. Buchberg, G. Xu, R.M. Cawthon, J. Stevens, R.K. Wolff, M. Culver, J.C. Carey, N.G. Copeland, N.A. Jenkins (1990) Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus. *Cell*, 62: 187-192
 41. Ballester, R., D. Marchuk, M. Boguski, A. Saulino, R. Letcher, M. Wigler, F. Collins (1990) The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell*, 63: 851-859
 42. Blackwood, E.M., B. Lüscher, R.N. Eisenman (1992) Myc and Max associate in vivo. *Genes Dev*, 6: 71-80
 43. Burnichon, N., A. Cascón, F. Schiavi, N.P. Morales, I. Comino-Méndez, N. Abermil, L. Inglada-Pérez, A.A. de Cubas, L. Amar, M. Barontini, S.B. de Quirós, J. Bertherat, Y.J. Bignon, M.J. Blok, S. Bobisse, S. Borrego, M. Castellano, P. Chanson, M.D. Chiara, E.P. Corssmit, M. Giacchè, R.R. de Krijger, T. Ercolino, X. Girerd, E.B. Gómez-García, A. Gómez-Graña, I. Guilhem, F.J. Hes, E. Honrado, E. Korpershoek, J.W. Lenders, R. Letón, A.R. Mensenkamp, A. Merlo, L. Mori, A. Murat, P. Pierre, P.F. Plouin, T. Prodanov, M. Quesada-Charneco, N. Qin, E. Rapizzi, V. Raymond, N. Reisch, G. Roncador, M. Ruiz-Ferrer, F. Schillo, A.P. Stegmann, C. Suarez, E. Taschin,

- H.J. Timmers, C.M. Tops, M. Urioste, F. Beuschlein, K. Pacak, M. Mannelli, P.L. Dahia, G. Opocher, G. Eisenhofer, A.P. Gimenez-Roqueplo, M. Robledo (2012) MAX mutations cause hereditary and sporadic pheochromocytoma and paraganglioma. *Clin Cancer Res*, 18: 2828-2837
44. Qin, Y., L. Yao, E.E. King, K. Buddavarapu, R.E. Lenci, E.S. Chocron, J.D. Lechleiter, M. Sass, N. Aronin, F. Schiavi, F. Boaretto, G. Opocher, R.A. Toledo, S.P. Toledo, C. Stiles, R.C. Aguiar, P.L. Dahia (2010) Germline mutations in TMEM127 confer susceptibility to pheochromocytoma. *Nat Genet*, 42: 229-233
45. Van Vranken, J.G., D.K. Bricker, N. Dephoure, S.P. Gygi, J.E. Cox, C.S. Thummel, J. Rutter (2014) SDHAF4 promotes mitochondrial succinate dehydrogenase activity and prevents neurodegeneration. *Cell Metab*, 20: 241-252
46. Tretter, L., A. Patocs, C. Chinopoulos (2016) Succinate, an intermediate in metabolism, signal transduction, ROS, hypoxia, and tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1857: 1086-1101
47. Raimundo, N., B.E. Baysal, G.S. Shadel (2011) Revisiting the TCA cycle: signaling to tumor formation. *Trends Mol Med*, 17: 641-649
48. Papa, S., P.L. Martino, G. Capitanio, A. Gaballo, D. De Rasio, A. Signorelli, V. Petruzzella (2012) The oxidative phosphorylation system in mammalian mitochondria. *Adv Exp Med Biol*, 942: 3-37
49. Bayley, J.P., H.P. Kunst, A. Cascon, M.L. Sampietro, J. Gaal, E. Korpershoek, A. Hinojar-Gutierrez, H.J. Timmers, L.H. Hoefsloot, M.A. Hermsen, C. Suarez, A.K. Hussain, A.H. Vriends, F.J. Hes, J.C. Jansen, C.M. Tops, E.P. Corssmit, P. de Krijff, J.W. Lenders, C.W. Cremers, P. Devilee, W.N. Dinjens, R.R. de Krijger, M. Robledo (2010) SDHAF2 mutations in familial and sporadic paraganglioma and pheochromocytoma. *Lancet Oncol*, 11: 366-372
50. Neumann, H.P., C. Pawlu, M. Peczkowska, B. Bausch, S.R. McWhinney, M. Muresan, M. Buchta, G. Franke, J. Klisch, T.A. Bley, S. Hoegerle, C.C. Boedeker, G. Opocher, J. Schipper, A. Januszewicz, C. Eng (2004) Distinct

- clinical features of paraganglioma syndromes associated with SDHB and SDHD gene mutations. *Jama*, 292: 943-951
51. Andrews, K.A., D.B. Ascher, D.E.V. Pires, D.R. Barnes, L. Vialard, R.T. Casey, N. Bradshaw, J. Adlard, S. Aylwin, P. Brennan, C. Brewer, T. Cole, J.A. Cook, R. Davidson, A. Donaldson, A. Fryer, L. Greenhalgh, S.V. Hodgson, R. Irving, F. Laloo, M. McConachie, V.P.M. McConnell, P.J. Morrison, V. Murday, S.-M. Park, H.L. Simpson, K. Snape, S. Stewart, S.E. Tomkins, Y. Wallis, L. Izatt, D. Goudie, R.S. Lindsay, C.G. Perry, E.R. Woodward, A.C. Antoniou, E.R. Maher (2018) Tumour risks and genotype-phenotype correlations associated with germline variants in succinate dehydrogenase subunit genes SDHB, SDHC and SDHD. *J Med Genet*, 55: 384-394
 52. Korpershoek, E., R.R. de Krijger, W.N.M. Dinjens, J. Gaal, A.-P. Gimenez-Roqueplo, I. Roncelin, N. Burnichon, J.r.m. Bertherat, P.-F.o. Plouin (2010) Isocitrate Dehydrogenase Mutations Are Rare in Pheochromocytomas and Paragangliomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 1274-1278
 53. Yang, M., T. Soga, P.J. Pollard (2013) Oncometabolites: linking altered metabolism with cancer. *J Clin Invest*, 123: 3652-3658
 54. Collins, R.R.J., K. Patel, W.C. Putnam, P. Kapur, D. Rakheja (2017) Oncometabolites: A New Paradigm for Oncology, Metabolism, and the Clinical Laboratory. *Clin Chem*, 63: 1812-1820
 55. Ricketts, C., E.R. Woodward, P. Killick, M.R. Morris, D. Astuti, F. Latif, E.R. Maher (2008) Germline SDHB Mutations and Familial Renal Cell Carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 100: 1260-1262
 56. Janeway, K.A., S.Y. Kim, M. Lodish, V. Nosé, P. Rustin, J. Gaal, P.L. Dahia, B. Liegl, E.R. Ball, M. Raygada, A.H. Lai, L. Kelly, J.L. Hornick, M. O'Sullivan, R.R. de Krijger, W.N. Dinjens, G.D. Demetri, C.R. Antonescu, J.A. Fletcher, L. Helman, C.A. Stratakis (2011) Defects in succinate dehydrogenase in gastrointestinal stromal tumors lacking KIT and PDGFRA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 314-318

57. Cao, Z., J.H. Song, Y.W. Kang, J.H. Yoon, S.W. Nam, J.Y. Lee, W.S. Park (2010) Analysis of succinate dehydrogenase subunit B gene alterations in gastric cancers. *Pathol Int*, 60: 559-565
58. Selak, M.A., S.M. Armour, E.D. MacKenzie, H. Boulahbel, D.G. Watson, K.D. Mansfield, Y. Pan, M.C. Simon, C.B. Thompson, E. Gottlieb (2005) Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*, 7: 77-85
59. Safran, M. and W.G. Kaelin (2003) HIF hydroxylation and the mammalian oxygen-sensing pathway. *The Journal of clinical investigation*, 111: 779-783
60. Schofield, C.J. and P.J. Ratcliffe (2004) Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5: 343-354
61. MacKenzie, E.D., M.A. Selak, D.A. Tennant, L.J. Payne, S. Crosby, C.M. Frederiksen, D.G. Watson, E. Gottlieb (2007) Cell-permeating α -ketoglutarate derivatives alleviate pseudohypoxia in succinate dehydrogenase-deficient cells. *Mol Cell Biol*, 27: 3282-3289
62. Morin, A., E. Letouze, A.P. Gimenez-Roqueplo, J. Favier (2014) Oncometabolites-driven tumorigenesis: From genetics to targeted therapy. *Int J Cancer*, 135: 2237-2248
63. Hanahan, D. and R.A. Weinberg (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144: 646-674
64. Wentzel, J.F., A. Lewies, A.J. Bronkhorst, E. van Dyk, L.H. du Plessis, P.J. Pretorius (2017) Exposure to high levels of fumarate and succinate leads to apoptotic cytotoxicity and altered global DNA methylation profiles in vitro. *Biochimie*, 135: 28-34
65. Hanahan, D. and Robert A. Weinberg (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144: 646-674
66. Chen, L. and H. Cui (2015) Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach. *International journal of molecular sciences*, 16: 22830-22855
67. DeBerardinis, R.J., A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrli, C.B. Thompson (2007) Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can

- engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 19345-19350
68. Zhdanov, A.V., A.H. Waters, A.V. Golubeva, R.I. Dmitriev, D.B. Papkovsky (2014) Availability of the key metabolic substrates dictates the respiratory response of cancer cells to the mitochondrial uncoupling. *Biochim Biophys Acta*, 1837: 51-62
 69. Chinopoulos, C. and T.N. Seyfried (2018) Mitochondrial Substrate-Level Phosphorylation as Energy Source for Glioblastoma: Review and Hypothesis. *ASN neuro*, 10: 1759091418818261-1759091418818261
 70. Cardaci, S. and M.R. Ciriolo (2012) TCA Cycle Defects and Cancer: When Metabolism Tunes Redox State. *Int J Cell Biol*, 2012: 161837
 71. Mates, J.M., J.A. Segura, M. Martin-Rufian, J.A. Campos-Sandoval, F.J. Alonso, J. Marquez (2013) Glutaminase isoenzymes as key regulators in metabolic and oxidative stress against cancer. *Curr Mol Med*, 13: 514-534
 72. Whillier, S., B. Garcia, B.E. Chapman, P.W. Kuchel, J.E. Raftos (2011) Glutamine and alpha-ketoglutarate as glutamate sources for glutathione synthesis in human erythrocytes. *Febs j*, 278: 3152-3163
 73. Lampa, M., H. Arlt, T. He, B. Ospina, J. Reeves, B. Zhang, J. Murtie, G. Deng, C. Barberis, D. Hoffmann, H. Cheng, J. Pollard, C. Winter, V. Richon, C. Garcia-Escheverria, F. Adrian, D. Wiederschain, L. Srinivasan (2017) Glutaminase is essential for the growth of triple-negative breast cancer cells with a deregulated glutamine metabolism pathway and its suppression synergizes with mTOR inhibition. *PLoS One*, 12: e0185092
 74. Wang, J.B., J.W. Erickson, R. Fuji, S. Ramachandran, P. Gao, R. Dinavahi, K.F. Wilson, A.L. Ambrosio, S.M. Dias, C.V. Dang, R.A. Cerione (2010) Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. *Cancer Cell*, 18: 207-219
 75. van den Heuvel, A.P., J. Jing, R.F. Wooster, K.E. Bachman (2012) Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth. *Cancer Biol Ther*, 13: 1185-1194

76. Cassago, A., A.P. Ferreira, I.M. Ferreira, C. Fornezari, E.R. Gomes, K.S. Greene, H.M. Pereira, R.C. Garratt, S.M. Dias, A.L. Ambrosio (2012) Mitochondrial localization and structure-based phosphate activation mechanism of Glutaminase C with implications for cancer metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 1092-1097
77. Imperiale, A., F.-M. Moussallieh, F. Sebag, L. Brunaud, A. Barlier, K. Elbayed, P. Bachellier, B. Goichot, K. Pacak, I.-J. Namer, D. Taïeb (2013) A New Specific Succinate-Glutamate Metabolomic Hallmark in Sdhx-Related Paragangliomas. *PLoS ONE*, 8: e80539
78. Lee, C.-H., G. Gundem, W. Lee, Y.-B. Chen, J.R. Cross, Y. Dong, A. Redzematovic, R. Mano, E.Y. Wei, E.H. Cheng, R. Srinivasan, D. Oswald, A.A. Hakimi, M.P. Dunphy, W.M. Linehan, E. Papaemmanuil, J.J. Hsieh (2017) Persistent Severe Hyperlactatemia and Metabolic Derangement in Lethal SDHB-Mutated Metastatic Kidney Cancer: Clinical Challenges and Examples of Extreme Warburg Effect. *JCO Precis Oncol*: 1-14
79. Lussey-Lepoutre, C., K.E. Hollinshead, C. Ludwig, M. Menara, A. Morin, L.J. Castro-Vega, S.J. Parker, M. Janin, C. Martinelli, C. Ottolenghi, C. Metallo, A.P. Gimenez-Roqueplo, J. Favier, D.A. Tennant (2015) Loss of succinate dehydrogenase activity results in dependency on pyruvate carboxylation for cellular anabolism. *Nat Commun*, 6: 8784
80. Kårlund, A., K. Hanhineva, M. Lehtonen, G.J. McDougall, D. Stewart, R.O. Karjalainen (2017) Non-targeted metabolite profiling highlights the potential of strawberry leaves as a resource for specific bioactive compounds. *J Sci Food Agric*, 97: 2182-2190
81. Shin, J.H., J.Y. Yang, B.Y. Jeon, Y.J. Yoon, S.N. Cho, Y.H. Kang, D.H. Ryu, G.S. Hwang (2011) (1)H NMR-based metabolomic profiling in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Proteome Res*, 10: 2238-2247
82. Daniels, B.P., S.B. Kofman, J.R. Smith, G.T. Norris, A.G. Snyder, J.P. Kolb, X. Gao, J.W. Locasale, J. Martinez, M. Gale, Jr., Y.M. Loo, A. Oberst (2019) The Nucleotide Sensor ZBP1 and Kinase RIPK3 Induce the Enzyme IRG1 to Promote an Antiviral Metabolic State in Neurons. *Immunity*, 50: 64-76.e64

83. Kvitvang, H.F., T. Andreassen, T. Adam, S.G. Villas-Boas, P. Bruheim (2011) Highly sensitive GC/MS/MS method for quantitation of amino and nonamino organic acids. *Anal Chem*, 83: 2705-2711
84. Wibom, C., I. Surowiec, L. Moren, P. Bergstrom, M. Johansson, H. Antti, A.T. Bergenheim (2010) Metabolomic patterns in glioblastoma and changes during radiotherapy: a clinical microdialysis study. *J Proteome Res*, 9: 2909-2919
85. Michelucci, A., T. Cordes, J. Ghelfi, A. Pailot, N. Reiling, O. Goldmann, T. Binz, A. Wegner, A. Tallam, A. Rausell, M. Buttini, C.L. Linster, E. Medina, R. Balling, K. Hiller (2013) Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110: 7820-7825
86. Patel, T.R. and B.A. McFadden (1978) *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*: inhibition of isocitrate lyase by itaconate. *Exp Parasitol*, 44: 262-268
87. Hillier, S. and W.T. Charnetzky (1981) Glyoxylate bypass enzymes in *Yersinia* species and multiple forms of isocitrate lyase in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol*, 145: 452-458
88. Steiger, M.G., M.L. Blumhoff, D. Mattanovich, M. Sauer (2013) Biochemistry of microbial itaconic acid production. *Front Microbiol*, 4: 23
89. Okabe, M., D. Lies, S. Kanamasa, E.Y. Park (2009) Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 84: 597-606
90. Booth, A.N., J. Taylor, R.H. Wilson, F. DeEds (1952) The inhibitory effects of itaconic acid in vitro and in vivo. *J. Biol. Chem*, 195: 697-702
91. Adler, J., S.-F. Wang, H.A. Lardy (1957) The metabolism of itaconic acid by liver mitochondria. *J. Biol. Chem*, 229: 865-879
92. Dervartanian, D.V. and C. Veeger (1964) Studies on succinate dehydrogenase: I. Spectral properties of the purified enzyme and formation of enzyme-competitive inhibitor complexes. *Biochim Biophys Acta*, 92: 233-247
93. Abramov, A.Y. and M.R. Duchen (2005) The role of an astrocytic NADPH oxidase in the neurotoxicity of amyloid beta peptides. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 360: 2309-2314

94. Abramov, A.Y. and M.R. Duchon (2008) Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta*, 1777: 953-964
95. Nemeth, B., J. Doczi, D. Csete, G. Kacso, D. Ravasz, D. Adams, G. Kiss, A.M. Nagy, G. Horvath, L. Tretter, A. Mocsai, R. Csepanyi-Komi, I. Iordanov, V. Adam-Vizi, C. Chinopoulos (2016) Abolition of mitochondrial substrate-level phosphorylation by itaconic acid produced by LPS-induced Irg1 expression in cells of murine macrophage lineage. *Faseb j*, 30: 286-300
96. Wang, S.-F., J. Adler, H.A. Lardy (1961) The pathway of itaconate metabolism by liver mitochondria. *J. Biol. Chem*, 236: 26-30
97. Horsefield, R., V. Yankovskaya, G. Sexton, W. Whittingham, K. Shiomi, S. Omura, B. Byrne, G. Cecchini, S. Iwata (2006) Structural and computational analysis of the quinone-binding site of complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase): a mechanism of electron transfer and proton conduction during ubiquinone reduction. *J Biol Chem*, 281: 7309-7316
98. Miyadera, H., K. Shiomi, H. Ui, Y. Yamaguchi, R. Masuma, H. Tomoda, H. Miyoshi, A. Osanai, K. Kita, S. Omura (2003) Atpenins, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 473-477
99. Sharma, S., J. Wang, E. Cortes Gomez, R.T. Taggart, B.E. Baysal (2017) Mitochondrial complex II regulates a distinct oxygen sensing mechanism in monocytes. *Hum Mol Genet*, 26: 1328-1339
100. Patócs, A., I. Likó, H. Butz, K. Baghy, K. Rácz (2015) Novel methods and their applicability in the evaluation of the genetic background of endocrine system tumours. [Új módszertani lehetőségek és ezek alkalmazása a hormonális rendszer daganatainak genetikai kivizsgálásában.]. *Orv Hetil*, 156: 2063-2069
101. Robson, M.E., A.R. Bradbury, B. Arun, S.M. Domchek, J.M. Ford, H.L. Hampel, S.M. Lipkin, S. Syngal, D.S. Wollins, N.M. Lindor (2015) American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol*, 33: 3660-3667

102. Toledo, R.A. and P.L. Dahia (2015) Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary pheochromocytoma and paraganglioma syndromes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 22: 169-179
103. Toledo, R.A. (2017) Genetics of Pheochromocytomas and Paragangliomas: An Overview on the Recently Implicated Genes MERTK, MET, Fibroblast Growth Factor Receptor 1, and H3F3A. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 46: 459-489
104. Patocs, A., N.K. Lendvai, H. Butz, I. Liko, Z. Sapi, N. Szucs, G. Toth, V.K. Grolmusz, P. Igaz, M. Toth, K. Racz (2016) Novel SDHB and TMEM127 Mutations in Patients with Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndrome. *Pathol Oncol Res*, 22: 673-679
105. Gergics, P., J. Toke, A. Szilagyi, A. Szappanos, Z. Kender, G. Barta, M. Toth, P. Igaz, K. Racz, A. Patocs (2009) [Methods for the analysis of large gene deletions and their application in some hereditary diseases]. *Orv Hetil*, 150: 2258-2264
106. McKenna, A., M. Hanna, E. Banks, A. Sivachenko, K. Cibulskis, A. Kernytsky, K. Garimella, D. Altshuler, S. Gabriel, M. Daly, M.A. DePristo (2010) The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res*, 20: 1297-1303
107. Martin, M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. 2011, 17: 3
108. Li, H. and R. Durbin (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 26: 589-595
109. Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G. Abecasis, R. Durbin (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25: 2078-2079
110. Cingolani, P., A. Platts, L. Wang le, M. Coon, T. Nguyen, L. Wang, S.J. Land, X. Lu, D.M. Ruden (2012) A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*, 6: 80-92
111. Cingolani, P., V.M. Patel, M. Coon, T. Nguyen, S.J. Land, D.M. Ruden, X. Lu (2012) Using *Drosophila melanogaster* as a Model for Genotoxic Chemical Mutational Studies with a New Program, SnpSift. *Front Genet*, 3: 35

112. Adzhubei, I.A., S. Schmidt, L. Peshkin, V.E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A.S. Kondrashov, S.R. Sunyaev (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*, 7: 248-249
113. De Baets, G., J. Van Durme, J. Reumers, S. Maurer-Stroh, P. Vanhee, J. Dopazo, J. Schymkowitz, F. Rousseau (2012) SNPeffect 4.0: on-line prediction of molecular and structural effects of protein-coding variants. *Nucleic Acids Research*, 40: D935-D939
114. Sherry, S.T., M.H. Ward, M. Kholodov, J. Baker, L. Phan, E.M. Smigielski, K. Sirotkin (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29: 308-311
115. Gibbs, R.A., J.W. Belmont, P. Hardenbol, T.D. Willis, F. Yu, H. Yang, L.-Y. Ch'ang, W. Huang, B. Liu, Y. Shen, P.K.-H. Tam, L.-C. Tsui, M.M.Y. Waye, J.T.-F. Wong, C. Zeng, Q. Zhang, M.S. Chee, L.M. Galver, S. Kruglyak, S.S. Murray, A.R. Oliphant, A. Montpetit, T.J. Hudson, F. Chagnon, V. Ferretti, M. Leboeuf, M.S. Phillips, A. Verner, P.-Y. Kwok, S. Duan, D.L. Lind, R.D. Miller, J.P. Rice, N.L. Saccone, P. Taillon-Miller, M. Xiao, Y. Nakamura, A. Sekine, K. Sorimachi, T. Tanaka, Y. Tanaka, T. Tsunoda, E. Yoshino, D.R. Bentley, P. Deloukas, S. Hunt, D. Powell, D. Altshuler, S.B. Gabriel, H. Zhang, C. Zeng, I. Matsuda, Y. Fukushima, D.R. Macer, E. Suda, C.N. Rotimi, C.A. Adebamowo, T. Aniagwu, P.A. Marshall, O. Matthew, C. Nkwodimmah, C.D.M. Royal, M.F. Leppert, M. Dixon, L.D. Stein, F. Cunningham, A. Kanani, G.A. Thorisson, A. Chakravarti, P.E. Chen, D.J. Cutler, C.S. Kashuk, P. Donnelly, J. Marchini, G.A.T. McVean, S.R. Myers, L.R. Cardon, G.R. Abecasis, A. Morris, B.S. Weir, J.C. Mullikin, S.T. Sherry, M. Feolo, D. Altshuler, M.J. Daly, S.F. Schaffner, R. Qiu, A. Kent, G.M. Dunston, K. Kato, N. Niikawa, B.M. Knoppers, M.W. Foster, E.W. Clayton, V.O. Wang, J. Watkin, R.A. Gibbs, J.W. Belmont, E. Sodergren, G.M. Weinstock, R.K. Wilson, L.L. Fulton, J. Rogers, B.W. Birren, H. Han, H. Wang, M. Godbout, J.C. Wallenburg, P. L'Archevêque, G. Bellemare, K. Todani, T. Fujita, S. Tanaka, A.L. Holden, E.H. Lai, F.S. Collins, L.D. Brooks, J.E. McEwen, M.S. Guyer, E. Jordan, J.L. Peterson, J. Spiegel, L.M. Sung, L.F. Zacharia, K.

- Kennedy, M.G. Dunn, R. Seabrook, M. Shillito, B. Skene, J.G. Stewart, D.L. Valle, E.W. Clayton, L.B. Jorde, J.W. Belmont, A. Chakravarti, M.K. Cho, T. Duster, M.W. Foster, M. Jasperse, B.M. Knoppers, P.-Y. Kwok, J. Licinio, J.C. Long, P.A. Marshall, P.N. Ossorio, V.O. Wang, C.N. Rotimi, C.D.M. Royal, P. Spallone, S.F. Terry, E.S. Lander, E.H. Lai, D.A. Nickerson, G.R. Abecasis, D. Altshuler, D.R. Bentley, M. Boehnke, L.R. Cardon, M.J. Daly, P. Deloukas, J.A. Douglas, S.B. Gabriel, R.R. Hudson, T.J. Hudson, L. Kruglyak, P.-Y. Kwok, Y. Nakamura, R.L. Nussbaum, C.D.M. Royal, S.F. Schaffner, S.T. Sherry, L.D. Stein, T. Tanaka, C. †The International HapMap, M. Genotyping centres: Baylor College of, B. ParAllele, C. Chinese HapMap, Illumina, U. McGill, C. Génome Québec Innovation, F. University of California at San, U. Washington, T. University of, Riken, I. Wellcome Trust Sanger, M.I.T.C.f.G.R. Whitehead Institute, c. Community engagement/public, U. sample-collection groups: Beijing Normal, I. Beijing Genomics, E.E.I. Health Sciences University of Hokkaido, U. Shinshu, U. Howard, I. University of, U. University of, L. Analysis Groups: Cold Spring Harbor, M. Johns Hopkins University School of, O. University of, W.T.C.f.H.G. University of Oxford, U.S.N.I.o. Health, L. Ethical, S. Social Issues: Chinese Academy of Social, G. Genetic Interest, U. Howard, U. Kyoto, U. Nagasaki, M. University of, O. University of, U. Vanderbilt, T. Wellcome, S.N.P.D.B.C.o. Medicine, U. Washington, S. Scientific Management: Chinese Academy of, S. Chinese Ministry of, Technology, C. Genome, Q. Génome, C.S.S. Japanese Ministry of Education, Technology, S.N.P.C. The, P. Initial Planning Groups, L. Ethical, G. Social Issues and G. Methods (2003) The International HapMap Project. *Nature*, 426: 789-796
116. The Genomes Project, C. (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526: 68-74
117. Szoboszlai, N., X. Guo, O. Ozohanics, J. Olah, A. Gomory, V.G. Mihucz, A. Jeney, K. Vekey (2014) Determination of energy metabolites in cancer cells by porous graphitic carbon liquid chromatography electrospray ionization mass

- spectrometry for the assessment of energy metabolism. *Anal Chim Acta*, 819: 108-115
118. Jády, A.G., Á.M. Nagy, T. Kóhidi, S. Ferenczi, L. Tretter, E. Madarász (2016) Differentiation-Dependent Energy Production and Metabolite Utilization: A Comparative Study on Neural Stem Cells, Neurons, and Astrocytes. *Stem Cells Dev*, 25: 995-1005
119. Nagy, A.M., R. Fekete, G. Horvath, G. Koncsos, C. Kriston, A. Sebestyén, Z. Giricz, Z. Kornyei, E. Madarász, L. Tretter (2018) Versatility of microglial bioenergetic machinery under starving conditions. *Biochim Biophys Acta*, 1859: 201-214
120. Gerencsér, A.A., C. Chinopoulos, M.J. Birket, M. Jastroch, C. Vitelli, D.G. Nicholls, M.D. Brand (2012) Quantitative measurement of mitochondrial membrane potential in cultured cells: calcium-induced de- and hyperpolarization of neuronal mitochondria. *J Physiol*, 590: 2845-2871
121. Wells, S.A., Jr., S.L. Asa, H. Dralle, R. Elisei, D.B. Evans, R.F. Gagel, N. Lee, A. Machens, J.F. Moley, F. Pacini, F. Raue, K. Frank-Raue, B. Robinson, M.S. Rosenthal, M. Santoro, M. Schlumberger, M. Shah, S.G. Waguespack, C. American Thyroid Association Guidelines Task Force on Medullary Thyroid (2015) Revised American Thyroid Association guidelines for the management of medullary thyroid carcinoma. *Thyroid*, 25: 567-610
122. Moyer, V.A. (2014) Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*, 160: 271-281
123. Lendvai, N., R. Pawlosky, P. Bullova, G. Eisenhofer, A. Patocs, R.L. Veech, K. Pacak (2014) Succinate-to-fumarate ratio as a new metabolic marker to detect the presence of SDHB/D-related paraganglioma: initial experimental and ex vivo findings. *Endocrinology*, 155: 27-32
124. Andrews, K.A., D.B. Ascher, D.E.V. Pires, D.R. Barnes, L. Vialard, R.T. Casey, N. Bradshaw, J. Adlard, S. Aylwin, P. Brennan, C. Brewer, T. Cole, J.A. Cook, R. Davidson, A. Donaldson, A. Fryer, L. Greenhalgh, S.V. Hodgson, R. Irving, F. Laloo, M. McConachie, V.P.M. McConnell, P.J. Morrison, V. Murday, S.-M.

- Park, H.L. Simpson, K. Snape, S. Stewart, S.E. Tomkins, Y. Wallis, L. Izatt, D. Goudie, R.S. Lindsay, C.G. Perry, E.R. Woodward, A.C. Antoniou, E.R. Maher (2018) Tumour risks and genotype–phenotype correlations associated with germline variants in succinate dehydrogenase subunit genes SDHB, SDHC and SDHD. *J Med Genet*, 55: 1-11
125. Gill, A.J., O. Hes, T. Papathomas, M. Sedivcova, P.H. Tan, A. Agaimy, P.A. Andresen, A. Kedziora, A. Clarkson, C.W. Toon, L. Sioson, N. Watson, A. Chou, J. Paik, R.J. Clifton-Bligh, B.G. Robinson, D.E. Benn, K. Hills, F. Maclean, N.D. Niemeijer, L. Vlatkovic, A. Hartmann, E.P. Corssmit, G.J. van Leenders, C. Przybycin, J.K. McKenney, C. Magi-Galluzzi, A. Yilmaz, D. Yu, K.D. Nicoll, J.L. Yong, M. Sibony, E. Yakirevich, S. Fleming, C.W. Chow, M. Miettinen, M. Michal, K. Trpkov (2014) Succinate dehydrogenase (SDH)-deficient renal carcinoma: a morphologically distinct entity: a clinicopathologic series of 36 tumors from 27 patients. *Am J Surg Pathol*, 38: 1588-1602
126. Williamson, S.R., J.N. Eble, M.B. Amin, N.S. Gupta, S.C. Smith, L.M. Sholl, R. Montironi, M.S. Hirsch, J.L. Hornick (2015) Succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma: detailed characterization of 11 tumors defining a unique subtype of renal cell carcinoma. *Mod Pathol*, 28: 80-94
127. Kloos, R.T., C. Eng, D.B. Evans, G.L. Francis, R.F. Gagel, H. Gharib, J.F. Moley, F. Pacini, M.D. Ringel, M. Schlumberger, S.A. Wells, Jr. (2009) Medullary thyroid cancer: management guidelines of the American Thyroid Association. *Thyroid*, 19: 565-612
128. Stradella, A., J. del Valle, P. Rofes, L. Feliubadaló, È. Grau Garces, À. Velasco, S. González, G. Vargas, Á. Izquierdo, O. Campos, E. Tornero, M. Navarro, J. Balmaña-Gelpi, G. Capellá, M. Pineda, J. Brunet, C. Lázaro (2019) Does multilocus inherited neoplasia alleles syndrome have severe clinical expression? *J Med Genet*, 56: 521
129. Paluch-Shimon, S., F. Cardoso, C. Sessa, J. Balmana, M.J. Cardoso, F. Gilbert, E. Senkus (2016) Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening†. *Ann Oncol*, 27: v103-v110

130. Uhlen, M., L. Fagerberg, B.M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A. Szigyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J.M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, F. Ponten (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347: 1260419
131. Santarpia, L., L. Ye, R.F. Gagel (2009) Beyond RET: potential therapeutic approaches for advanced and metastatic medullary thyroid carcinoma. *J Intern Med*, 266: 99-113
132. Levine, A.J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88: 323-331
133. Zhang, H., K. Somasundaram, Y. Peng, H. Tian, H. Zhang, D. Bi, B.L. Weber, W.S. El-Deiry (1998) BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene*, 16: 1713-1721
134. Alevizaki, M., E. Kyrtzoglou, A. Bamias, M. Tzanela, M.A. Dimopoulos, K. Saltiki (2013) Metachronous appearance of second malignancies in medullary thyroid carcinoma (MTC) patients: a diagnostic challenge and brief review of the literature. *Endocrine*, 44: 610-615
135. Gagel, R.F., A.H. Tashjian, Jr., T. Cummings, N. Papathanasopoulos, M.M. Kaplan, R.A. DeLellis, H.J. Wolfe, S. Reichlin (1988) The clinical outcome of prospective screening for multiple endocrine neoplasia type 2a. An 18-year experience. *N Engl J Med*, 318: 478-484
136. Geldon, L., D. William, K. Hackmann, W. Jahn, A. Jahn, J. Wagner, A. Rump, N. Bechmann, S. Nolting, T. Knosel, V. Gudziol, G. Constantinescu, J. Masjkur, F. Beuschlein, H.J. Timmers, L. Canu, K. Pacak, M. Robledo, D. Aust, E. Schrock, G. Eisenhofer, S. Richter, B. Klink (2019) Optimizing Genetic Workup in Pheochromocytoma and Paraganglioma by Integrating Diagnostic and Research Approaches. *Cancers (Basel)*, 11

137. Ben Aim, L., P. Pigny, L.J. Castro-Vega, A. Buffet, L. Amar, J. Bertherat, D. Drui, I. Guilhem, E. Baudin, C. Lussey-Lepoutre, C. Corsini, G. Chabrier, C. Briet, L. Faivre, C. Cardot-Bauters, J. Favier, A.P. Gimenez-Roqueplo, N. Burnichon (2019) Targeted next-generation sequencing detects rare genetic events in pheochromocytoma and paraganglioma. *J Med Genet*, 56: 513-520
138. Richter, S., L. Gieldon, Y. Pang, M. Peitzsch, T. Huynh, R. Leton, B. Viana, T. Ercolino, A. Mangelis, E. Rapizzi, M. Menschikowski, D. Aust, M. Kroiss, F. Beuschlein, V. Gudziol, H.J. Timmers, J. Lenders, M. Mannelli, A. Cascon, K. Pacak, M. Robledo, G. Eisenhofer, B. Klink (2019) Metabolome-guided genomics to identify pathogenic variants in isocitrate dehydrogenase, fumarate hydratase, and succinate dehydrogenase genes in pheochromocytoma and paraganglioma. *Genet Med*, 21: 705-717
139. Pillai, S., V. Gopalan, C.Y. Lo, V. Liew, R.A. Smith, A.K. Lam (2017) Silent genetic alterations identified by targeted next-generation sequencing in pheochromocytoma/paraganglioma: A clinicopathological correlations. *Exp Mol Pathol*, 102: 41-46
140. Di Resta, C., S. Galbiati, P. Carrera, M. Ferrari (2018) Next-generation sequencing approach for the diagnosis of human diseases: open challenges and new opportunities. *EJIFCC*, 29: 4-14
141. Wang, L., J. Zhang, N. Chen, L. Wang, F. Zhang, Z. Ma, G. Li, L. Yang (2018) Application of Whole Exome and Targeted Panel Sequencing in the Clinical Molecular Diagnosis of 319 Chinese Families with Inherited Retinal Dystrophy and Comparison Study. *Genes*, 9: 360
142. Graziola, F., G. Garone, F. Stregapede, L. Bosco, F. Vigevano, P. Curatolo, E. Bertini, L. Travaglini, A. Capuano (2019) Diagnostic Yield of a Targeted Next-Generation Sequencing Gene Panel for Pediatric-Onset Movement Disorders: A 3-Year Cohort Study. *Frontiers in genetics*, 10: 1026-1026
143. Ayala-Ramirez, M., L. Feng, M.M. Johnson, S. Ejaz, M.A. Habra, T. Rich, N. Busaidy, G.J. Cote, N. Perrier, A. Phan, S. Patel, S. Waguespack, C. Jimenez (2011) Clinical risk factors for malignancy and overall survival in patients with pheochromocytomas and sympathetic paragangliomas: primary tumor size and

- primary tumor location as prognostic indicators. *J Clin Endocrinol Metab*, 96: 717-725
144. Jimenez, C. (2018) Treatment for Patients With Malignant Pheochromocytomas and Paragangliomas: A Perspective From the Hallmarks of Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9: 277
 145. Rehm, H.L., S.J. Bale, P. Bayrak-Toydemir, J.S. Berg, K.K. Brown, J.L. Deignan, M.J. Friez, B.H. Funke, M.R. Hegde, E. Lyon (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*, 15: 733-747
 146. Matthijs, G., E. Souche, M. Alders, A. Corveleyn, S. Eck, I. Feenstra, V. Race, E. Sistermans, M. Sturm, M. Weiss, H. Yntema, E. Bakker, H. Scheffer, P. Bauer (2016) Guidelines for diagnostic next-generation sequencing. *Eur J Hum Genet*, 24: 2-5
 147. Balázs, S., G. Vince Kornél, B. Henriett, K. Annamária, L. István, N. Gábor, I. Péter, P. Attila (2018) Molekuláris genetikai vizsgálatok az örökletes endokrinológiai tumor szindrómák klinikai diagnosztikájában. *Orvosi Hetilap*, 159: 285-292
 148. Boedeker, C.C., Z. Erlic, S. Richard, U. Kontny, A.P. Gimenez-Roqueplo, A. Cascon, M. Robledo, J.M. de Campos, F.H. van Nederveen, R.R. de Krijger, N. Burnichon, J. Gaal, M.A. Walter, K. Reschke, T. Wiech, J. Weber, K. Ruckauer, P.F. Plouin, V. Darrouzet, S. Giraud, C. Eng, H.P. Neumann (2009) Head and neck paragangliomas in von Hippel-Lindau disease and multiple endocrine neoplasia type 2. *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 1938-1944
 149. Boedeker, C.C., Z. Erlic, S. Richard, U. Kontny, A.-P. Gimenez-Roqueplo, A. Cascon, M. Robledo, J.M. de Campos, F.H. van Nederveen, R.R. de Krijger, N. Burnichon, J. Gaal, M.A. Walter, K. Reschke, T. Wiech, J. Weber, K. Rückauer, P.F. Plouin, V. Darrouzet, S. Giraud, C. Eng, H.P.H. Neumann (2009) Head and Neck Paragangliomas in Von Hippel-Lindau Disease and Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 1938-1944
 150. Patel, V.M., M.Z. Handler, R.A. Schwartz, W.C. Lambert (2017) Hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer syndrome: An update and review. *J Am Acad Dermatol*, 77: 149-158

151. Rehm, H.L., S.J. Bale, P. Bayrak-Toydemir, J.S. Berg, K.K. Brown, J.L. Deignan, M.J. Friez, B.H. Funke, M.R. Hegde, E. Lyon, G. for the Working Group of the American College of Medical, C. Genomics Laboratory Quality Assurance (2013) ACMG clinical laboratory standards for next-generation sequencing. *Genet Med*, 15: 733-747
152. Richards, S., N. Aziz, S. Bale, D. Bick, S. Das, J. Gastier-Foster, W.W. Grody, M. Hegde, E. Lyon, E. Spector, K. Voelkerding, H.L. Rehm, A.L.Q.A.C. on behalf of the (2015) 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*, 17: 405-423
153. Lendvai, N., M. Tóth, Z. Valkusz, G. Bekő, N. Szücs, E. Csajbók, P. Igaz, B. Kriszt, B. Kovács, K. Rác, A. Patócs (2012) Over-representation of the G12S polymorphism of the SDHD gene in patients with MEN2A syndrome. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 67 Suppl 1: 85-89
154. Malagelada, C. and L.A. Greene, Chapter 29 - PC12 Cells as a model for parkinson's disease research, in *Parkinson's Disease*, R. Nass and S. Przedborski, Editors., Academic Press, San Diego, 2008: p. 375-387.
155. Macville, M., E. Schröck, H. Padilla-Nash, C. Keck, B.M. Ghadimi, D. Zimonjic, N. Popescu, T. Ried (1999) Comprehensive and Definitive Molecular Cytogenetic Characterization of HeLa Cells by Spectral Karyotyping. *Cancer Research*, 59: 141-150
156. Ivanković, M., A. Ćukušić, I. Gotić, N. Škrobot, M. Matijašić, D. Polančec, I. Rubelj (2007) Telomerase activity in HeLa cervical carcinoma cell line proliferation. *Biogerontology*, 8: 163-172
157. Gazdar, A.F., H.K. Oie, C.H. Shackleton, T.R. Chen, T.J. Triche, C.E. Myers, G.P. Chrousos, M.F. Brennan, C.A. Stein, R.V. La Rocca (1990) Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res*, 50: 5488-5496
158. Gimenez-Roqueplo, A.P., J. Favier, P. Rustin, C. Rieubland, V. Kerlan, P.F. Plouin, A. Rotig, X. Jeunemaitre (2002) Functional consequences of a SDHB

- gene mutation in an apparently sporadic pheochromocytoma. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 4771-4774
159. Pollard, P.J., J.J. Briere, N.A. Alam, J. Barwell, E. Barclay, N.C. Wortham, T. Hunt, M. Mitchell, S. Olpin, S.J. Moat, I.P. Hargreaves, S.J. Heales, Y.L. Chung, J.R. Griffiths, A. Dagleish, J.A. McGrath, M.J. Gleeson, S.V. Hodgson, R. Poulson, P. Rustin, I.P. Tomlinson (2005) Accumulation of Krebs cycle intermediates and over-expression of HIF1alpha in tumours which result from germline FH and SDH mutations. *Hum Mol Genet*, 14: 2231-2239
 160. Pollard, P.J., M. El-Bahrawy, R. Poulson, G. Elia, P. Killick, G. Kelly, T. Hunt, R. Jeffery, P. Seedhar, J. Barwell, F. Latif, M.J. Gleeson, S.V. Hodgson, G.W. Stamp, I.P. Tomlinson, E.R. Maher (2006) Expression of HIF-1alpha, HIF-2alpha (EPAS1), and their target genes in paraganglioma and pheochromocytoma with VHL and SDH mutations. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 4593-4598
 161. Lepoutre-Lussey, C., C. Thibault, A. Buffet, A. Morin, C. Badoual, P. Benit, P. Rustin, C. Ottolenghi, M. Janin, L.J. Castro-Vega, J. Trapman, A.P. Gimenez-Roqueplo, J. Favier (2016) From Nf1 to Sdhb knockout: Successes and failures in the quest for animal models of pheochromocytoma. *Mol Cell Endocrinol*, 421: 40-48
 162. Cordes, T., M. Wallace, A. Michelucci, A.S. Divakaruni, S.C. Sapcaru, C. Sousa, H. Koseki, P. Cabrales, A.N. Murphy, K. Hiller, C.M. Metallo (2016) Immunoresponsive Gene 1 and Itaconate Inhibit Succinate Dehydrogenase to Modulate Intracellular Succinate Levels. *J Biol Chem*, 291: 14274-14284
 163. Saito, Y., K.A. Ishii, Y. Aita, T. Ikeda, Y. Kawakami, H. Shimano, H. Hara, K. Takekoshi (2016) Loss of SDHB Elevates Catecholamine Synthesis and Secretion Depending on ROS Production and HIF Stabilization. *Neurochem Res*, 41: 696-706
 164. Lampropoulou, V., A. Sergushichev, M. Bambouskova, S. Nair, E.E. Vincent, E. Loginicheva, L. Cervantes-Barragan, X. Ma, S.C.-C. Huang, T. Griss, C.J. Weinheimer, S. Khader, G.J. Randolph, E.J. Pearce, R.G. Jones, A. Diwan, M.S. Diamond, M.N. Artyomov (2016) Itaconate Links Inhibition of Succinate

- Dehydrogenase with Macrophage Metabolic Remodeling and Regulation of Inflammation. *Cell metabolism*, 24: 158-166
165. Saxena, N., N. Maio, D.R. Crooks, C.J. Ricketts, Y. Yang, M.H. Wei, T.W. Fan, A.N. Lane, C. Sourbier, A. Singh, J.K. Killian, P.S. Meltzer, C.D. Vocke, T.A. Rouault, W.M. Linehan (2016) SDHB-Deficient Cancers: The Role of Mutations That Impair Iron Sulfur Cluster Delivery. *J Natl Cancer Inst*, 108
 166. Rupprecht, A., R. Moldzio, B. Modl, E.E. Pohl (2019) Glutamine regulates mitochondrial uncoupling protein 2 to promote glutaminolysis in neuroblastoma cells. *Biochim Biophys Acta Bioenerg*, 1860: 391-401
 167. Liu, Y., Y. Pang, V. Caisova, J. Ding, D. Yu, Y. Zhou, T.T. Huynh, H. Ghayee, K. Pacak, C. Yang (2020) Targeting NRF2-Governed Glutathione Synthesis for SDHB-Mutated Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Cancers (Basel)*, 12
 168. Pang, Y., Y. Lu, V. Caisova, Y. Liu, P. Bullova, T.T. Huynh, Y. Zhou, D. Yu, Z. Frysak, I. Hartmann, D. Taieb, K. Pacak, C. Yang (2018) Targeting NAD(+)/PARP DNA Repair Pathway as a Novel Therapeutic Approach to SDHB-Mutated Cluster I Pheochromocytoma and Paraganglioma. *Clin Cancer Res*, 24: 3423-3432
 169. Sulkowski, P.L., R.K. Sundaram, S. Oeck, C.D. Corso, Y. Liu, S. Noorbakhsh, M. Niger, M. Boeke, D. Ueno, A.N. Kalathil, X. Bao, J. Li, B. Shuch, R.S. Bindra, P.M. Glazer (2018) Krebs-cycle-deficient hereditary cancer syndromes are defined by defects in homologous-recombination DNA repair. *Nat Genet*, 50: 1086-1092
 170. Stenman, A., J. Zedenius, C.C. Juhlin (2018) Over-diagnosis of potential malignant behavior in MEN 2A-associated pheochromocytomas using the PASS and GAPP algorithms. *Langenbecks Arch Surg*, 403: 785-790
 171. Warburg, O., F. Wind, E. Negelein (1927) THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol*, 8: 519-530
 172. Yelamanchi, S.D., S. Jayaram, J.K. Thomas, S. Gundimeda, A.A. Khan, A. Singhal, T.S. Keshava Prasad, A. Pandey, B.L. Somani, H. Gowda (2016) A pathway map of glutamate metabolism. *Cell Commun. Signal.*, 10: 69-75

173. Metallo, C.M., P.A. Gameiro, E.L. Bell, K.R. Mattaini, J. Yang, K. Hiller, C.M. Jewell, Z.R. Johnson, D.J. Irvine, L. Guarente, J.K. Kelleher, M.G. Vander Heiden, O. Iliopoulos, G. Stephanopoulos (2011) Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature*, 481: 380-384
174. Wise, D.R., P.S. Ward, J.E. Shay, J.R. Cross, J.J. Gruber, U.M. Sachdeva, J.M. Platt, R.G. DeMatteo, M.C. Simon, C.B. Thompson (2011) Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of alpha-ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 19611-19616
175. Mullen, A.R., W.W. Wheaton, E.S. Jin, P.H. Chen, L.B. Sullivan, T. Cheng, Y. Yang, W.M. Linehan, N.S. Chandel, R.J. DeBerardinis (2011) Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature*, 481: 385-388
176. Elgogary, A., Q. Xu, B. Poore, J. Alt, S.C. Zimmermann, L. Zhao, J. Fu, B. Chen, S. Xia, Y. Liu, M. Neisser, C. Nguyen, R. Lee, J.K. Park, J. Reyes, T. Hartung, C. Rojas, R. Rais, T. Tsukamoto, G.L. Semenza, J. Hanes, B.S. Slusher, A. Le (2016) Combination therapy with BPTES nanoparticles and metformin targets the metabolic heterogeneity of pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113: E5328-5336
177. Saskoi, E., Z. Hujber, I. Liko, K. Meszaros, B. Sarkadi, B. Matyasi, A. Kovacs, L. Patthy, G. Nyiro, G. Sváb, L. Tretter, A. Mehta, A. Sebestyén, A. Patócs, K. Takacs-Vellai (2019) The Arg244His missense mutation in SDHB-1 leads to altered metabolism in *Caenorhabditis elegans*: a new disease model. *Endocrine Abstracts*,
178. Powers, J.F., B. Cochran, J.D. Baleja, H.D. Sikes, A.D. Pattison, X. Zhang, I. Lomakin, A. Shepard-Barry, K. Pacak, S.J. Moon, T.F. Langford, K.T. Stein, R.W. Tothill, Y. Ouyang, A.S. Tischler (2020) A xenograft and cell line model of SDH-deficient pheochromocytoma derived from *Sdhb*^{+/-} rats. *Endocr Relat Cancer*, 27: 337-354

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1 Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke

1. Sarkadi B., Meszaros K., Krencz I., Canu L., Krokker L., Zakarias S., Barna G., Sebestyen A., Papay J., Hujber Z., Butz H., Darvasi O., Igaz P., Doczi J., Luconi M., Chinopoulos C., Patocs A. (2020). Glutaminases as a Novel Target for SDHB-Associated Pheochromocytomas/Paragangliomas. *Cancers*, 12(3): 599.

(IF: 6.128)

2. Sarkadi B., Baghy K., Sapi Z., Nyiro G., Liko I., & Patócs A. (2019). Germline *BRCA1* Mutation Detected in a Multiple Endocrine Neoplasia Type 2 Case With *RET* Codon 634 Mutation. *Frontiers in Genetics*, 10: 544.

(IF: 3.22)

3. Sarkadi B., Grolmusz V., Butz H., Kovesdi A., Liko I., Nyiro G., Igaz P., Patócs A. (2018) Molekuláris genetikai vizsgálatok az orokletes endokrinológiai tumor szindrómák klinikai diagnosztikájában, *Orv Hetil*, 159(7): 285-292.

(IF:0,497).

10.2 Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó saját közlemények jegyzéke

1. Molnár .A., Kövesdi A., Sarkadi B., Rácz K., Patócs A. (2016) A krónikus glukokortikoidhormon-pótlás aktuális kérdései. *Magy Belorv Arch*, 69: 38-45.

2. Patócs A., Igaz P., Tőke J., Lendvai N., Sarkadi B., Grolmusz V., Butz H., Tóth G., Németh K., Glaz E., Kiss R., Pusztai P., Sármán B., Reismann P., Szucs N., Tóth M., Rácz K. (2016)

Orokletes phaeochromocytomak és paragangliomák molekuláris genetikai vizsgálatával szerzett hazai tapasztalatok. *Magy Belorv Arch*, 69: 83-92.

3. Sarkadi B., Patócs A. Hereditary Diseases Predisposing to Pheochromocytoma (VHL, NF-1, Paraganglioma Syndromes, and Novel Genes). In: Igaz Peter, Patócs Attila (szerk.) Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes. Springer International Publishing, Cham, Svájc: 2019: 129-147.

11. Köszönetnyilvánítás

A sikeres PhD munkám létrejöttéért legnagyobb köszönettel témavezetőmnek, prof. Dr. Patócs Attilának tartozom, akinek útmutatása, bizalma, türelme és rengeteg segítsége alapozta meg a sikeres közös munkánkat. Hatalmas köszönettel tartozom továbbá prof. Dr. Rácz Károlynak, a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika korábbi igazgatójának, akinek a segítsége nélkül nem lehettem volna ennek a nagyszerű csapatnak a tagja.

Nagy köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Endokrin Genetika Laboratórium néhai és jelenlegi dolgozóinak: Dr. Mészáros Katalinnak, Dr. Butz Henriettnek, Németh Kingának, Dr. Decmann Ábelnek, Krokker Lillának, Szabó Borbálának, Dr. Nyíró Gábornak, Dr. Nagy Zsoltnak, Dr. Grolmusz Vincének, Dr. Perge Pálnak, Dolehall Mártonnak, Dr. Sumánszky Csabának, Dr. Kövesdi Annamáriának, Benkő Mariannak. Köszönettel tartozom továbbá a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinika Izotóp Laboratóriumában dolgozó valamennyi munkatársnak.

Köszönöm továbbá prof. Dr. Tóth Miklósnak és prof. Dr. Igaz Péternek, a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinika egykori igazgatóinak, hogy kutatásom ideje alatt az általuk vezetett épületben végezhettem a munkámat.

A tumorbiológiai vizsgálatok során nyújtott rengeteg segítségért és útmutatásért köszönetemet fejezem ki Dr. Chinopoulos Christosnak és Dr. Dóczi Juditnak.

Az immunhisztokémiai és metabolit mérésekben nyújtott segítségért köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Sebestyén Annának és az általa vezetett laboratórium valamennyi munkatársának, külön kiemelve Dr. Krencz Ildikót, Dr. Hujber Zoltánt és Dr. Pethő Gábort.

Köszönöm továbbá Dr. Likó Istvánnak és Darvasi Ottónak a rengeteg segítséget különösképpen az új generációs szekvenálás interpretálása terén.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem I.sz. Patológiai Intézet dolgozóinak, külön kiemelve prof. Dr. Kovalszky Ilona vezette laboratórium dolgozóit, Dr. Pápay Juditot és Dr. Barna Gábort.

Köszönöm továbbá a Semmelweis Egyetem II.sz. Belgyógyászati Klinika valamennyi munkatársának is, külön kiemelve Dr. Tőke Juditot és Dr. Bencze Ágneszt.

Köszönet illeti a lelkes és sikeres TDK hallgatóimat, Dr. Zakariás Sárát és Klément Györgyöt.

Köszönöm továbbá a kutatásomat anyagilag támogató szervezeteknek: a Nemzeti Bionika Programnak, a Magyar Tudományos Akadémia Lendület Programjának és a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal Országos Tudományos Kutatási Alapprogramjának.

Végül, de nem utolsó sorban, hálámat szeretném kifejezni Családom irányába, különösképpen Feleségemnek, Dr. Blazsetics Rékának, akinek a végtelen türelme és megértése nélkül nem írhatnám jelenleg ezeket a sorokat.

Táblázatjegyzék

1. Táblázat. Az SDHx gének mutációi és a betegség fenotípusának összefüggései.	23
2. Táblázat: A phaeochromocytóma/paraganglióma kialakulásához társult gének listája.	30
3. Táblázat: Az Endogén Panel fejlesztése.....	51
4. Táblázat: Az Endogén Panel első (1.0) illetve második (2.0) verziója során leírt variánsok és a hozzájuk tartozó fenotípusok.	53
5. Táblázat Intracelluláris normalizált metabolit koncentrációk	73
6. táblázat: Intracelluláris normalizált metabolit koncentrációk.	75
7. táblázat. Intracelluláris normalizált metabolit koncentrációk.....	76
8. táblázat. Intracelluláris normalizált metabolit koncentrációk.....	78
9. táblázat: Phaeo/PGL minták immunhisztokémiai vizsgálata.	87

Ábrajegyzék

1. Ábra. Klaszter 1 mutációk patomechanizmusa.	14
2. Ábra. Klaszter 2 mutációk patomechanizmusa.	16
3. Ábra. A szukcinát dehidrogenáz felépítése.	18
4. Ábra. Az itakonát metabolizmusa.	26
5. ábra: A <i>RET</i> és <i>BRCAl</i> mutációt hordozó beteg szekvenálási eredményei, ill. családfája.	46
6. ábra: Az Endogén Panel 1.0 lefedettségi adatai génenként válogatva.	49
7. ábra: Az Endogén Panel 2.0 lefedettségi adatai génenkénti bontásban.....	51
8. ábra. Az Sdhb gátlás hatásai PC12 chromaffin sejtekben.	64
9. ábra: Szukcinát-fumarát arány itakonát kezelés hatására PC12, HeLa és H295R sejtekben.	66
10. ábra: Normalizált szukcinát koncentrációk atpenin kezelés hatására PC12, HeLa és H295R sejtekben.	67
11. ábra: Az SDH gátlás hatása a PC12 sejtek életképességére és proliferációjukra. ..	69
12. ábra. Az SDH gátlás hatása a HeLa és H295R sejtek életképességére.....	71
13. ábra: PC12 sejtekben mért metabolitkoncentrációk hőterképes ábrázolása.....	80

14. ábra HeLa sejtekben mért metabolitkoncentrációk hőtésképes ábrázolása.	81
15. ábra H295R sejtekben mért metabolitkoncentrációk hőtésképes ábrázolása.	82
16. ábra: PC12 sejtek GLS-1 expresszió változása SDH gátlás után.	83
17. ábra: HeLa sejtek GLS-1 expresszió változása SDH gátlás után.	84
18. ábra: H295R sejtek GLS-1 expresszió változása SDH gátlás után.	85
19. ábra: SDHB mutációhoz társuló malignus paraganglioma (A,B,C) és benignus RET p.C634W mutációhoz társuló phaeochromocytóma (D,E,F) immunhisztokémiai elemzése.....	89
20. ábra: RET p.C634R mutációt hordozó beteg 3 különböző daganatának immunhisztokémiai elemzése.....	90
21. ábra: A PC12 sejtek proliferációja BPTES kezelés hatására.....	92
22. ábra: PC12 sejtek oxigénfogyasztási vizsgálatai.	95