Sejtciklusfüggő gén- és mikroRNS expresszió vizsgálata és gyakorlati jelentősége mellékvesekéreg-karcinómában

Ph.D. doktori értekezés

dr. Grolmusz Vince Kornél

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos
Dr. Sőti Csaba, Ph.D., D.Sc., egyetemi docens

Szigorlati bizottság
elnök: Dr. Schaff Zsuzsa, Ph.D., D.Sc., a MTA rendes tagja, professor emerita
tagok: Dr. Hubina Erika, Ph.D., főorvos
Dr. Orbán Tamás, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Budapest
2016

”Cooperatores Veritatis”

XVI. Benedek kiérdemesült pápa jelmondata

Tartalomjegyzék

TARTALOMJEGYZÉK **3**

ÁBRÁK JEGYZÉKE **7**

TÁBLÁZATOK JEGYZÉKE **9**

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE **10**

I. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR) **12**

I.1. A sejtciklus és szabályozása **12**
I.1.1. A sejtciklus folyamatainak áttekintése 12
I.1.2. A sejtciklus szabályozása 14
I.1.3. A sejtciklus regulátorainak megváltozott kifejeződése és prognosztikai jelentősége humán daganatokban 17
I.1.4. A sejtciklusfüggő transzkripció vizsgálata 19
I.1.4.1. A sejtciklusfüggő expresszió vizsgálatának módszerei 19
I.1.4.1.1. Szinkronizálás 20
I.1.4.1.2. Mitotikus lerázás 21
I.1.4.1.3. Centrifugális ülepítés 21
I.1.4.1.4. Sejtválogatás áramlási citométerrel 22
I.1.4.2. A sejtciklusfüggő transzkripciós program és szabályozása 22
I.1.4.2.1. Transzkripciós szabályozás a G1 és S fázisokban 23
I.1.4.2.2. Transzkripciós szabályozás a G2 és M fázisokban 25
I.1.4.2.3. Redundancia a transzkripciós szabályozásban 25
I.1.4.3. Sejtciklusfüggő transzkripció vizsgálata humán sejteken 26
I.1.5. A mikroRNS-ek szerepe a sejtciklus szabályozásában 28

I.2. A mellékvesekéreg-karcinóma (ACC) **31**
I.2.1. Etiológia és patogenezis 31
I.2.1.1. Familiáris szindrómákhoz társuló ACC-k 31
I.2.1.2. A Wnt/β-katenin útvonal fokozott aktivitása 32
I.2.1.3. Fokozott IGF-2-jelátvitel 33
I.2.1.4. Nagy áteresztőképességű technológiákkal szerzett információ 33
I.2.2. A mellékvesekéreg-karcinóma diagnosztikája 34
I.2.3. A mellékvesekéreg-karcinóma terápiája 35

II. CÉLKITŰZÉSEK **37**

III. MÓDSZEREK **39**

III.1. Sejttenyészeteken végzett kísérletek **39**
III.1.1. Sejttenyésztés 39
III.1.2. Áramlási citometriás módszerek 40
III.1.2.1. Sejtciklus vizsgálatok fluoreszcencia aktiválta sejtválogatással (FACS) 40
III.1.2.2. Apoptózis és sejtciklus-disztribúciós vizsgálatok 41
III.1.3. Kezelések daganatellenes szerekkel 41
III.1.4. Proliferációs assay 42
III.1.5. Kortizol meghatározás az NCI-H295R sejtek tápfolyadékából 42

III.2. RNS izolálás, gén- és miRNS expressziós vizsgálatok **43**
III.2.1. RNS izolálás 43
III.2.2. Génexpressziós microarray és útvonal elemzés 43
III.2.3. Nagy áteresztőképességű miRNS expressziós mérések 44
III.2.3.1. Microarray 44
III.2.3.2. Kvantitatív PCR alapú TaqMan Low Density Array (TLDA) 45
III.2.3.3. Újgenerációs szekvenálással meghatározott miRNS expresszió 45
III.2.4. Validálás egyedi kvantitatív PCR mérésekkel 46
III.2.5. A sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikájának összehasonlítása primer, nem-transzformált és tumoros sejttenyészetekben 47

III.3. Fehérje izolálás és Western blot vizsgálatok **48**

III.4. Korábbi microarray tanulmányok in silico elemzése **49**
III.4.1. A sejtciklus szerinti sejtválogatás eredményeinek összehasonlítása a korábbi, szinkronizáció-alapú mérésekkel 49
III.4.2. Az NCI-H295R sejtciklusfüggő génexpressziós programjának összehasonlítása az ACC malignitás mintázatával 50

III.5. ACC mintákon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok **50**

III.6. Statisztikai elemzés **52**

IV. EREDMÉNYEK **53**

IV.1. A sejtciklusfüggő génexpresszió vizsgálata **53**
IV.1.1. Az optimalizált sejtciklus szerinti sejtválogatás sikeresen szétválasztotta a sejtciklus különböző fázisaiban lévő populációkat 53
IV.1.2. Sejtciklusfüggő expressziójú gének azonosítása a különböző sejtciklus fázisú sejtpopulációk összehasonlító génexpressziós microarray vizsgálatával 55
IV.1.3. A sejtciklus szerinti sejtválogatás módszerrel kapott sejtciklusfüggő transzkripciós program összehasonlítása a korábbi szinkronizáláson alapuló mérések eredményeivel 59

IV.1.4. A sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikájának összehasonlítása primer, nem-transzformált és tumoros sejttenyészetek között 63

IV.2. A sejtciklusfüggő miRNS expresszió vizsgálata 64

IV.3. Új, sejtciklusfüggő expressziót mutató proliferációs marker kimutatása mellékvesekéreg-karcinómában 67

IV.3.1. A mellékvesekéreg-karcinóma malignitás mintázatának összehasonlítása az NCI-H295R sejtciklusfüggő transzkripciós programjával 67

IV.3.2. Az RRM2 sejtciklusfüggő expressziójának igazolása 68

IV.3.3. Az RRM2 expressziójának vizsgálata humán ACC szöveteken 69

IV.4. Daganatellenes szerek hatásának vizsgálata humán ACC sejtvonalon 71

IV.4.1. Az alkalmazott daganatellenes szerek hatása az NCI-H295R sejtek proliferációjára, apoptózisára, kortizoltermelésére valamint a sejtciklus fázisainak eloszlására 71

IV.4.2. A daganatellenes szerekkel történt kezelések RRM2 expresszióra gyakorolt hatásai 72

V. MEGBESZÉLÉS 74

V.1. A sejtciklusfüggő génexpressziós program 74

V.2. A miRNS expresszió vizsgálata a sejtciklus függvényében 79

V.3. Új, sejtciklusfüggő proliferációs marker vizsgálata mellékvesekéreg-karcinómában 81

V.4. Daganatellenes gyógyszerek hatása NCI-H295R humán ACC sejtvonalra 83

VI. KÖVETKEZTETÉSEK 86

VII. ÖSSZEFOGLALÁS 88

VIII. SUMMARY 89

IX. IRODALOMJEGYZÉK 90

X. A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁHOZ KÖTŐDŐ SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 117

XI. A DISSZERTÁCIÓ TÉMÁJÁTÓL FÜGGETLEN SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 118

XII. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS **120**

XIII. MELLÉKLETEK **122**

Ábrák jegyzéke

1. ábra – A sejtciklus sematikus ábrázolása

2. ábra – A sejtciklus szabályozása

3. ábra – Az oszcilláló transzkripciós faktor hálózat és a ciklin-CDK komplexek együttműködésének hipotézise Simmons Kovacs és munkatársai eredményei alapján

4. ábra - A sejtciklus szerinti sejtválogatás és validálása

5. ábra – Az izolált RNS minőségi jellemzése sejttípusonként és a sejtciklus fázisaiként

6. ábra - A sejtciklusfüggő transzkriptumok azonosítása microarray módszerrel és megerősítése qRT-PCR módszerrel

7. ábra – A sejtciklusfüggő expressziót mutató gének által befolyásolt jelátviteli útvonalak vizsgálata

8. ábra – A szinkronizálás és a sejtciklus szerinti sejtválogatás eredményeinek összehasonlítása a sejtciklusfüggő transzkripciós program tekintetében és a sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikájának összehasonlítása primer, nem-transzformált és tumoros sejtekben

9. ábra – Sejtciklusfüggő miRNS expresszió vizsgálata nagy áteresztőképességű technikákkal és a hsa-miR-16 család néhány tagja expressziójának vizsgálata qRT-PCR módszerrel

10. ábra – A nagy áteresztőképességű miRNS vizsgálatok megerősítési eredményei qRT-PCR módszerrel HDFa (A), NCI-H295R (B) és HeLa (C, D) sejteken

11. ábra – Az ACC malignitás mintázatának és az NCI-H295R sejtciklusfüggő transzkripciós programjának Venn diagramja

12. ábra – Az RRM2 sejtciklusfüggő expressziójának igazolása sejtciklus szerint szétválogatott NCI-H295R sejteken

13. ábra – A Ki-67 és RRM2 expresszió vizsgálata humán ACC mintákon

14. ábra – Az alkalmazott kezelések hatása az NCI-H295R sejtek proliferációjára, apoptózisára, kortizoltermelésére és sejtciklusára

15. ábra – Az alkalmazott kezelések hatása az NCI-H295R sejtek RRM2 expressziójára

16. ábra – A sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikájáról alkotott hipotézis sematikus ábrázolása

Táblázatok jegyzéke

1. táblázat – A sejtciklus regulátorainak megváltozott expressziója humán daganatokban

2. táblázat – A miRNS-ek szerepe a sejtciklus regulátorainak szabályozásában daganatképződés során

3. táblázat – A sejtciklus szerint szétválogatott populációk jellemzése a különböző sejttípusokban

4. táblázat – A HeLa sejt sejtciklusfüggő transzkripciós programja által befolyásolt biológiai útvonalak vizsgálata

5. táblázat – Az ACC malignitás mintázatának és az NCI-H295R sejtciklusfüggő transzkripciós programjának metszetéhez tartozó gének

6. táblázat – A vizsgálatokba bevont ACC minták jellemzése

7. táblázat – A szinkronizálás és a sejtciklus szerinti sejtválogatás módszereinek összehasonlítása

Rövidítések jegyzéke

ACA	adrenokortikális adenóma
ACC	adrenokortikális karcinóma
APC/C	anafázist elősegítő komplex/cikloszóma
ASPM	abnormális orsó-homológ, microcephalia-asszociált
ATCC	Amerikai Sejtgyűjtemény (American Type Culture Collection)
ATM	ataxia telangiectasia mutált
ATR	ataxia telangiectasia- és Rad3-asszociált
CDK	ciklinfüggő kináz
CDKi	ciklinfüggő kináz inhibitor
Chk1	ellenőrzőpont kináz 1 (checkpoint kinase 1)
Chk2	ellenőrzőpont kináz 2 (checkpoint kinase 2)
CT	komputertomográfia
DMEM	Dulbecco-féle módosított Eagle-féle médium
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
DSB	kettősszálú DNS törések
EDP	etopozid, doxorubicin, ciszplatin
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
ENSAT	A Mellékvesekéreg-daganatok Kutatásának Európai Hálózata (European Network for the Study of Adrenocortical Tumors)
FACS	fluoreszcencia aktiválta sejtválogatás
FAP	familiáris adenomatózus polipózis
FC	fold change
G0 fázis	nyugalmi fázis
G1 fázis	1-es növekedési fázis
G2 fázis	2-es növekedési fázis
HDFa	humán, felnőttből származó bőrfibroblaszt
HU	Hounsfield egység
IGF	inzulinszerű növekedési faktor
IPA	Leleményes Útvonal Elemzés (Ingenuity Pathway Analysis)
LC-MS	folyadékkromatográfiát követő tömegspektrometria
M fázis	mitózis fázis
miRISC	miRNS-indukálta csendesítő komplex
miRNS	mikro-ribonukleinsav

MPF	mitózist elősegítő faktor
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
NCI	Nemzeti Rákkutató Intézet (National Cancer Institute)
onko-miR	onkogén miRNS
PCM	pericentrioláris anyag
PCR	polimeráz láncreakció
PP2A	protein foszfatáz 2A
PVDF	polivinildién-fluorid
qRT-PCR	kvantitatív, valós idejű polimeráz láncreakció
Rb	retinoblasztóma
RIN	RNS integritási szám (RNA integrity number)
RNAa	RNS aktiváció (RNA activation)
RNS	ribonukleinsav
RR	ribonukleotid reduktáz
RRM2	ribonukleotid reduktáz M2 alegysége
S fázis	szintézis fázis
siRNS	kis interferáló ribonukleinsav
TGF-β	transzformáló növekedési faktor-β
TLDA	TaqMan Alacsony Denzitású Kártya (TaqMan Low Density Array)
TOP2A	DNS-topoizomeráz 2α
TS-miR	tumor szuppresszor miRNS
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor
Wnt	Wingless-asszociált integrációs hely (Wingless-related integration site)

I. Bevezetés (Irodalmi háttér)

"vagy vedd példának a piciny füszálat:
miért nő a fü, hogyha majd leszárad?
miért szárad le, hogyha újra nő?"[1]

I.1. A sejtciklus és szabályozása

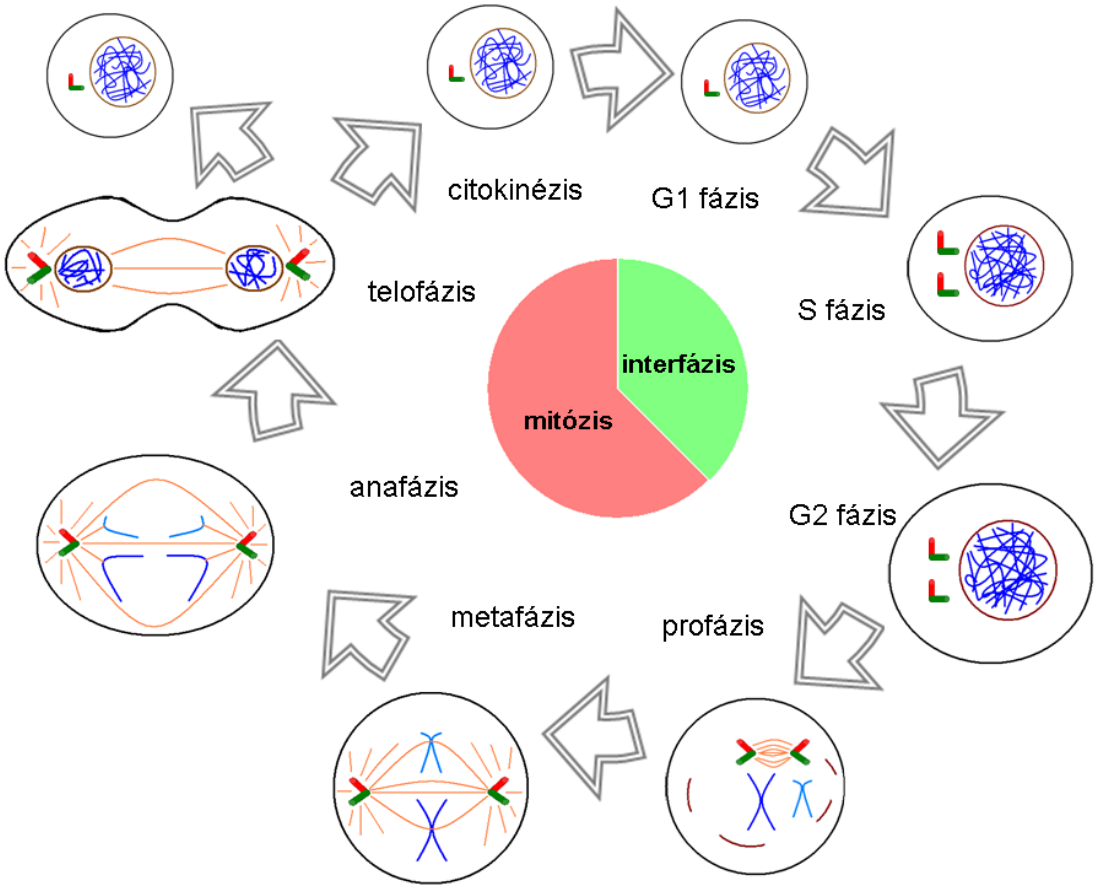
I.1.1. A sejtciklus folyamatainak áttekintése

Az eukarióta sejtek ismétlődő növekedési és osztódási folyamatát, amely során örökítőanyaguk megkettőződését követően – optimális esetben – két leánysejtre osztódnak, sejtciklusnak nevezzük. A sejtciklus egy szigorúan szabályozott folyamat, amelynek során az egymást követő fázisok felkészítik a sejtet a sikeres megkettőződésre, ami a növekedés, fejlődés és differenciálódás előfeltétele (**1. ábra**).

Az osztódást követően létrejött leánysejt először egy nyugalmi, G1 (growth – növekedés 1) fázisba kerül, majd a környezetéből származó tápanyagok és mitogén szignálok hatására a restrikciós pontot átlépve elköteleződik az osztódás irányában és belép az S (szintézis) fázisba [1]. Mitogén szignálok és megfelelő tápanyagok hiányában a sejt egy osztódási potenciáljától időlegesen megfosztott G0 fázisba kerül, ahonnan a környezeti tényezők változásának következtében visszaléphet G1 fázisba. Az S fázis során történik az örökítőanyag (dezoxiribonukleinsav – DNS) megkettőződése. A sejtosztódás során a mitotikus orsó megszervezésében kulcsfontosságú centroszóma megkettőződése is ebben a fázisban következik be. A centroszóma nyugalmi sejtben a sejtmag közelében lévő organellum, amely két merőlegesen kapcsolódó centriólumból és az azt körülvevő, számos fehérje alkotta pericentrioláris anyagból (pericentriolar material – PCM) áll. A centroszómák megkettőződése és optimális működése a sejtciklussal összehangolt centroszóma ciklusnak nevezett folyamat révén szabályozódik [2].

[1] idézet Babits Mihály (1883-1941) Esti kérdés (1909) című művéből

Az örökítőanyag sikeres megkettőződését követően a sejt G2 fázisba kerül, melynek során felkészül a kettéosztódásra. A G1, S és G2 fázisokat, amelyek során az örökítőanyag – részlegesen – transzkripcióra alkalmas, hozzáférhető állapotban van (eukromatin) összefoglalóan interfázisnak nevezzük.



1. ábra – A sejtciklus sematikus ábrázolása *– A fekete ellipszisek és körök a sejtmembránt, a barna körök és vonalak a sejtmagmembránt, a piros-zöld merőleges hengerek a centroszómát, a narancssárga vonalak a mikrotubulusokat, a kék vonalak az örökítőanyag különböző állapotait (eukromatin, heterokromatin, kromoszóma) jelzik. Eredeti ábra.*

Az interfázist követően a sejt a mitózis folyamatába lép, amelynek során a profázisban a sejtmaghártya integritása megszűnik, az örökítőanyag kromoszómákba szerveződik. A centroszómák távolodni kezdenek egymástól a sejt két ellentétes pólusa felé, közöttük kialakul a mitotikus orsó. A centroszómákhoz kapcsolódó mikrotubulusok

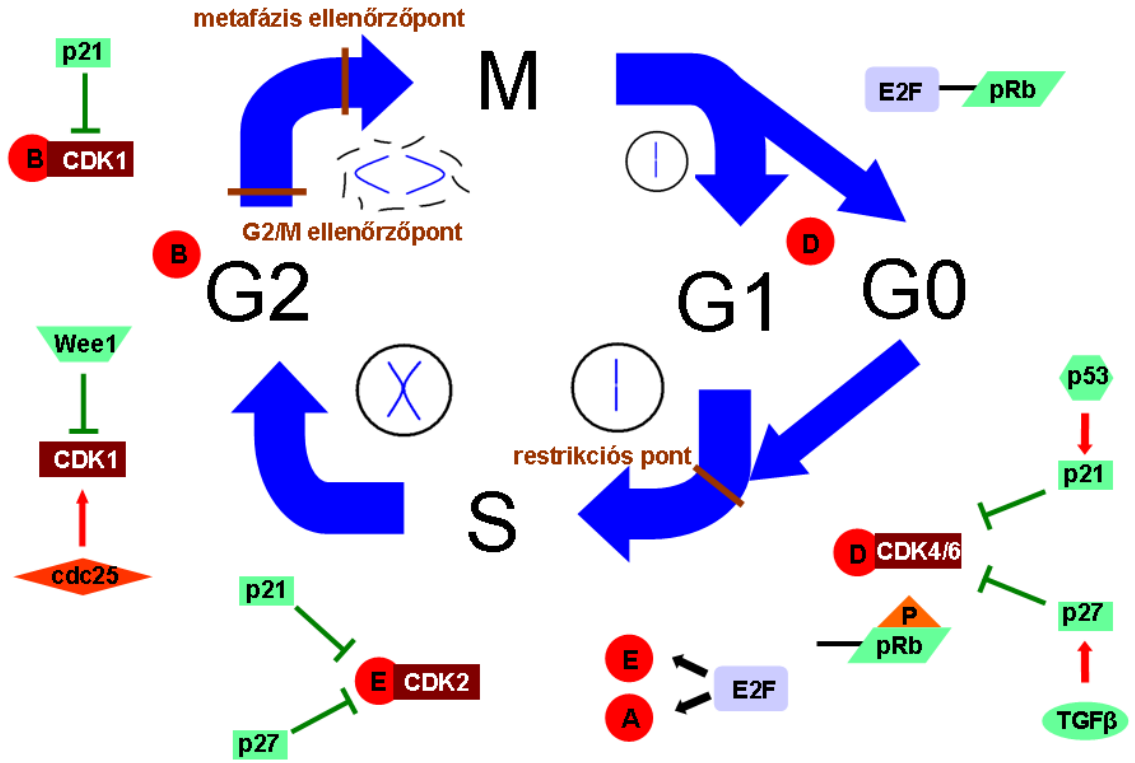
egy része a két centroszóma távolodását szolgálja (poláris vagy nem-kinetokór mikrotubulusok) [3]. Másik részük a kromoszómák centromér régiójához csatlakozó kinetokór komplexhez kötődik (kinetokór mikrotubulusok) [4], míg egy harmadik csoportjuk a centroszómából csillagszerűen kisugározva a centroszómák helybentartásában játszik szerepet (asztrális mikrotubulusok) [5]. A metafázis során kifejlődik a mitotikus orsó, a kromoszómák a poláris és kinetokór mikrotubulusok segítségével az osztódás egyenlítői síkjában sorakoznak fel. Az anafázis során a mitotikus orsó működése következtében a kromoszómák a megfelelő oldali centroszóma felé közelednek. A telofázisban kezd kialakulni az új sejtmagmembrán, a szigorúan szervezett kromoszómák elkezdenek hetero- és eukromatinná alakulni. Ezt követően, a citokinézis lépésében a két citoplazma is különválik és a két leánysejt önálló működésbe kezd.

I.1.2. A sejtciklus szabályozása

A sejtciklus folyamatainak pontos, összehangolt működése szigorú szabályozás következménye, amelyben mind transzkripciós, transzlációs (sejtciklusfüggő expressziót mutató fehérjék) és poszt-transzlációs (aktiváló és deaktiváló foszforilációs és defoszforilációs folyamatok), valamint lebomlási folyamatok is közreműködnek. A szabályozás alapjainak leírásáért 2001-ben Leland H. Hartwell amerikai, Tim Hunt és Paul Nurse brit kutatókat orvosi-élettani Nobel-díjjal jutalmazták [6-9]. A sejtciklus szabályozás kiemelten fontos faktorai a csupán bizonyos fázisokban expresszálódó (sejtciklusfüggő kifejezést mutató) ciklinek [6], amelyek ciklinfüggő kinázok (CDK) [7, 8] működését reguláljá**k** (**2. ábra**). Bár a sejtciklus szabályozásával kapcsolatos vizsgálatok nagy része élesztőgombákban történt és történik, dolgozatomban elsősorban a különböző faktorok humán homológjaival foglalkozom.

Exogén és endogén mitogén szignálok hatására intracellulárisan fokozódik a D-típusú ciklinek expressziója, amelyek a CDK4 és CDK6 ciklinfüggő kinázokkal komplexet képezve, foszforiláció útján szabályozzák a retinoblasztóma (pRb) és retinoblasztómához

hasonló (p107, p130) fehérjéket [10, 11]. A hiperfoszforilálás hatására a pRb megszünteti gátló kapcsolatát az E2F transzkripciós faktor-család tagjaival (E2F1-E2F8), amelyek aktívvá válva iniciálják az S fázishoz szükséges faktorok (például a ciklin A és a ciklin E) transzkripcióját [12]. A ciklin E-CDK2 komplex az S fázisba lépést, míg a ciklin A-CDK2 kompex az S fázis további szakaszait regulálja [13, 14]. A sejtciklus során a ciklin B expressziója fokozatosan növekszik, szintje a mitózis fázisában éri el a maximumot [15]. Ekkor az – expressziójában szintén ekkor tetőző – CDK1 enzimmel [8] komplexet alkotva (MPF – mitosis promoting factor) a mitózis szabályozásában tölt be kulcsszerepet. A ciklin B lebomlása ugyanakkor a mitózisból való kilépés előfeltétele is [16]. Megjegyzendő, hogy újabb vizsgálatok redundánsnak vélik bizonyos CDK-k működését [17, 18]. Kimutatták, hogy mind a ciklin D-CDK4/6, mind a ciklin E-CDK2 komplexek nélkül végbemehet a sejtciklus [17, 18].



2. ábra – A sejtciklus szabályozása *– A fekete vonalak a sejtmaghártyát, a kék vonalak az örökítőanyagot, a piros körök a ciklineket, a barna téglalapok a CDK enzimeket, a zöld téglalapok a CDKi fehérjéket jelképezik. A piros nyilak aktivációt míg a zöld T-alakú vonalak gátlást szimbolizálnak. A barna vonalak a sejtciklus ellenőrzési pontjait jelölik. Eredeti ábra.*

A ciklinek által szabályozott CDK enzimek működését egyéb faktorok is befolyásolják. A CDK inhibitorok (CDKi) közé tartoznak a cip/kip és az INK4a/ARF család tagjai. A cip/kip család tagjai közül a p21 és p27 fehérjék számos CDK működését gátolják (2. ábra) [19]. Az INK4A/ARF lókuszról átíródó p16INK4A és a p14/p19ARF proteinek sejtciklus-inhibitorként képesek megállítani a sejtciklus progresszióját G1, illetve G1 és G2 fázisokban [20]. A CDKi-k mellett számos más fehérje is befolyásolja a sejtciklus működését. A CDK1 aktivitása foszforiláltsági állapotától függ [21]. A Wee1 kináz mediálta foszforilálás a fehérje Thr14 és Tyr15 aminosavain a CDK1 inaktiválásához vezet [22, 23]. A CDC25 által közvetített defoszforilálás ugyanakkor aktív CDK1-t eredményez, amely előfeltétele a mitózisba lépésnek [21, 24]. Emellett a közismert tumor szuppresszor p53 indukálja a p21 expresszióját, lassítva a sejtciklus progresszióját [25]. A sejtciklus lassításának irányába hat a TGF-β (transzformáló növekedési faktor-β) p27-re gyakorolt aktiváló hatása is [26].

A sejtciklus optimális működését három ellenőrzőpont is biztosítja [9]. A restrikciós pontot (sarjadzó élesztőben START pont) elhagyva, az eddig a pontig beérkező exogén és endogén szignálok eredőjeként köteleződik el a sejt az osztódás irányába a “minden-vagy-semmi” elve alapján [1]. A DNS sikeres és hibátlan megkettőződése előfeltétele a G2/M ellenőrzőpont sikeres átlépésének. Perzisztáló egyszálú DNS molekula aktiválja az ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related) jelátviteli utat, ami a Chk1 (checkpoint kinase 1) serkentésén keresztül a CDC25 foszforilálását eredményezi, ami így inaktívvá válik és képtelen a CDK1 aktiváló defoszforilását elvégezni [27]. A DNS molekulán található kettős szálú törések (DSB – double strand break) az ATM (ataxia telangiectasia mutated) jelátvitelt aktiválják, amely a CHK2 (checkpoint kinase 2) aktiválásán és ezáltal a CDC25 foszforilálásán keresztül gátolja a sejtciklus progresszióját [28]. A harmadik, ún. metafázis ellenőrzőpont a mitózis metafázisának során a kromoszómák optimális egyenlítői síkba rendezését vizsgálja. A kinetokór mikrotubulusok – optimális esetben – bipoláris erőhatást gyakorolnak a testvérkromoszómák kinetokór régióikra. Ezt a kiegyenlített feszültséget észleli a metafázis ellenőrzőpont. Amennyiben egy kromoszóma irányában csak egy

centroszóma felől létesül húzó hatás, a sejt nem lép túl a metafázis ellenőrzőponton. Kiegyenlített húzóerők esetén ugyanakkor, az APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) felszabadításán keresztül, az anafázisba lépéssel folytatódhat a mitózis [29].

I.1.3. A sejtciklus regulátorainak megváltozott kifejeződése és prognosztikai jelentősége humán daganatokban

Az érzékenyen szabályozott sejtciklus számos regulátora mutat aberráns expressziót a daganatképződés során. Általánosságban elmondható, hogy a sejtciklust hajtó ciklinek és CDK-k fokozott, míg a CDKi-k és egyéb tumor szuppresszor gének csökkent kifejeződése figyelhető meg a daganatokban az ép szövetekhez képest. Az **1. táblázat**ban – a teljesség igénye nélkül – foglalom össze bizonyos sejtciklust szabályozó molekulák (ciklinek, CDK-k, CDKi-k) daganatokban észlelt megváltozott kifejeződését.

A sejtciklus regulátorainak megváltozott kifejeződése gyakran jól korrelál a daganat proliferációjával és sokszor adhat támpontot a daganatok prognózisára, így hasznosak egy-egy elváltozás dignitásának és prognózisának diagnózisában. Korai stádiumú, nem-kissejtes tüdőrákban az E ciklin expressziója megfelelően vetítette előre a metasztázis kialakulását és a túlélést [30]. Az A ciklin fokozott expressziója a rossz prognózis indikátorának bizonyult vastagbéltumorokban [31] és endometrium karcinómában [32]. Hasonlóan, a fokozott B ciklin expresszió rossz prognózist jelzett nyelőcsőrákban [33] és nem-kissejtes tüdőrákban [34]. A CDK-k is alkalmasak bizonyos daganatokban a prognózis becslésére. A CDK1 fokozott kifejeződése rossz prognosztikai tényező vastagbéltumor [35], nem-kissejtes tüdőrák [36] és petefészek daganat [37] esetében. A CDK1 és CDK2 expressziója alkalmas a korai recidíva előrejelzésére emlőrákban [38].

1. táblázat – A sejtciklus regulátorainak megváltozott expressziója humán daganatokban – A narancs háttér a daganatokban ép *szövetekhez képest észlelt emelkedett, a zöld háttér a daganatokban észlelt csökkent expressziót jelzi. Kék háttérrel jelöltem azokat az eseteket, ahol a szabályozó molekula kifejeződésének tekintetében ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre.*

regulátor csoport	regulátor	daganat
ciklinek	D ciklin	emlőrák [39]
		vastagbéltumor [40]
		mellékpajzsmirigy adenóma [41]
	E ciklin	leukémia [42]
		gyomorrák [43]
		mellékvesekéreg-karcinóma [44]
		tüdőrák [30]
		hepatocelluláris karcinóma [45]
		vastagbéltumor [46]
	A ciklin	pajzsmirigy karcinóma [47]
		vastagbéltumor [31]
		emlőrák [48]
		hepatocelluláris karcinóma [45]
		tüdőrák [34]
		endometrium karcinóma [32]
	B ciklin	pajzsmirigy karcinóma [47]
		tüdőrák [34]
		vastagbéltumor [49]
		endometrium karcinóma [50]
		nyelőcsőrák [33]
		emlőrák [51]
CDK	CDK4	szájüregi rák [52]
		hasnyálmirigy endokrin tumor [53]
		tüdőrák [54]
		nazofaringeális daganat [55]
		endometrium karcinóma [32]
	CDK2	endometrium karcinóma [32]
		hasnyálmirigy karcinóma [56]
		vastagbéltumor [46]
		tüdőrák [57]
	CDK1	vastagbéltumor [35, 58]
		emlőrák [51]
		petefészek daganat [37]
CDKi	p21	húgyhólyagrák [59, 60]
		petefészek daganat [61]
		méhnyakrák [62, 63]
		vastagbéltumor [64]
	p27	hepatocelluláris karcinóma [65]
		prosztatarák [66]
		emlőrák [67]
		méhnyakrák [62]

A CDKi-k közé tartozó p21 prognózissal való összefüggése ellentmondásos [68, 69]: egyes vizsgálatok jó prognosztikai faktorként írták le húgyhólyagrákban [59] és méhnyakrákban [63], ugyanakkor más vizsgálatok a rossz prognózissal hozták összefüggésbe ugyanezen daganatok esetében [60, 62]. Összességében a p21 prognosztikus markerként való alkalmazása ezen daganatok esetén kerülendő [68, 69]. A p27 expresszió ugyanakkor jó prognosztikai tényezőnek bizonyult; megtartott p27 expresszió jó prognózist jelent hepatocelluláris karcinómában [70], ugyanakkor a hiányzó p27 expresszió rossz prognózist vetít előre vastagbéltumorban [71], emlőrákban [67] és tüdőrákban [72].

I.1.4. A sejtciklusfüggő transzkripció vizsgálata

A sejtciklus transzkripciós programjába azok a transzkriptumok (mRNS, miRNS, stb.) tartoznak, amelyek expressziója biológiailag relevánsan változik a sejtciklus különböző fázisaiban. Ebbe a csoportba tartoznak az előző fejezetben tárgyalt ciklinek is [73-75].

I.1.4.1. A sejtciklusfüggő expresszió vizsgálatának módszerei

Kezeletlen sejttenyészetekben a különböző sejtek aszinkronizáltan, a sejtciklus különböző fázisaiban vannak, így natív sejttenyészetek expressziós vizsgálatával nem tudunk betekintést nyerni a sejtciklusfüggő transzkripciós programba [76]. Ehhez a sejteknek olyan csoportjai szükségesek, amelyek azonos sejtciklus fázisban vannak. A sejtciklusfüggő transzkripciós program a különböző fázisú sejtcsoportok expressziós mintázatainak összehasonlításával írható le. Ilyen ún. fázis-homológ sejtcsoportok nyerhetőek (1) szinkronizálással [76], (2) mitotikus lerázással, (3) centrifugális ülepítéssel és (4) áramlási citométerrel történő sejtválogatással.

I.1.4.1.1. Szinkronizálás

Sejttenyészetek szinkronizálása során tápanyagok (leggyakrabban szérum) megvonásával (serum starvation) vagy különböző sejtciklus gátlószerek alkalmazásával a sejtciklus egy bizonyos pontján felfüggesztjük a sejtciklus progresszióját. A kezelés hatására a sejt ezt a pontot elérve sejtciklusát tovább nem folytathatja. Idővel a tenyészetben minden sejt ehhez a ponthoz ér, így a tenyészetben található összes sejt ciklusa szinkronizálódik. Ezt követően a tápanyagok a sejtek tápfolyadékába történő reintegrálásával, vagy a sejtciklus gátlószerek tápfolyadékból való eltávolításával a sejtek meghatározott pontról, szinkronizáltan folytathatják a sejtciklust. Ennek során a sejttenyészetből időegységenként mintát véve, a sejtciklus pillanatnyi állapotához viszonyítva, vizsgálhatóvá válik a sejtciklusfüggő transzkripciós program [76], amihez nagy áteresztőképességű expressziós módszerek (például microarray technológia) és ezt követően optimális bioinformatikai elemzés szükséges [73-75].

A sejtciklus progressziójának felfüggesztésére számos különböző módszer alkalmas. Az exogén mitogén szignálok eliminálásával a sejt nem tud elköteleződni a sejtosztódás irányába, nem tudja átlépni a restrikciós pontot. Ezt a tápfolyadék (a sejt típusától függő, leggyakrabban megközelítőleg 10%-os) szérumtartalmának csökkentésén (serum starvation – szérum éhezés) keresztül tudjuk elérni. Más módszerek a DNS szintézis (timidin, aphidicolin – korai S fázis blokk), vagy a mitotikus orsó gátlásával (kolhicin, nokodazol, M fázis blokk) akadályozzák meg a sejtciklus előrehaladását [76].

A sejtciklusfüggő változások vizsgálatára a szinkronizálás a legszélesebb körben alkalmazott technika, amelyet mind a sejtciklusfüggő transzkripció [73-75], mind a sejtciklusfüggő transzláció [77] vizsgálatára is alkalmaznak, a metodikát azonban számos kritika is érte. Bár a sejtek többsége esetében a szinkronizálási protokoll optimalizálása sikeres lehet, néhány érzékenyebb sejttípus esetén a kezelések óhatatlanul letálissá válhatnak [76]. Emellett a normális, diploid emlőssejtek korán elvesztik szinkronizáltságukat [75, 78] és csupán egy részük (50-70%) köteleződik el a további

sejtosztódások irányába [75, 79]. Továbbá, a sejtciklus gátlószerekkel (pl. timidin) történő kezelés a ciklinek időelőtti expresszióját okozva növekedési egyensúly eltolódást (growth imbalance) okoz [80, 81] és a DNS szintézisének gátlásával az ATM/ATR jelátvitelt aktiválja a G2/M ellenőrzőponton keresztül [82], így megzavarja a sejtciklus optimális működését [81, 83].

I.1.4.1.2. Mitotikus lerázás

Letapadó sejtek mitózisa során az interfázisra jellemző morfológiával rendelkező sejt kerek formát vesz fel, csökken a tenyésztőedény aljzatához való adhéziója. Ezt a csökkenő fizikai kötődést használja ki a mitotikus lerázás módszere [76, 84], amelynek során - megelőző gyógyszeres szinkronizálást követően [76] vagy attól függetlenül [84] - a sejttenyészetet mechanikus rázóerőknek kitéve a kevésbé letapadó lekerekedett, M fázisú sejtek szelektálása történhet meg. A módszer korlátai közé tartozik, hogy csak az M fázisú sejtek kiválasztása történhet meg, illetve, hogy csak letapadó sejteken alkalmazható. Ugyanakkor nem történik a sejtciklus működését alapvetően befolyásoló gyógyszeres kezelés.

I.1.4.1.3. Centrifugális ülepítés

A sejtciklus előrehaladásával az egymást követő fázisok során a sejtek mérete növekszik. A centrifugális ülepítés során az elválasztás a sejtek nagysága alapján történik [85, 86]. Az ülepítőkamrában uralkodó centrifugális sebesség és az ennek síkjára merőlegesen bocsátott pumpáló erőhatás finomhangolása teszi lehetővé a különböző méretű (és különböző fázisokba tartozó) sejtek szeparálását [85]. Bár az ülepítőberendezés kialakítása bonyolultabb infrastruktúrát igényel, mint az előző metodikák során használt gyógyszeres kezelés, vagy a lerázás, ennek a technikának is előnye az, hogy csupán minimális perturbáció történik a sejtciklus mechanizmusában [85, 86]. A sejtciklusfüggő

transzkripció szabályozását a centrifugális ülepítés alkalmazásával sikeresen vizsgálták élesztőgombákban [87, 88].

I.1.4.1.4. Sejtválogatás áramlási citométerrel

Az eukarióta diploid sejtek sejtciklusa során a G1 fázisban található 2N mennyiségű DNS tartalom az S fázis folyamán duplázódik meg és a G2 fázisra 4N mennyiségű lesz. A DNS tartalom fenti változása specifikus és sztöchiometrikus DNS-festés (pl. propídium-jodid) segítségével áramlási citométerrel kimutatható. Az újabb generációs áramlási citométerek a detektálás mellett bizonyos – általunk kijelölt – fajlagos (egységnyi sejtre vonatkozatott) küszöbintenzitások közé tartozó fluoreszcens intenzitású sejteket szét is tudnak válogatni. Ez adja az alapját a fluoreszcencia aktiválta sejtválogatásnak (fluorescence activated cell sorting – FACS). A propídium-jodid membrán-impermeábilis festék, amelyet az apoptotikus sejtek kimutatására széles körben használják, élő sejtek örökítőanyagának festésére azonban alkalmatlan [89]. A sejtciklusfüggő transzkripció vizsgálatakor olyan DNS festék szükséges, amely az élő sejtek örökítőanyagát képes jelölni, minimálisra csökkentve a sejt normális működésének bárminemű befolyásolását [90, 91]. Ehhez új festékek kerültek kifejlesztésre [91]. Hoechst 33342 festék használatával sikeresen válogattak szét különböző fázisú sejteket humán húgyhólyag tranzícionális sejtes karcinóma sejtvonalból, amelyeken a ciklin B1 különböző expresszióját is demonstrálták [92]. Vybrant DyeCycle Orange festék alkalmazásával szétválogathatóak a sejtciklus különböző fázisaiban lévő limfoblasztoid sejtek [93].

I.1.4.2. A sejtciklusfüggő transzkripciós program és szabályozása

A sejtciklusfüggő transzkripció vizsgálata során egy konkrét mRNS vagy egyszerre sok transzkriptum vizsgálata lehetséges. Először Northern-blot alapú vizsgálatokkal egy-egy mRNS esetében igazolták a sejtciklusfüggő expressziót [94]. Legkorábban a sarjadzó

élesztő hiszton fehérjéinek sejtciklussal korreláló kifejeződését írták le [94, 95]. A nagy áteresztőképességű technikák elterjedésével (pl. microarray vizsgálatok) elérhetővé vált a teljes sejtciklusfüggő transzkripciós program vizsgálata [94]. A fenti módszer segítségével számos tanulmány készült a sarjadzó élesztő sejtciklusfüggő transzkripciós programjának vizsgálatára, amelyek külön-külön megközelítőleg 800-1000 sejtciklusfüggő kifejeződésű mRNS-t írtak le [87, 96-98]. Három vizsgálat összehasonlító elemzésével 440 olyan transzkriptumot találtak, amelyek mindhárom esetben sejtciklusfüggő kifejeződést mutattak [87, 94, 97, 98]. Hasadó élesztő modellorganizmuson végzett további vizsgálatok a transzkriptumok kisebb hányadát találták sejtciklusfüggő expressziójúnak (a három vizsgálatból csupán 171 transzkriptum volt átfedő) [94, 99-101]. Humán sejtekben történt vizsgálatok 1000 körüli mRNS esetében vetették fel a sejtciklusfüggő kifejeződést [73-75].

Eukarióta sejtekben a sejtciklus egyes fázisaiban kulcsfontosságú regulátorok és effektorok kifejeződése egymást követően, hullámszerű transzkripciós aktivitás eredményeképpen történik [102, 103]. Az első hullám során a G1/S átmenetben fontos transzkriptumok kifejeződése történik meg. Emlős sejtekben a G2/M átmenet transzkripciós eseményeinek szabályozásáról kevesebbet tudunk és az M/G1 átmenet esetében is nehéz a szabályozott transzkriptumok tanulmányozása [102, 104] .

I.1.4.2.1. Transzkripciós szabályozás a G1 és S fázisokban

A G1/S átmenet transzkripciós szabályozásának kulcslépése a pRb, a p107 és a p130 fehérjék fent említett módon történő, aktivált CDK4 és CDK6 enzimek általi foszforilálása. A pRb, a p107 és a p130 fehérjék defoszforilált állapotban kötődnek az E2F transzkripciós faktor-család tagjaihoz, amely kapcsolat a foszforiláció következtében megszűnik [102]. A restrikciós pontot megelőzően a pRb-hez kötődő E2F1, E2F2 és E2F3 inaktív [102, 105], míg a p107 és p130 fehérjékkel komplexet alkotó E2F4 és E2F5 aktív állapotú, utóbbiak a DNS megfelelő régióihoz kötődve gátolják a G1/S transzkripciós program expresszióját [102, 106-109]. A restrikciós pontot követő foszforiláció

következtében felszabadult E2F1, E2F2 és E2F3 transzkripciós faktorok a DNS-hez kötődve aktiválják a G1/S transzkripciós programot (többek között az E és A ciklinek transzkripciójának fokozásával) [102, 107, 108].

A restrikciós pontot követően "a minden vagy semmi" elköteleződés jegyében a megkezdődő G1/S transzkripciós program első transzkriptumai – kiemelendő közülük az E ciklin – pozitív visszacsatolással erősítik a G1/S transzkripciós programot [102, 110]. Ennek a pozitív visszacsatolásnak kiemelt jelentősége van a sejtosztódás iránti elköteleződésben [111]. Ugyanakkor, időben kissé eltolva, az indukálódott transzkripciós represszorok és a transzkripciós aktivátorok szintjének csökkenése is szerepet játszik – negatív visszacsatolás útján – a G1/S transzkripciós program elcsendesítésében [102]. A G1/S transzkripciós program során expresszálódó E2F6, E2F7 és E2F8 transzkripciós faktorok - az E2F4 és E2F5-höz hasonlóan - transzkripciós represszorok, amelyek – a p107 és p130 fehéjéktől függetlenül – a DNS-hez kapcsolódva gátolják az S fázis-függő transzkripciót [102, 112-116]. Az S fázis leállításában szerepe van a ciklin A-CDK2 komplexnek is, amely az E2F1-hez kötődve és azt foszforilálva indukálja annak DNS-ről való disszociációját, megszakítva az E2F1 mediálta transzkripciós programot [102, 117-119].

Látható, hogy pozitív és negatív visszacsatolású körök finomhangolják a G1/S transzkripciós programot. A fenti visszacsatolások időben kissé elválnak, így a kezdeti pozitív visszacsatolás kiteljesíti a transzkripciós programot, míg a később induló negatív visszacsatolás terminálja azt. A visszacsatolások ezen sorrendisége kiemelten fontos a sejtciklus optimális működéséhez [102, 110]. Az időben eltolódott transzkripciós szabályozás molekuláris alapjait az E2F család tagjainak különböző DNS-szakaszok iránti specificitása biztosítja [102, 120, 121].

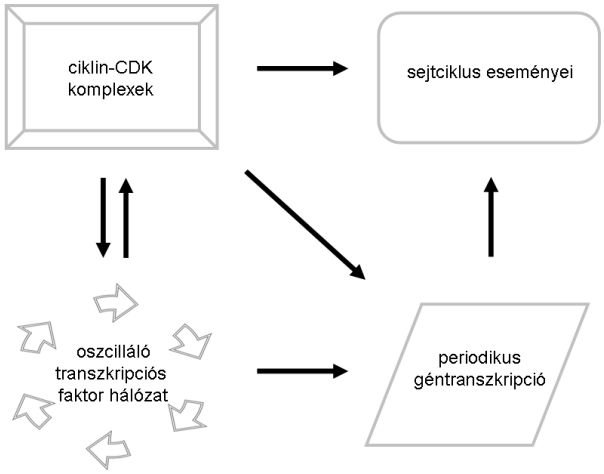
I.1.4.2.2. Transzkripciós szabályozás a G2 és M fázisokban

A G1/S transzkripciós programhoz képest a G2/M transzkripciós szabályozás kevéssé ismert [122]. A G2/M transzkripciós program szabályozásában kiemelt jelentősége van a Forkhead box (Fox) családba tartozó FoxM1 transzkripciós faktornak, amely transzkripciós aktivitását – a ciklin A-CDK2 komplex által aktivált, foszforilált formában – a G2 és M fázisokban fejti ki [122]. A FoxM1 transzkripciós faktor fázis–specifikus aktivitásáért a defoszforilálását végző, ezáltal inaktiválását okozó B55α–mediálta PP2A (protein phosphatase 2A) is felelős [123]. A FoxM1 bizonyos mitotikus regulátorok, köztük a metafázis ellenőrzőpont regulátorainak transzkripcióját serkenti [122, 124-126]. Transzkripcionális koaktivátorán (histone deacetylase p300/CREB binding protein – Ep300/Crebbp) keresztül a mitózisba lépést is szabályozza [122, 127-130].

I.1.4.2.3. Redundancia a transzkripciós szabályozásban

Mint ahogy korábban említettem, a sejtciklus mind a ciklin D-CDK4/6, mind a ciklin E-CDK2 komplexek nélkül – a molekuláris mechanizmusok redundanciája következtében – is végbemehet [17, 18]. Más vizsgálatok azt is kimutatták, hogy az E2F család aktiváló tagjainak (E2F1, E2F2, E2F3) hiányában is képes osztódni a sejt [131]. Orlando és munkatársai sarjadzó élesztőben végzett kísérleteikkel rávilágítottak arra, hogy S-fázisú és mitotikus ciklineket egyaránt nélkülöző sejtekben is fennmarad a periodikus expresszió [87]. Bár ezek a sejtek nem tudtak továbblépni a G1/S fázisból, a sejtciklusfüggő transzkripciós programba tartozó gének 70%-a továbbra is periodikus expressziót mutatott [87]. Hipotézisük szerint létezik egy transzkripciós faktor hálózat, amelynek tagjai meghatározott sorrendben történő aktivitás-fokozódásuk és egymásra hatásuk következtében periodikus géntranszkripciót eredményeznek (**3. ábra**). A ciklinek és CDK-k sejtciklusfüggő expressziója ennek a hálózatnak a következménye és erősíti a hálózat tagjainak oszcilláló expresszióját. A hipotézis szerint a transzkripciós faktor hálózat

és a ciklinek és CDK-k együttműködése okozza a robusztus periodikus géntranszkripciót (sejtciklusfüggő transzkripciós program) és a sejtciklus optimális működését [88].



3. ábra – Az oszcilláló transzkripciós faktor hálózat és a ciklin-CDK komplexek együttműködésének hipotézise Simmons Kovacs és munkatársai eredményei alapján – *Az ábra [88] alapján készült.*

I.1.4.3. Sejtciklusfüggő transzkripció vizsgálata humán sejteken

A humán sejtek transzkripciós programjának jellemzését Cho és munkatársai munkája kezdte meg [73]. Szinkronizált fibroblasztokban végzett kísérleteik során több mint 700 mRNS transzkriptum sejtciklusfüggő expresszióját mutatták ki. A sejtciklus során észlelt dinamikus expressziós változások hasonlósága alapján olyan géncsoportokat (clustereket) határoztak meg, amelyek a késői G1, S, G2 és M fázisokban, fázis-specifikusan emelkedett expressziót mutatnak. Biológiai funkcióik alapján a késői G1 fázis génjei – többek között – a DNS replikációban, a G2 fázis génjei a citoszkeletális reorganizációban, az M fázis génjei a kromoszómák szegregációjában játszanak szerepet [73].

Whitfield és munkatársai a sejtciklusfüggő génexpressziót HeLa méhnyakrák-sejtvonalon vizsgálták [74]. Több mint 850 sejtciklusfüggő kifejeződésű gént azonosítottak,

amelyeket expressziós dinamikájuk alapján 5 csoportba sorolták (1. G1/S, 2. S, 3. G2, 4. G2/M és 5. M/G1 fázisokban expressziós maximumot mutatók). Megállapították, hogy a rosszindulatú daganatokban fokozottan expresszálódott gének nagy része megtalálható a sejtciklus transzkripciós programjában, amelyet azzal magyaráztak, hogy proliferatív daganatokban felülreprezentálódnak a sejtciklus későbbi fázisai (S, G2, M) és az azokra jellemző génexpressziós profil [74]. Ugyanakkor, az M/G1 átmenetben tetőző expressziójú gének – amelyek fontos szerepet töltenek be a sejt-sejt adhézióban és az aktin citoszkeleton regulációjában – csökkent kifejeződésűek az invazív, metasztatizáló, rossz prognózisú daganatokban [74, 132-134].

Bar-Joseph munkacsoportja bioinformatikai módszerekkel tökéletesítve a szinkronizálást – *in silico* szinkronizálás – újraelemezte Whitfield és munkatársai HeLa sejtekből származó adatait és új méréseket végzett primer fibroblaszt tenyészeten [75]. 362 olyan mRNS-t azonosított, amely ciklikus expressziót mutat mind a HeLa, mind a primer fibroblaszt sejtek sejtciklusa során ("közös" csoport), míg 119 gén csak HeLa és 118 gén csak primer, nem-transzformált fibroblasztokban mutat sejtciklusfüggő expressziót. Emellett kimutatták, hogy rákos sejtekben szignifikánsan alacsonyabb a csak fibroblasztokban ciklikus expressziójú gének átlagos kifejeződése a "közös" csoportba tartozó gének átlagos expressziójához képest, míg ép, mitotikus aktivitást nem mutató vagy ép, aktívan osztódó sejtek esetében nem ábrázolódott szignifikáns különbség. A fentiek alapján a csak ép fibroblasztokban sejtciklusfüggő kifejeződésű transzkriptumoknak kiemelkedő jelentőségük lehet az ép sejtciklus szabályozásában, amely károsodik a malignus transzformáció során [75].

Cho, Whitfield és Bar-Joseph munkacsoportjainak vizsgálatai szinkronizálást követő microarray mérések alapján történtek. Shedden és Cooper újraelemezte Cho adatait és összehasonlították egy – az eredeti mérésekből – random létrehozott adatsorral, amelynek során azt találták, hogy a random adatsor elemei legalább olyan erős ciklikusságot mutatnak, mint az eredeti mérés elemei [135]. Felvetették, hogy a szinkronizáláshoz használt eljárások – jelen esetben timidin – is képesek ciklikus

génexpressziót indukálni, amely hiányzik a nem-szinkronizált tenyészetekben [135]. Korábban említettem, hogy a különböző szinkronizálási módszerek további hatásait is leírták, amelyek megváltoztatják a sejtciklus működését, ezáltal az ilyen kísérletekből kapott eredmények nem feltétlenül extrapolálhatóak az ép sejtciklusra [75, 76, 78-83]. A fenti korlátok elkerülésére Shedden és Cooper definiálta azokat a kritériumokat, amelyeknek teljesülniük kell a sejtciklusfüggő génexpresszió vizsgálatára irányuló kísérletek esetében. Ezek szerint, egy gén esetében sejtciklusfüggő expresszióról beszélhetünk, amennyiben (i) a kísérletek során semmilyen gátlószer adagolásával járó (klasszikus szinkronizálás) vagy éheztetéses (szérum éhezés) módszer nem került alkalmazásra, (ii) az eredmények reprodukálhatóak, (iii) többféle expressziót mérő módszer is egybehangzó eredményre jutott (pl. microarray és qRT-PCR), továbbá (iv) nem-szinkronizált kísérletek és (v) optimális statisztikai elemzések is megerősítik az eredményeket [135]. A fenti kritériumoknak eleget tevő teljes génexpressziós vizsgálatok ugyanakkor még nem történtek.

I.1.5. A mikroRNS-ek szerepe a sejtciklus szabályozásában

A mikroRNS-ek (miRNS-ek) rövid, ~ 21-26 nukleotid hosszú egyszálú RNS molekulák, amelyek az RNS interferencia jelensége révén csendesítik a báziskomplementaritás alapján célzott mRNS-ek transzlációját [136]. A miRNS-ek a genomiális lókuszokról először hosszabb, pri-miRNS formában íródnak át, majd megfelelő sejtmagi átalakításokat (Drosha és DGCR8 által) követően pre-miRNS formában transzlokálódnak a citoplazmába. Itt - további DICER-mediálta átalakításokat követően - két érett, egymással báziskomplementer forma (miR-XY-5p és miR-XY-3p) alakul ki, amelyek a több fehérje (köztük az Argonaute proteinek) alkotta miRNS-indukálta csendesítő komplexbe ágyazódva (miRISC – miRNA-induced silencing complex) fejtik ki specifikus transzláció-csendesítő vagy mRNS-degradáló hatásukat [137]. A teljesség kedvéért megjegyzendő, hogy bár a mai napig leírt miRNS-mediálta folyamatok a

specifikus célszekvenciák csendesítését mediálják, újabban leírtak miRNS-közvetített RNS aktivációs (RNAa – RNA activation) folyamatokat is, amelyek során a miRNS stimulálja a célzott gén kifejeződését [138].

A miRNS-mediálta csendesítés a humán genom több mint felének kifejeződését befolyásolja, így számos élettani (pl. fejlődés, sejtciklus) és kórélettani (daganatképződés, szív- és érrendszeri, neurológiai megbetegedések) folyamat mediálásában is kiemelt szerepe van [139, 140]. Dolgozatomban a továbbiakban a miRNS-eknek a sejtciklus regulátoraira gyakorolt, daganatképződést segítő hatásaival foglalkozom.

Daganatképződés során a protoonkogéneket célzó miRNS-ek (TS-miR – tumor szuppresszor miRNS) csökkent és a tumor szuppresszor géneket célzó miRNS-ek (onko-miR – onkogén miRNS-ek) fokozott expresszióját írták le [141, 142]. Elsőként a hsa-miR-16 család tagjait – mint TS-miR-ek – kódoló genomikus lókusz delécióját mutatták ki krónikus limfoid leukémiában [143]. Később igazolódott, hogy a miRNS-eket kódoló gének több mint fele olyan kromoszómális régiókban kódolódik, amelyek a daganatképződés során gyakran kiesnek vagy transzkripcionálisan inaktívvá válnak [141, 144]. A **2. táblázat**ban néhány példát mutatok be olyan miRNS – cél mRNS interakciókra, amelyeknél a TS-miR-ek csökkent kifejeződése együtt jár a célzott protoonkogén sejtciklus regulátor (ciklinek, CDK-k) fokozott expressziójával, vagy az onko-miR emelkedett kifejeződése következtében a célzott tumor szuppresszor sejtciklus regulátor (CDKi) csökkent módon fejeződik ki [140].

A sejtciklus regulátorainak és a miRNS-eknek a kölcsönhatása nem egyirányú. Bueno és munkatársai szérum sokkot alkalmazva kimutatták, hogy a sejtciklusfüggő expressziójú E2F1 és E2F3 transzkripciós faktorok fokozzák az ismerten TS-miR funkciójú hsa-miR-16 és hsa-let-7 család tagjainak kifejeződését és – a replikációs stressz kivédésén keresztül – segítik az E2F-mediálta sejtciklus progresszió finomhangolását [145]. Ofir és munkatársai ezzel egybehangzóan igazolták, hogy az E2F1-mediálta miR-15 expresszió-

fokozódás ciklin E-t csendesítő hatása negatív előrecsatolás útján járul hozzá a G1/S átmenet finomhangolásához [146].

A sejtciklusfüggő miRNS transzkripciós program vizsgálatára további kísérletek is történtek. Bueno munkacsoportja mellett Rissland és munkatársai is a tápfolyadék szérum

2. táblázat – A miRNS-ek szerepe a sejtciklus regulátorainak szabályozásában daganatképződés során – *A narancs háttér a daganatokban ép szövetekhez képest észlelt emelkedett, a zöld háttér a daganatokban észlelt csökkent expressziót jelzi. Az egyes miRNS-mRNS fizikai interakciói a hivatkozott cikkekben kerültek bizonyításra.*

célzott sejtciklus regulátor		célzó miRNS	érintett daganat
csoport	**regulátor**		
ciklinek	D1 ciklin	hsa-miR-15b	glioma [147]
		hsa-miR-16	prosztatarák [148]
		hsa-let-7b	melanóma malignum [149]
	D2 ciklin	hsa-miR-29c	gyomorrák [150]
	D3 ciklin	hsa-let-7b	melanóma malignum [149]
	E1 ciklin	hsa-miR-132	oszteoszarkóma [151]
		hsa-miR-7	hepatocelluláris karcinóma [152]
		hsa-miR-15a	emlőrák [153]
	A ciklin	hsa-let-7b	melanóma malignum [149]
	B1 ciklin	hsa-miR-410	gonadotróp hipofízis adenóma [154]
		hsa-miR-379	emlőrák [155]
CDK	CDK4	hsa-let-7b	melanóma malignum [149]
		hsa-miR-124	emlőrák [156]
		hsa-miR-195	húgyhólyagrák [157]
		hsa-miR-506	petefészek daganat [158]
	CDK2	hsa-miR-200c	világossejtes veserák [159]
		hsa-miR-638	akut mieloid leukémia [160]
		hsa-miR-885-5p	neuroblasztóma [161]
		hsa-miR-372	méhnyakrák [162]
	CDK1	hsa-miR-7	mellékvesekéreg-karcinóma [163]
		hsa-miR-582-5p	hepatocelluláris karcinóma [164]
		hsa-miR-490-3p	petefészek daganat [165]
CDKi	p21	hsa-miR-106b	gyomorrák [166]
			melanóma malignum [167]
	p27	hsa-miR-221	gyomorrák [166]
		hsa-miR-429	prosztatarák [168]
		hsa-miR-25	oszteoszarkóma [169]
		hsa-miR-452	hepatocelluláris karcinóma [170]
		hsa-miR-200b	vastagbéltumor [171]

tartalmának változásaival idéztek elő szinkronizálást és vizsgálták a szérumhatásra történő miRNS változásokat. Megerősítették a hsa-miR-16 család expressziójának szérum hatására történő dinamikus változását [172]. További kísérletek, amelyek HeLa sejteken timidin szinkronizálást követően történt miRNS-változásokat mértek, 25 sejtciklusfüggő kifejeződésű miRNS-t igazoltak [173].

I.2. A mellékvesekéreg-karcinóma (ACC)

A mellékvesekéreg-karcinóma (ACC – adrenocortical cancer) a mellékvese kéregállományából kiinduló ritka, kiemelten rosszindulatú, rossz prognózisú daganat [174]. Incidenciája 0,7-2,0/millió fő/év [174, 175]. Leggyakrabban 40-50 éves kor körül manifesztálódik [174], de brazil populációban viszonylag gyakori az öröklött TP53 mutáció okozta Li-Fraumeni szindrómához társuló gyermekkori ACC is [176]. Prognózisa rossz, az ötéves túlélés csupán 22-37%-os [177, 178].

I.2.1. Etiológia és patogenezis

Bár a mellékvesekéreg-karcinóma leggyakrabban sporadikus előfordulású megbetegedés, az örökletes endokrin tumorszindrómákhoz társuló ACC-k genetikai hátterének ismerete segítséget nyújt bizonyos kóroki tényezők megismerésében, amelyek a sporadikus esetekben – bár más mechanizmussal – is megnyilvánulnak. Sporadikus esetekben a két leggyakoribb patogenetikai eltérés a Wnt/β-katenin útvonal fokozott aktivációja és az emelkedett IGF-2 szignalizáció [174].

I.2.1.1. Familiáris szindrómákhoz társuló ACC-k

ACC-re hajlamosítanak a Li-Fraumeni, a Beckwith-Wiedemann és a familiáris adenomatózus polipózis szindrómák. A Li-Fraumeni szindróma autószómális domináns

öröklődésmenetű, nagy penetranciájú tünetegyüttes, amelynek a lágyrész- és oszteoszarkóma, emlőrák, központi idegrendszeri daganatok és leukémia mellet az ACC is egy manifesztációja [179-181]. A betegséget leggyakrabban a p53 általános tumor szuppresszor fehérjét kódoló *TP53* gén deaktiváló mutációi okozzák [179]. A Beckwith-Wiedemann szindróma egy ritka, gyermekkorban manifesztálódó túlnövési tünetegyüttes, amely – a fokozott IGF-2 jelátvitel következtében – hasfali defektusokban, makroglossziában és számos daganatféleségben, köztük ACC-ben manifesztálódhat [179, 182]. A betegség hátterében az IGF-2-t kódoló kromoszómális régió genomiális imprintgjének zavara, gyakran paternális uniparentális diszómia található [179, 183]. Az autoszómális domináns öröklődésmentű familiáris adenomatózus polipózis (FAP) leggyakrabban a vastagbél polipózisában manifesztálódik, de előfordulhat ACC is [184]. Hátterében az *APC* gén inaktiváló mutációi állnak. Ép formában az APC – együttesen más proteinekkel – a β-katenin ubiquitin-mediálta degradációját regulálja, hibás APC esetén a Wnt/β-katenin szignalizáció fokozódása vezet a daganatképződéshez [185].

I.2.1.2. A Wnt/β-katenin útvonal fokozott aktivitása

A Wnt/β-katenin útvonal konstitutív aktivitása a mellékvese adenómáinak és karcinómáinak gyakori jellemzője [174, 186]. Ennek hátterében leggyakrabban a β-katenint kódoló gén (*CTNNB1*) aktiváló mutációi állnak, amelynek következménye a Wnt stimulációtól független, konstitutív β-katenin jelátvitel [174, 187]. Ennek megfelelően, a fokozott nukleáris β-katenin expresszió rossz prognosztikai marker ACC-ben [174, 187, 188]. Kimutatták továbbá, hogy a Wnt/β-katenin jelátvitel fokozása a mellékvese kéregállományában hiperpláziát és daganatképződést indukál [174, 189]. Az utóbbi időben néhány, a Wnt/β-katenin jelátvitelt gátló hatóanyag került fejlesztésre, amelyek újabb farmakológiai lehetőségeket jelenthetnek az ACC kezelésében is [190].

I.2.1.3. Fokozott IGF-2-jelátvitel

Az ACC-ben tapasztalható fokozott IGF-2 jelátvitel oka a 11p15 kromoszóma régió genomiális imprintgjének megváltozása – leggyakrabban paternális uniparentális diszómia formájában, amelyet az ACC szövetek kétharmadában leírtak [174, 191]. Ugyan az IGF jelátvitel fokozódásával járó IGF-2 aktiváció nem okozott malignus elváltozásokat egér mellékvesében [174, 188, 192], a Wnt/β-katenin szignalizáció fokozása melletti IGF-2 aktivációnak szerepe lehet a daganatképződésben [174, 188]. ACC sejtvonalakon végzett kísérletek kimutatták, hogy az IGF jelátvitel gátlása önmagában és mitotánnal vagy mTOR inhibitor sirolimus-szal kombinálva a proliferáció gátlásán keresztül ígéretes antineoplasztikus potenciállal bírhat [174, 193, 194]. A fenti ígéretes *in vitro* eredményekkel ellentétben, a kismolekulájú IGF-1-receptor-gátló linsitinib egy friss klinikai vizsgálat tanúsága alapján hatástalannak bizonyult [195].

I.2.1.4. Nagy áteresztőképességű technológiákkal szerzett információ

A nagy áteresztőképességű technikákkal végzett transzkripciós profil vizsgálatok a mellékvesekéreg daganaitainak molekuláris patogenezisének tisztázásában is fontos előrelépést jelentettek. 2009-ben három tanulmányban is vizsgálták az ACC malignitás mintázatát (azon génexpressziós különbségeknek az összessége, amely az ACC-ben eltér az adrenokortikális adenómához – ACA – viszonyítva) [196-198]. De Reynies és munkatársai összesen 153 adrenokortikális daganat vizsgálatával, számos génexpressziós különbséget írtak le adenómák és karcinómák között, valamint a karcinómákon belül – a transzkripciós profil alapján – a prognózis függvényében két csoportot különítettek el [196]. Giordano és munkatársainak munkája összesen 2875 gént azonosított, amelyek megváltozott expressziójúak ACC-ben ACA-hoz és normális mellékvesekéreghez képest és igazolta de Reynies és kollégái észrevételét a génexpressziós mintázatban és klinikai prognózisban is különböző két ACC csoportról [197]. Tömböl és munkatársai teljes gén és miRNS expressziós profilt vizsgálva 6 olyan miRNS-t azonosítottak, amely megváltozott

expressziót mutatott különböző mellékvesekéreg daganatokban [198]. Felvetették, hogy a szöveti miRNS expresszió mérése segíthet – nem egyértelmű hisztopatológiai lelet esetében – a dignitás meghatározásában [198]. A fenti nagy áteresztőképességű tanulmányok metaanalízise több, korábban nem tisztázott, jelentős patogenetikai útvonalat, így a sejtciklus, a retinsav jelátvitel, a komplementrendszer és az antigén prezentáció megváltozott működését írta le [199].

Legújabban, új generációs szekvenálási eljárással vizsgálták az ACC-ben előforduló mutációkat és sikeresen validálták a már ismert patogenetikai eltéréseket a *TP53,* a *NF1,* a *MEN1,* a *CTNNB1,* a *CDKN2A* és a *RB1* gének esetében [200, 201]. Emellett, a szomatikus mutációkat vizsgálva is igazolták a két különböző prognózisú ACC csoport molekuláris hátterét és felvetették ACC-vel még nem asszociált új gének (pl. *ZNRF3*) gyakori patogenetikai szerepét a Wnt/β-katenin útvonalhoz kapcsolódó daganatképződésben [201].

I.2.2. A mellékvesekéreg-karcinóma diagnosztikája

A European Network for the Study of Adrenocortical Tumors (ENSAT) 2005-ös ajánlása ACC gyanú esetén elsővonalban a beteg széleskörű laboratóriumi kivizsgálását (alap, reggeli kortizol, adrenokortikotropin, dehidroepiandroszteron-szulfát, 17-hidroxi-progeszteron, androszténdion, tesztoszteron, ösztradiol valamint kisdózisú dexametazon szuppressziós teszt és vizelet szabad kortizol ürítés) javasolja [174]. A komplex, vérből és vizeletből történő kivizsgálás célja az adrenokortikális eredet és az autonóm glükokortikoid termelés tisztázása, ami tájékozódást adhat az elváltozás dignitására is [174]. A laboratóriumi diagnosztika kiteljesítésében ígéretes lehet az ACC-specifikus keringő miRNS-ek plazmából való kimutatása is [202]. A klinikai diagnózis megerősítésében az elsőként választandó képalkotó eljárás a natív CT vizsgálat. Az elváltozás mérete mellett annak denzitása bír komoly diagnosztikus relevanciával. Míg a legtöbb adenóma 5 cm-nél kisebb, a malignus elváltozások gyakran 10 cm-nél nagyobbak. Natív CT vizsgálaton mért 10 Hounsfield unit (HU) egységnél alacsonyabb denzitású elváltozás gyakorlatilag kizárja

az ACC valószínűségét, ennél magasabb natív denzitás esetén indokolt a kontrasztanyagos CT vizsgálat elvégzése, amely megerősítheti az ACC diagnózisát [174].

Az ACC hisztopatológiai diagnózisa nehéz feladat [174]. Az adrenokortikális eredet tisztázását (SF1 fehérje immunhisztokémiai vizsgálata) követően a dignitás megállapítása következik, amelynek során a 9 különböző patomorfológiai tényezőből (köztük pl. a nukleáris morfológiai elváltozások, a mitózisok száma és típusai, a daganat architektúrája, a nekrózis jelenléte, a tokot, illetve a véredényeket elérő infiltráció jelenlétének vizsgálatai) összetevődő Weiss score meghatározása mellett a proliferáció immunhisztokémiai markereinek (elsősorban Ki-67 index) vizsgálata történik [174, 203]. A Ki-67 index meghatározása kiemelt jelentőségű, ugyanis ez számít a legerősebb prognosztikai markernek [174].

I.2.3. A mellékvesekéreg-karcinóma terápiája

Az ACC terápiája a daganat lehetséges eltávolításán és adjuváns kemoterápián alapul. Mellékvesére lokalizált, operábilis tumor esetén teljes eltávolítás javasolt. Ennek formája általánosan nyitott adrenalektómia, ugyanakkor, kisebb daganatok esetén laparoszkópos eltávolítás is mérlegelhető. Szubtotális eltávolítást követően a tumorágy irradiációja és adjuvánsan az adrenolítikus mitotán adása javasolt. Teljes eltávolítást követően az adjuváns mitotán adásának javallata a Ki-67 index függvénye. A műtétet követően háromhavonta javasolt kontrollvizsgálat, amelynek során a tumormarkerek és képalkotók segítségével követhető az esetleges recidíva. Recidíva esetén ismét megfontolandó a sebészi eltávolítás és az adjuváns mitotán mellett citotoxikus szerek (pl. ciszplatin) adása. Előrehaladott ACC esetében a tumorméretet csökkentő műtét mellett mitotán terápia és EDP (etopozid, doxorubicin, ciszplatin) protokoll szerinti kemoterápia adása javasolt. Az ACC rossz prognózisát remélhetőleg javítani fogják a jelenleg kutatás alatt lévő, a daganat progressziójban kulcsfontosságú faktorokat célzó hatóanyagok (pl.

tirozinkináz-inhibitor szunitinib és szorafenib, VEGF-gátló bevacuzimab, EGFR-gátló erlotinib) [174].

II. Célkitűzések

"We have every right to dream heroic dreams."[2]

Doktori munkám során az alábbi célokat állítottam fel:

1. Célom volt kidolgozni és alkalmazni egy olyan, a sejtek DNS tartalma alapján áramlási citometriás sejtválogatással szeparáló módszert, amelynek segítségével a szinkronizáció korlátai nélkül tudjuk nagy áteresztőképességű metodikákkal vizsgálni humán primer nem-transzformált és tumoros (adrenokortikális és méhnyakrák eredetű) sejtek sejtciklusfüggő génexpresszióját. A különböző sejtciklus fázisok teljes génexpressziós profiljának mérésével vizsgálni kívántam a sejtciklusfüggő génexpressziót, és ezt össze kívántam hasonlítani a korábbi, szinkronizációval nyert eredményekkel.

2. Munkám során választ kerestem arra, hogy a sejtciklusfüggő génexpresszió dinamikája eltér-e a tumoros és a nem-transzformált sejtekben.

3. Vizsgálni kívántam, hogy igazolhatóak-e integratív teljes miRNS expressziós vizsgálatokkal (microarray, TLDA, kis RNS szekvenálás) sejtciklusfüggő miRNS expressziós változások.

4. A mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonal sejtciklusfüggő transzkripciós programjának és az ACC-re jellemző malignitás mintázatnak összehasonlításával új, potenciálisan proliferációs markerként hasznosítható faktort kerestem. További célom volt az így azonosított ribonukleotid reduktáz M2 alegysége (RRM2) kifejeződésének vizsgálata különböző proliferációs aktivitású ACC szöveteken.

[2] idézet Ronald Wilson Reagan (1911-2004), az Amerikai Egyesült Államok elnökének 1981. január 20-án elmondott beiktatási beszédéből

5. Vizsgálni kívántam, hogy a különböző antineoplasztikus kezelések hatással vannak-e az RRM2 proliferációs marker kifejeződésére mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonalon. Arra kerestem a választ, hogy a daganatos sejtek kezelése csökkenti-e a proliferációs marker kifejeződését.

III. Módszerek

"Experimentum solum certificat in talibus"[3]

III.1. Sejttenyészeteken végzett kísérletek

III.1.1. Sejttenyésztés

Kísérleteimet humán primer sejttenyészeten (bőrfibroblaszt – human dermal fibroblast from adult – HDFa, Gibco, Life Technologies) és sejtvonalakon (hormontermelő mellékvesekéreg-karcinoma sejtvonal – NCI-H295R és méhnyakrák sejtvonal – HeLa, American Type Culture Collection – ATCC) végeztem a forgalmazó protokolljainak megfelelően. A HDFa sejtek tápfolyadékaként low serum growth supplement-tel (LSGS) kiegészített Medium 106 alkalmaztam (Gibco, Life Technologies). Az NCI-H295R sejtvonalat Dulbecco's modified Eagle's medium és Nutrient Mixture F-12 Ham 1:1 arányú keverékében (DMEM:F12) tartottam fenn (Sigma-Aldrich Chemical Co.), amelyet 6,25 ng/ml inzulin, 6,25 ng/ml transzferrin, 6,25 ng/ml nátrium-szelenit, 1,25 mg/ml szarvasmarha szérum albumin, 5,35 ng/ml linolénsav, 1% HEPES, 1% Penicillin-Streptomycin, 2,5% L-glutamin (Sigma-Aldrich Chemical Co.) és 2,5% Nu-Serum (BD Biosciences) hozzáadásával egészítettem ki (a koncentrációk a tápfolyadékban lévő végleges koncentrációkat jelölik). A HeLa sejtvonalat 10% magzati szarvasmarha szérummal és 1% antibiotikus-antimikotikus oldattal kiegészített DMEM:F12 tápfolyadékban tenyésztettem. Mindhárom sejtvonalat 37°C hőmérsékleten, párásított, 5% CO_2-t tartalmazó inkubátorban tenyészettem.

[3] idézet Nagy Szent Albert Domonkos-rendi szerzetes, tudós, egyházdoktor (1200 körül-1280) De Vegetabilibus et Plantis (1260 körül) című művéből

III.1.2. Áramlási citometriás módszerek

III.1.2.1. Sejtciklus vizsgálatok fluoreszcencia aktiválta sejtválogatással (FACS)

A HDFa, a NCI-H295R és a HeLa sejteket 150 cm^2-s tenyésztőedényben 90%-os konfluencia eléréséig tenyésztettem. Ezt követően tripszin-EDTA (tripszin és etilén-diamin-tetraecetsav elegye, Sigma-Aldrich Chemical Co.) segítségével a sejteket szuszpenzióba vontam, 5 ml PBS (phosphate-buffered saline) hozzáadásával egy alkalommal mostam és teljes tápfolyadékban szuszpendáltam. Bürker-kamrás sejtszámolást követően, a sejtszuszpenziót 1×10^6 sejt/ml töménységűre hígítottam és ml-ként 2 µl Vybrant DyeCycle Orange (Molecular Probes, Life Technologies) DNS-festéket adtam hozzá. Ez a festék sztöchiometrikusan képes jelölni a DNS-t a sejtek viablitásának megváltoztatása nélkül. Az inkubációt sötétben, 37°C hőmérsékleten, párásított, 5% CO_2-t tartalmazó inkubátorban 30 percig végeztem. Ezt követően 10 perces, 1000 rpm fordulatszámon történő centrifugálás után a sejteket Ca^{2+} and Mg^{2+} nélküli, 2% magzati borjúszérumot tartalmazó Hank's Balanced Salt oldatban szuszpendáltam (szort puffer), majd a szuszpenziót FACSAria III sejtválogató készülékkel (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) elemeztük és válogattuk szét. A szétválogatást megelőző elemzéshez 100 000 eseményt detektáltunk, majd a G1 (egyszeres DNS tartalom), S (egyszeres és kétszeres DNS tartalom közötti intenzitás) és G2 fázisoknak (kétszeres DNS tartalom) megfelelő sejtpopulációkat különválogattuk. A sejtválogatás maximum 30 percig tartott és minden szétválogatott populációt újabb vizsgálatnak vetettük alá újabb áramlási citométeres elemzéssel. Az adatokat BD FACSDiva v6.1.3 szoftverrel értékeltük ki (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A sejtválogatást követő újraelemzés után a sejteket centrifugáltam (10 perc, 1000 rpm) 1 ml jéghideg PBS hozzáadásával mostam, újra centrifugáltam (10 perc, 1000 rpm), majd QIAzol lízis regaensben vagy Western blot lízis pufferben reszuszpendáltam és -80°C-os hőmérsékleten tároltam az RNS, illetve a fehérje izolálásig.

A sejtciklus szerinti szétválogatás általunk végzett optimalizálása magában foglalta a szort puffer alkalmazását, a sejtválogatás felső időhatárának alkalmazását és az azonnali és minden sejtválogatást követően elvégzett FACS-újraelemzést.

III.1.2.2. Apoptózis és sejtciklus-disztribúciós vizsgálatok

A daganatellenes szerek hormontermelő NCI-H295R sejtek apoptózisára és sejtciklus fázisainak disztribúciójára gyakorolt hatását áramlási citometriával vizsgáltam. A kezelések után (melyeket részletesen a III.1.3. alfejezetben fejtek ki) a sejteket 1 ml PBS hozzáadásával mostam, centrifugáltam (5 perc, 1000 rpm), majd jéghideg 70%-os etanolban reszuszpendáltam és szobahőmérsékleten inkubáltam 20 percig. Ezt követően a mintákat -20°C-os hőmérsékleten legalább 30 percig tároltam. A mérést megelőzően a mintákat centrifugáltam (50 perc, 1000 rpm) és 100 ng/ml RNáz tartalmú extrakciós pufferben (200 mmol/l Na_2HPO_4, pH=7,8) reszuszpendálva 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltam. Ezt követően propídium-jodidot adtam a szuszpenzióhoz (végleges koncentráció: 10 ng/ml) és további 15 percet inkubáltam. A mintákat FACSCalibur áramlási citométeren (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) mértem, egy méréshez legalább 10 000 eseményt detektáltam. Az eredményeket Cell Quest Pro és Winlist szoftverek segítségével értékeltem ki. Kezelésenként három párhuzamos vizsgálatot végeztem.

III.1.3. Kezelések daganatellenes szerekkel

Az NCI-H295R hormontermelő mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonalon a gemcitabin (G6423, Sigma-Aldrich Chemical Co.), a mitotán (N12706, Sigma-Aldrich Chemical Co.) és a 9-cisz-retinsav (sc-205589A, Santa Cruz Biotechnology) önálló és kombinált adásának hatásait vizsgáltam. A különböző kezelésekhez 5×10^5 sejtet ültettem ki egy hatlyukú sejttenyésztőedény egyes lyukaiba (áramlási citometriás, gén- és

fehérjeexpressziós és hormontermelési mérésekhez), illetve 1×10^4 sejtet ültettem ki a 96-lyukú edénybe (proliferációs assay-hez). A gemcitabin, mitotán és 9-cisz-retinsav vegyszereket dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottam. A kiültetést követő 24. órában a sejteknek friss tápfolyadékot és azonos térfogatú DMSO-t adtam, amely utóbbi tartalmazta a kívánt antineoplasztikus szert (gemcitabin, mitotán, 9-cisz-retinsav, gemcitabin+mitotán, gemcitabin+9-cisz-retinsav, mitotán+9-cisz-retinsav, gemcitabin+mitotán+9-cisz-retinsav). A kontroll kezelések során csak az oldószer került alkalmazásra. Az alkalmazott koncentrációkat a szakirodalomban korábban megjelent ajánlások alapján választottam ki (gemcitabin és mitotán: 5×10^{-6} mol/dm^3; 9-cisz-retinsav: 5×10^{-5} mol/dm^3) [204-206]. A kezeléseket 24, 48 és 72 óráig alkalmaztam. Kezelésenként és időpontonként három (áramlási citometriás, génexpressziós és hormontermelési mérések), illetve nyolc (proliferációs assay) párhuzamos mérést végeztem.

III.1.4. Proliferációs assay

Az egyes antineoplasztikus szerek proliferációra gyakorolt hatását alamarBlue sejtproliferációs reagenssel (DAL1025, Thermo Fischer Scientific), 96-lyukú tenyésztőedényben vizsgáltam. A 0., 24., 48. és 72. óránban 10-10 µl alamarBlue reagenst adtam a tápfolyadékhoz, majd 180 percig inkubáltam 37°C hőmérsékleten párásított, sötét, 5% CO_2-t tartalmazó inkubátorban. Ezt követően a fluoreszcencia vizsgálatát Varioskan Flash spectral scanning reader műszeren végeztem (excitációs maximum: 560 nm, emissziós maximum 590 nm). Az egyes lyukakban mért értékeket az azonos lyukban korábban mért (0. órás) fluoreszcencia-intenzitására normalizáltam. Kezelésenként és időpontonként nyolc párhuzamos mérést végeztem.

III.1.5. Kortizol meghatározás az NCI-H295R sejtek tápfolyadékából

A kezeléseket követően a gemcitabin és a mitotán daganatellenes szerek kortizol termelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk folyadékkromatográfiát követő tömegspektrometriai

módszerrel (LC-MS). A sejtek tápfolyadékát lecentrifugáltam (10 perc, 1000 rpm), majd további felhasználásig -80°C-os hőmérsékleten tároltam. A mintaelőkészítés során a minta fehérjetartalmát kicsaptuk, majd lecentrifugáltuk (5 perc, 13500 rpm). Az LC-MS mérést Perkin-Elmer Flexar FX10 UHPLC-hez kapcsolt Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométeren végeztük. A kvantitatív elemzést a multiple reaction monitoring mode alkalmazásával végeztük.

III.2. RNS izolálás, gén- és miRNS expressziós vizsgálatok

III.2.1. RNS izolálás

A Qiazol lízis reagensben szuszpendált mintákat -80°C-os hőmérsékleten tároltam az RNS izolálásig. A teljes RNS izolálása miRNeasy Mini Kittel (Qiagen), a gyártó protokolljainak megfelelően történt. A Qiazol lízis reagensben lizált mintákhoz 140 µl kloroformot adtam, majd 15 percig centrifugáltam 4°C-n és 12 000 g fordulatszámon. A vizes fázist eltávolítva azt másfélszeres térfogatú 100%-os etanollal elegyítettem és kevertem össze. A mintát RNeasy Mini oszlopon centrifugáltam, majd – az átfolyó elegyet eltávolítva – egy alkalommal 700 µl RWT és két alkalommal 500 µl RPE mosófolyadékkal mostam. Az izolált RNS-t nukleáz-mentes vízben eluáltam. A kivont RNS koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific), integritását Agilent Bioanalyzer 2100 műszerrel (RNA 6000 Nano total RNA Kit, Agilent Technologies) határoztuk meg.

III.2.2. Génexpressziós microarray és útvonal elemzés

A génexpressziós microarray vizsgálatokhoz 100 ng szétválogatott G1, S és G2 fázisú HDFa, NCI-H295R és HeLa sejtekből származó RNS-t használtunk. Összesen 24

mintát vizsgáltam (2 vagy 3 biológiai párhuzamos mintát sejtenként és fázisonként) Agilent whole human genome 4x44K microarray lemezeken (Agilent Technologies) a gyártó protokolljainak megfelelően [198]. Az RNS-t Cy3 festékkel jelöltük és Low Input Quick Amp Labeling Kit segítségével amplifikáltuk, majd Agilent whole human genome 4x44K microarray lemezekre hibridizáltuk. A mosási fázis után Agilent DNA Microarray Scanner-en végeztük a jeldetektálást. Az adatok kiértékelése és statisztikai elemzése GeneSpring 12.6 szoftverrel (Agilent Technologies) történt. A szignifikáns Δ(G2-G1) génexpressziós változások (NCI-H295R és HeLa kísérletek) vagy a fold change>2 (az összehasonlítandó csoportok – jelen esetben a sejtciklus fázisai között – észlelt legalább kétszeres expresszióváltozások) Δ(G2-G1) génexpressziós változások (HDFa kísérlet) által érintett biológiai útvonalak elemzése az Ingenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity Systems) szoftver alkalmazásával (IPA core analysis) történt.

III.2.3. Nagy áteresztőképességű miRNS expressziós mérések

III.2.3.1. Microarray

A miRNS expressziós microarray vizsgálatokhoz 100 ng szétválogatott G1, S és G2 fázisú HDFa és NCI-H295R sejtekből származó RNS-t használtunk. Összesen 16 mintát vizsgáltunk (2 vagy 3 biológiai párhuzamos minta sejtenként és fázisonként) Agilent 8×15K Human miRNA Microarray Release 12.0. lemezeken (Agilent Technologies) a gyártó protokolljainak megfelelően [207]. Az RNS-t Cy3 festékkel jelöltük és Low Input Quick Amp Labeling Kit segítségével amplifikáltuk, majd Agilent 8×15K Human miRNA Microarray Release 12.0. lemezekre hibridizáltuk. A mosási fázis után Agilent DNA Microarray Scanner-en végeztük a jeldetektálást. Az adatok kiértékelése és statisztikai elemzése GeneSpring 12.6 szoftverrel (Agilent Technologies) történt.

III.2.3.2. Kvantitatív PCR alapú TaqMan Low Density Array (TLDA)

Összesen 8 darab szétválogatott G1 (2 minta), S (3 minta) és G2 (3 minta) fázisú NCI-H295R sejtekből izolált RNS mintát kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) alapú TaqMan Low Density Array kártyával (TLDA, Applied Biosystems, Life Technologies) is vizsgáltunk, a gyártó előírásainak megfelelően [208]. A mérés során mintánként 30 ng teljes RNS-ből kiindulva reverz transzkripciós és preamplifikációs lépések után TaqMan Human MicroRNA Array A és B kártyákon (TLDA, Applied Biosystems, Life Technologies) történt a miRNS expressziós profil meghatározása 7900HT RealTime PCR műszeren (Applied Biosystems, Life Technologies). A reverz transzkripció Megaplex reverz transzkripciós primerek (humán A és B pool) és TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit Multiscribe Reverse Transcriptase enzimének felhasználásával 7,5 µl végtérfogatban (hőprogram: 40 ciklus: 16°C 2 perc; 42°C 1 perc; 50°C 1 másodperc; majd 85°C 5 perc és végül 4°C-on tárolás) történt. A preamplifikáció PreAmp Master Mix és Megaplex PreAmp primerek (humán A és B pool) felhasználásával 25 µl végtérfogatban (hőprogram: 95°C 10 perc, 55°C 2 perc, 72°C 2 perc, majd 12 ciklus: 95°C 15 másodperc; 60°C 4 perc; majd 99,9^{o}C 10 perc és végül 4°C-on tárolás) történt. A kvantitatív, valós idejű PCR TaqMan Universal PCR Master Mix, No AmpErase, UNG felhasználásával TaqMan Human MicroRNA A és B Array kártyáin végeztük. A TaqMan Human MicroRNA A és B Array kártyáin összesen 754 miRNS-re specifikus próba található.

III.2.3.3. Újgenerációs szekvenálással meghatározott miRNS expresszió

Összesen 9 minta (2-2-2 G1, S és G2 fázisú HeLa sejtekből és 1-1-1 G1, S és G2 fázisú NCI-H295R sejtekből származó RNS, mintánként 300 ng RNS) került vizsgálatra. A kis RNS szekvenálás Illumina Small RNA Sequencing platformon történt Hong Kongban (BGI Tech Solutions, Tai Po, Hong Kong). A könyvtárkészítés TruSeq Small RNA library preparation kittel történt (Illumina, San Diego, CA, USA). 50 bázispár single end read szekvenálást végeztünk Illumina HiSeq2000 platformon, majd 10 Mb tiszta read elemzése történt (BGI Tech Solutions, Tai Po, Hong Kong).

III.2.4. Validálás egyedi kvantitatív PCR mérésekkel

A génexpressziós microarray eredményeinek megerősítséhez mintánként 30 ng RNS-t írtam át cDNS-re SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Applied Biosystems, Life Technologies) segítségével. Az átíráshoz Superscript Enzyme Mixet alkalmaztam 20 µl végtérfogatban (hőprogram: 25°C 10 perc; 42°C 60 perc; 85°C 5 perc; végül 4°C-n tárolás). A kiválasztott gének expressziójának méréséhez TaqMan Gene Expression Assay-eket (katalógusszám: 4331182; *ARHGAP11A* probe ID: Hs00207575_m1; *ASPM* probe ID: Hs00411505_m1; *KIF14* probe ID: Hs00208408_m1; *GTSE1* probe ID: Hs00212681_m1; *CDCA2* probe ID: Hs00299250_m1; *SKA1* probe ID: Hs00179514_m1; *CCNA2* probe ID: Hs00996788_m1; *AURKA* probe ID: Hs01582072_m1; *AURKB* probe ID: Hs00945858_g1; *CDK1* probe ID: Hs00938777_m1; *RRM2* probe ID: Hs00357247_g1; *ACTB* probe ID: Hs99999903_m1) használtam (Applied Biosystems, Life Technologies). A qRT-PCR reakciót TaqMan Fast Universal Master Mix alkalmazásával, 40× hígított primerekkel, 15 µl végtérfogatban (hőprogram: 95°C 20 másodperc, majd 50 ciklus: 95°C 3 másodperc; 60°C 30 másodperc) végeztem.

A különböző nagy áteresztőképességű miRNS expressziós mérések validálásához 5 ng RNS írtam át cDNS-re TaqMan microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems by Life Technologies) segítségével. Az átíráshoz Multiscribe reverz transzkriptázt és miRNS-specifikus reverz transzkripciós primereket alkalmaztam 10 µl végtérfogatban (hőprogram: 16°C 30 perc; 42°C 30 perc; 85°C 5 perc; majd 4°C-n tárolás). A miRNS expressziót TaqMan MicroRNA Expression Assay-ekkel (katalógusszám: 4427975; hsa-miR-10b probe ID: 002218; hsa-miR-128a probe ID: 002216; hsa-let-7g probe ID: 002282; hsa-let-7a probe ID: 000377; hsa-let-7e probe ID: 002406; hsa-let-7f probe ID: 000382; hsa-let-7i probe ID: 002221; hsa-miR-21 probe ID: 000397; hsa-miR-22 probe ID: 000398; hsa-miR-222 probe ID: 002276; hsa-miR-16 probe ID: 000391; hsa-miR-15a probe ID: 000389; hsa-miR-503 probe ID: 001048; hsa-miR-202 probe ID: 002363; hsa-miR-132 probe ID: 000457; hsa-miR-577 probe ID: 002675; hsa-miR-24-2* probe ID: 002441 és RNU48 probe ID: 001006) mértem (Applied Biosystems, Life Technologies). A qRT-PCR reakciót TaqMan Fast Universal Master Mix alkalmazásával,

30× hígított primerekkel, 15 µl végtérfogatban (hőprogram: 95°C 20 másodperc, majd 50 ciklus: 95°C 3 másodperc; 60°C 30 másodperc) végeztem.

A qRT-PCR méréseket 7500 Fast Real-time PCR műszeren végeztem (Applied Biosystems, Life Technologies), a gyártó protokolljainak megfelelően. Minden mérést három biológiai és két (génexpressziós mérések), illetve három (miRNS expressziós mérések) technikai párhuzamossal végeztem el. A génexpressziót az ACTB (β-aktin), a miRNS expressziót az RNU48 relatív expressziójára normalizáltam (ΔCt). Az expressziós eredményeket a fold change$_{\Delta S\text{-}G1} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\Delta Ct(S\text{-fázis}) - \Delta Ct(G1\text{-fázis})]}$, a fold change$_{\Delta G2\text{-}G1} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\Delta Ct(G2\text{-fázis}) - \Delta Ct(G1\text{-fázis})]}$ és a fold change$_{\Delta kezelt\text{-}kontroll} = 2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[\Delta Ct(kezelt) - \Delta Ct(kontroll)]}$ formulákkal kvantifikáltam, ahol ΔCt az egyes csoportokban a target és referencia gének és miRNS-ek küszöbciklusainak különbségét, fold change a két csoport közötti expressziós szintek arányát jelölik [208].

III.2.5. A sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikájának összehasonlítása primer, nem-transzformált és tumoros sejttenyészetekben

Százhuszonnégy, mind a HDFa, mind a HeLa sejtben sejtciklusfüggő expressziójú gén átlagos kifejeződésének fázisonkénti, sejttípusok közötti összehasonlításával azt vizsgáltam, hogy ezen, univerzális sejtciklus-gének kifejeződésében van-e különbség a tumoros és nem tumoros sejtek között. Ezen vizsgálathoz a három microarray vizsgálat adatait újraelemeztem és közösen normalizáltam. A fenti 124 gén esetében vizsgáltam azt is, hogy az egyes fázisok között (G1/S, S/G2 és G1/G2) – abszolút értékben – átlagosan hányszoros expresszió-változások történnek. Mindkét vizsgálatot ezután – ebből a 124 génből – 10 kiválasztott gén esetében qRT-PCR eredmények alapján is elvégeztem.

III.3. Fehérje izolálás és Western blot vizsgálatok

A Western blot lízis pufferben szuszpendált és -80°C-os hőmérsékleten tárolt mintákat jégen felolvasztottam, ultrahanggal szonikáltam, 30 percig inkubáltam, majd centrifugáltam (13000 rpm, 2°C, 15 perc). Az izolált fehérje koncentrációját Bradford módszere szerint [209], spektrofotometriai méréssel határoztam meg Varioskan Flash spectral scanning reader műszeren (Thermo Scientific) 595 nm-en.

Ezt követően a mintákahoz β-merkaptoetanollal kiegészített Laemli-puffert adtam és 99°C-os hőmérsékleten inkubáltam 5 percig. Azonos mennyiségű fehérjét tartalmazó mintát helyeztem a 10%-os poliakrilamid gél zsebeibe, majd Mini Protean elektroforézis kádban (Bio-Rad) méretük alapján választottam szét a fehérjéket. Ezt követően egy éjszakányi 4°C-os hőmérsékleten történő blottolás során polivinildién-fluorid (PVDF) membránra vittem át a mintát, amelynek sikerességét Ponceau festéssel igazoltam. A membránokat a blokkolást követően elsődleges nyúl anti-foszfo-CDC-2 (Tyr15) antitesttel (Cell Signaling Technology, katalógusszám: 9111, hígítás: 1:500) vagy kecske anti-RRM2 antitesttel (Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-10846, hígítás: 1:200) inkubáltam egy éjszakán keresztül 4°C-os hőmérsékleten, gyenge rázás mellett. A mosási fázisok után 60 percig inkubáltam anti-nyúl (Cell Signaling Technology, katalógusszám: 7074, hígítás: 1:2000) vagy anti-kecske (DAKO, katalógusszám: P0449, hígítás: 1:1000) másodlagos, tormaperoxidáz-konjugált antitestekkel. A mosási fázisok után SuperSignal West Pico kemilumineszcens szubsztrát (Thermo Scientific) segítségével vizualizáltam a jelet Kodak Image Station 4000MM műszeren. A detektálást követően 45 percig inkubáltam a membránokat vetkőztető pufferben (0,2 mol/dm^{3} glicin, 0,1% nátrium-dodecil-szulfát, 0,1% Tween-20, pH=2,2), majd újabb blokkolást követően a betöltést ellenőrzendő, nyúl anti-β-aktin antitesttel (Cell Signaling Technology, katalógusszám: 4967, hígítás: 1:2000) inkubáltam a membránt és az ismételt előhívó lépések után detektáltam a β-aktin mennyiségét.

III.4. Korábbi microarray tanulmányok *in silico* elemzése

III.4.1. A sejtciklus szerinti sejtválogatás eredményeinek összehasonlítása a korábbi, szinkronizáció-alapú mérésekkel

Bar-Joseph és munkatársai primer humán fibroblasztok szinkronizációs módszerrel vizsgált sejtciklusfüggő génexpressziójának microarray adatait a European Bioinformatics Institute Array Express adatbázisából (http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/experiments/E-TABM-263/) töltöttem le [75]. Whitfield és munkatársai hasonló, HeLa sejteken végzett vizsgálatának eredményeit a http://genome-www.stanford.edu/Human-CellCycle/HeLa/ honlapról töltöttem le [74]. Az *in silico* elemzés során a sejtciklus fázismegoszlását a szinkronizálás óta eltelt idő függvényében reprezentáló ábrák alapján választottam ki a leghomogénebb G1, S és G2 fázisú mintákat, amelyek génexpressziós különbségeit (Δ_{G2-G1}) összehasonlítottam a sejtciklus szerinti sejtválogatási kísérleteimben talált különbségekkel. A vizsgálatot a sejtciklus szerinti szétválogatási kísérleteimben szignifikánsan változó (HeLa), vagy fold change>2 változást mutató (primer fibroblaszt) génekre korlátoztam.

Emellett – HeLa sejtek esetében – összehasonlítást végeztem a csak szinkronizálás, illetve a csak sejtciklus szerinti szétválogatással kapott, a sejtciklus fázisai között szignifikáns expresszió-különbségeket mutató, valamint ezek metszetébe tartozó (közös) gének által érintett biológiai folyamatok tekintetében. A fenti vizsgálatomhoz a szabadon elérhető DAVID Bioinformatics Resources 6.7 verzióját (https://david.ncifcrf.gov/) használtam. A betöltött génlisták a HeLa sejtciklus szerinti sejtválogatás módszerre specifikus (HeLa SZORT \ HeLa szinkr.), a HeLa szinkronizálás módszerre specifikus (HeLa szinkr. \ HeLa SZORT) és a mindkét vizsgálatban átfedő (HeLa SZORT ∩ HeLa szinkr.) sejtciklusfüggő kifejeződésű gének listái voltak. A Bonferroni-korrigált <0,05 p-értékű találatokat tartottam szignifikánsnak.

III.4.2. Az NCI-H295R sejtciklusfüggő génexpressziós programjának összehasonlítása az ACC malignitás mintázatával

Az ACC malignitás mintázatának meghatározásához három korábbi microarray tanulmány (elérhetőségek: European Bioinformatics Institute Array Express adatbázis ID: E-TABM-311 és National Center for Biotechnology Information's Gene Expression Omnibus ID: GSE10927 és GSE14922) [196-198] kiértékelt adatait [199] elemeztem újra. Azokat a géneket határoztam meg a malignitás mintázat tagjaiként, amelyek legalább egy microarray tanulmányban legalább fold change>2 szignifikáns különbséget mutattak ACC és ACA szövetek összehasonlításában. Ezt a listát hasonlítottam össze az NCI-H295R sejtciklus szerinti sejtválogatás vizsgálatában az S és G1 fázisok között legalább fold change>2 szignifikáns expressziós különbséget mutató gének halmazával. Vizsgálatom a mindkét listában előforduló és – ACC/ACA és S/G1 összehasonlításban – azonos irányba változó gének aznosítását célozta.

III.5. ACC mintákon végzett immunhisztokémiai vizsgálatok

A ribonukleotid reduktáz 2-s alegységének (RRM2) a mellékvesekéreg-karcinómák proliferációs aktivitásának függvényében való kifejeződését 12 humán mellékvesekéreg-karcinóma szövetmintán vizsgáltuk. A vizsgálatra kiválasztott, a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében őrzött, formalinban fixált, paraffinba ágyazott daganatok korábbi, rutin szövettani diagnózisa megerősítette a mellékvesekéreg-karcinóma diagnózisát. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során a Ki-67 proliferációs marker és az RRM2 kifejeződését vizsgáltuk. A daganatos blokkokból 4 μm vastagságú metszeteket vágtunk, amelyeket deparaffináltunk és rehidráltunk. Az endogén peroxidáz gátlás céljából 10%-os H_2O_2-t tartalmazó metanol oldatban inkubáltuk a metszeteket 20 percig. Ezt követően, az antigének feltárásához a mintákat 3 percig inkubáltuk TRS-ben (target retrieval solution; összetétele: 10 mmol/dm^3 Tris, 1 mmol/dm^3 EDTA, 0,05% Tween 20, pH = 9) 100°C-os hőmérsékleten. A Ki-67 kifejeződését a hisztopatológiai

diagnosztikában alkalmazott módszerrel, a Novolink Polymer Detection rendszerrel (Novocastra Laboratories) vizsgáltuk. A nem-specifikus kötődést 10 perces Novocastra Protein Blockkal történő inkubációval előztük meg. A kimutatáshoz nyúl anti-Ki-67 antitesttel történő, egy éjszakán át tartó inkubációt végeztünk (SP6 klón, katalógusszám: RM-9106, Thermo Scientific, hígítás: 1:100) 4°C-os hőmérsékleten. Mosást követően, az elsődleges antitestek detektálására NovoLink polymerrel történő inkubálást végeztünk (30 perc, szobahőmérséklet). Az 10 perces előhívást DAB Chromogen Kit (Biocare Medical, katalógusszám: DB801R) alkalmazásával végeztük.

Az RRM2 kimutatásához – az előzőekkel megegyező mintaelőkészítést követően – a nem-specifikus blokkolást 5% szarvasmarha szérum albuminnal végeztük (20 perc, szobahőmérséklet). A szövetek endogén avidin és biotin kötőhelyeinek blokkolása az avidin/biotin blocking kit alkalmazásával (Vector Laboratories, katalógusszám: SP-2001, 15-15 perc, szobahő) történt. Ezt követően, kecske anti-RRM2 antitesttel inkubáltuk a mintákat egy éjszakán keresztül (Santa Cruz Biotechnology, katalógusszám: sc-10846, hígítás: 1:100, hőmérséklet: 4°C). Ezután biotinilált nyúl anti-kecske másodlagos antitesttel inkubáltuk a mintákat (Dako Cytomation, katalógusszám: E0466, hígítás: 1:200) szobahőmérsékleten, 60 percig. A jelamplifikációs lépést (VECTASTAIN Elite ABC Kit, Vector Laboratories, katalógusszám: PK-6100) követően, DAB Chromogen Kit (Biocare Medical, DB801R) alkalmazásával (10 perc) vizualizáltuk az immunreakciót. Az elkészült metszeteket nagyfelbontású scanner (Pannoramic Scan, 3DHISTECH Kft.) segítségével digitalizáltuk és a Pannoramic Viewer 1.15 szoftver (3DHISTECH Kft.) segítségével elemeztük.

Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelését és a módosított Weiss score [210] meghatározását a mellékvesekéreg patológiájában tapasztalt patológus (Dr. Micsik Tamás) végezte. Az immunhisztokémiai reakciók kiértékelését emellett még két további független elemző is elvégezte. A Ki-67 index meghatározásánál legalább 1000 sejt leszámolását követően, a pozitívan festődő sejtek arányát adtam meg. Az RRM2 festődésének jellemzéséhez egy korábban sikeresen alkalmazott score rendszert használtunk [211].

Legalább 1000 sejt vizsgálata során az egyes sejtek festődésének intenzitását külön-külön jellemeztük: 0 – negatív, 1 – enyhe, 2 – közepes, 3 – erős festődés, majd az RRM2 score = 1x+2y+3z egyenlet alapján számszerűsítettük az RRM2 festődést, ahol x, y és z a gyengén, közepesen és erősen festődő sejtek aránya [211].

III.6. Statisztikai elemzés

Az mRNS és miRNS expressziós microarray mérések kiértékelését GeneSpring 12.6 (Agilent Technologies) szoftverrel, egyutas ANOVA elemzést követően Tukey-féle Honestly Significant Difference poszt-hoc teszt és Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával végeztem. A TLDA vizsgálatok kiértékelése Real-Time StatMinerTM (Integromics, Granada, Spanyolország) szoftver felhasználásával, egyutas ANOVA módszerrel történt. Az újgenerációs szekvenálási eredmények kiértékelését edgeR programcsomag (3.8.6 verzió) használatával, exact T-tesztet követő Benjamini-Hochberg korrekció alkalmazásával végeztük. Az univerzális sejtciklus-gének különböző fázisokban való expressziójának, illetve a fázisok közötti dinamikus expresszió-változásainak összehasonlításához Student-féle T-próbát alkalmaztam. Az egyedi qRT-PCR validációs vizsgálatok eredményeinek kiértékelése során az egyes csoportok közötti összehasonlításra Student-féle T-tesztet alkalmaztam. A korrelációs vizsgálatokra Pearson- és Spearman-féle módszereket használtam. A sejttenyészeteken végzett kezelések hatását a proliferációra, a médium kortizol koncentrációra, az apoptózis arányára, valamint a sejtciklus fázisainak eloszlására vonatkozóan Student-féle T-teszttel vizsgáltam.

Minden összehasonlításban a p-érték $< 0,05$ eredményt fogadtam el statisztikailag szignifikánsnak.

IV. Eredmények

”... a scholar’s positive contribution is measured by the sum of the original data that he contributes. Hypotheses come and go, but data remain.”[4]

IV.1. A sejtciklusfüggő génexpresszió vizsgálata

IV.1.1. Az optimalizált sejtciklus szerinti sejtválogatás sikeresen szétválasztotta a sejtciklus különböző fázisaiban lévő populációkat

Az optimalizált sejtciklus szerinti sejtválogatás sikeresen és nagy tisztasággal izolálta a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejteket HDFa, NCI-H295R és HeLa sejtek esetében egyaránt (3. táblázat és 4. ábra). Az egyes fázisok specifikus kiválogatása a különböző sejttípusokban változó hatékonyságú volt, de minden esetben meghaladta a korábbi szinkronizálási módszerek hatásfokát (**3. táblázat**). Minden sejttípusban a G1 fázis izolálása sikerült a legnagyobb tisztasággal. NCI-H295R és HeLa sejtek esetén az S fázisú populációk tisztasága meghaladta a G2 fázisú populációk tisztaságát.

[4] idézet Santiago Ramón y Cajal (1852-1934) Nobel díjas (1906) spanyol patológus, neurológus Advice to a Young Investigator (MIT Press, 1999, fordította: Neely Swanson és Larry W. Swanson) című művéből

3. táblázat – A sejtciklus szerint szétválogatott populációk jellemzése a különböző sejttípusokban *– A sejtciklus szerinti sejtválogatás tisztaságát az alapján határoztuk meg, hogy a szétválogatott populációk ismételt FACS elemzése során a sejtek mekkora aránya bírt az adott fázisnak megfelelő fluoreszcencia intenzitással. A táblázatokban a HDFa (A), NCI-H295R (B) és HeLa (C) sejtek esetében négy biológiai párhuzamos mérés eredményei szerepelnek. Az adatokat átlag ± standard deviáció formában adtam meg. Táblázat forrása:[212]*

A

	HDFa		
	tisztaság (%)	**szétválogatott sejtek (×1000 sejt)**	**RNS koncentráció (ng/uL)**
G1	99,5 ± 0,550	58,0 ± 10,5	3,25 ± 1,26
S	72,9 ± 5,89	42,5 ± 6,24	5,75 ± 1,50
G2	85,7 ± 3,80	58,5 ± 11,4	8,50 ± 3,87

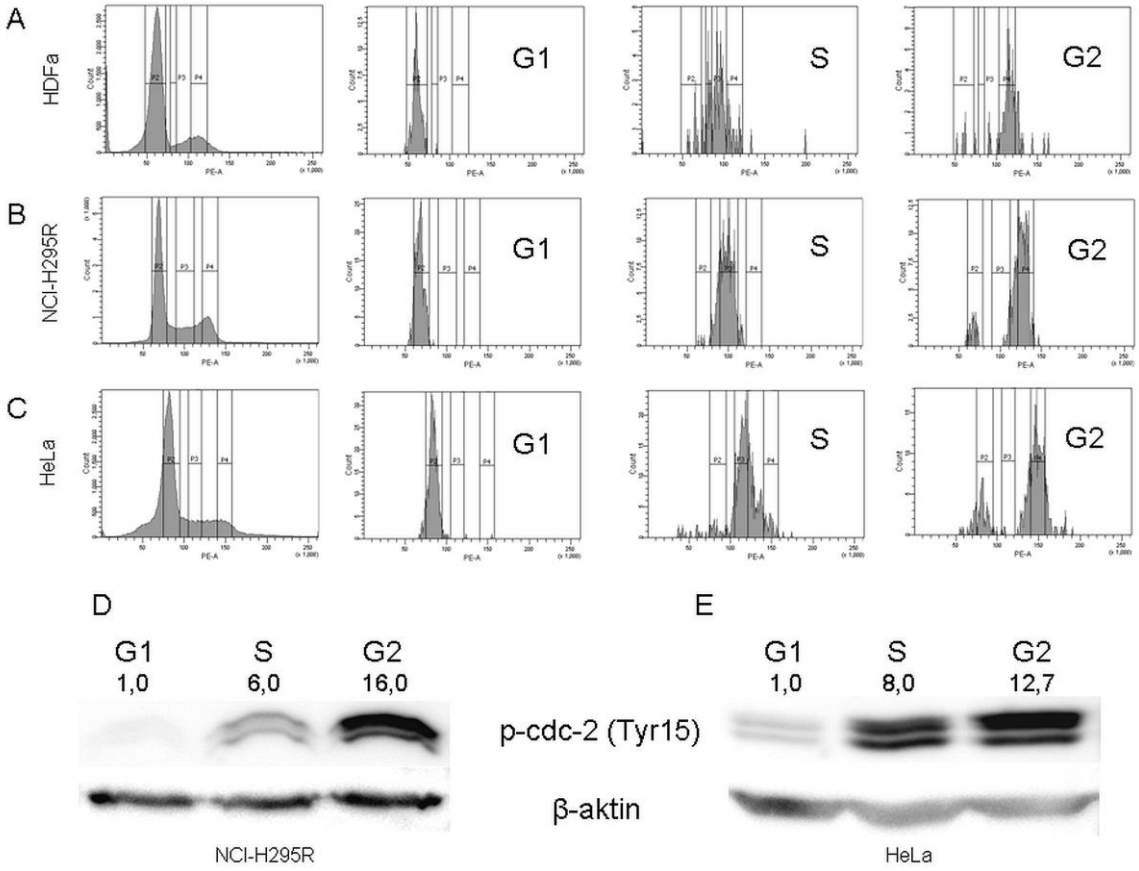
B

	NCI-H295R		
	tisztaság (%)	**szétválogatott sejtek (×1000 sejt)**	**RNS koncentráció (ng/uL)**
G1	96,9 ± 1,70	250 ± 57,7	5,50 ± 1,29
S	93,4 ± 3,82	205 ± 74,1	6,00 ± 2,58
G2	80,7 ± 2,78	225 ± 50,0	8,25 ± 1,26

C

	HeLa		
	tisztaság (%)	**szétválogatott sejtek (×1000 sejt)**	**RNS koncentráció (ng/uL)**
G1	96,4 ± 0,826	350 ± 173	41,0 ± 20,5
S	90,8 ± 4,25	200 ± 0,00	39,3 ± 11,8
G2	72,3 ± 4,61	200 ± 0,00	48,3 ± 16,2

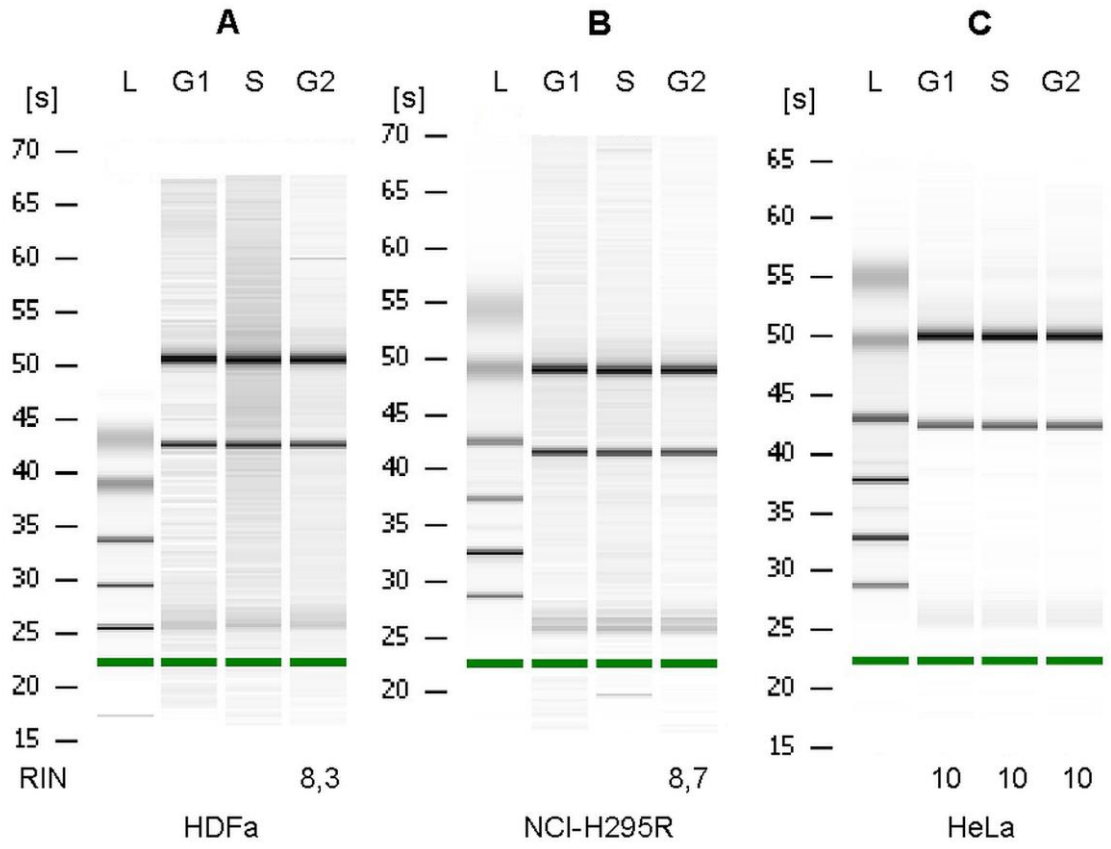
A cdc-2 fehérje Tyr15 foszforiláltsága szigorúan szabályozott a sejtciklus folyamatában; a foszforiláltság folyamatosan fokozódik a sejtciklus előrehaladtával a G2-fázisig, a mitózisba lépéshez ugyanakkor defoszforilált állapot szükséges [21]. Ez alapján a foszforiláltság szintje a sejtciklus aktuális állapotának indikátora. A leválogatott populációkon végzett Western blot vizsgálatok sikeresen megerősítették a sejtciklus szerinti sejtválogatás módszer eredményességét fehérje szinten is (**4. ábra**).



4. ábra - A sejtciklus szerinti sejtválogatás és validálása *- A-C: Reprezentatív sejtválogatás előtti (első hisztogram) és utáni (G1-fázis: második, S-fázis: harmadik, G2-fázis: negyedik hisztogramok) FACS elemzések HDFa (A), NCI-H295R (B) és HeLa (C) sejteken. D-E: A p-cdc-2 (Tyr15) Western blot elemzés megerősíti a különböző fázisok sikeres szegregációját NCI-H295R (D) és HeLa (E) sejteken. A p-cdc-2 relatív denzitását először β–aktinra, majd G1 fázisra normalizáltam és ábrázoltam a D és E paneleken. Ábra forrása: [212]*

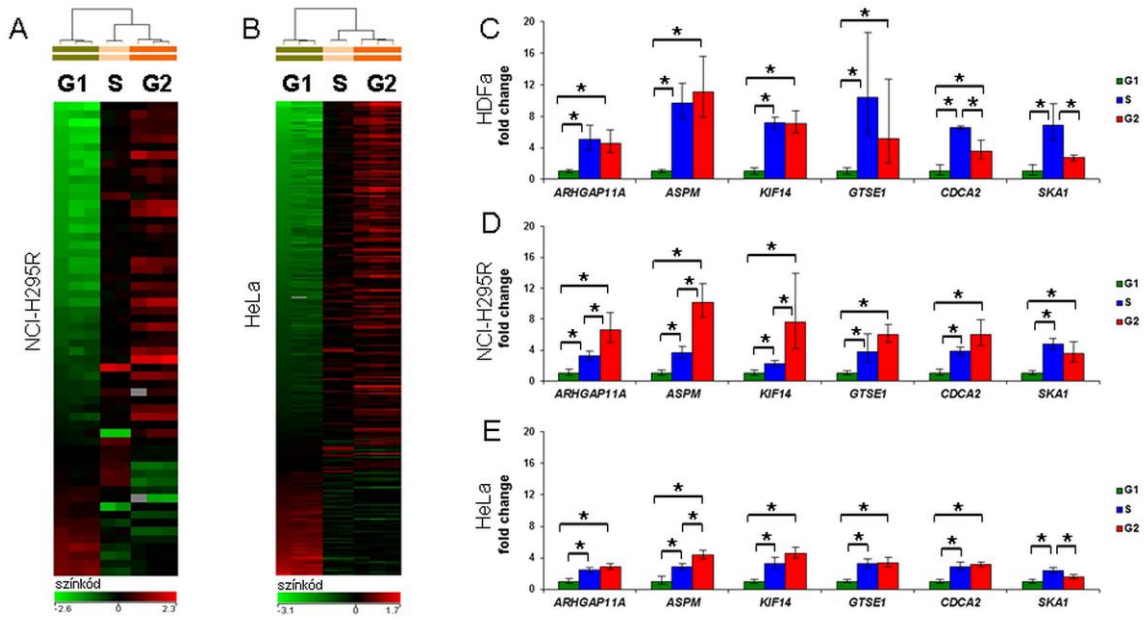
IV.1.2. Sejtciklusfüggő expressziójú gének azonosítása a különböző sejtciklus fázisú sejtpopulációk összehasonlító génexpressziós microarray vizsgálatával

A különböző fázisú sejtpopulációkból izolált RNS minősége és mennyisége megfelelő volt nagy átresztőképességű microarray vizsgálatok elvégzéséhez (**3. táblázat és 5. ábra**).



5. ábra – Az izolált RNS minőségi jellemzése sejttípusonként és a sejtciklus fázisaiként *- A reprezentatív Bioanalyzer 2100 kapilláris gélelekroforézis képei HDFa (A), NCI-H295R (B) és HeLa (C) sejtekből kivont teljes RNS esetében. Az ábrán a 10 ng/µl koncentráció feletti töménység esetén számított, az RNS integritását jellemző RIN (RNA integrity number) is feltüntetésre került. L – létra. Ábra forrása: [212]*

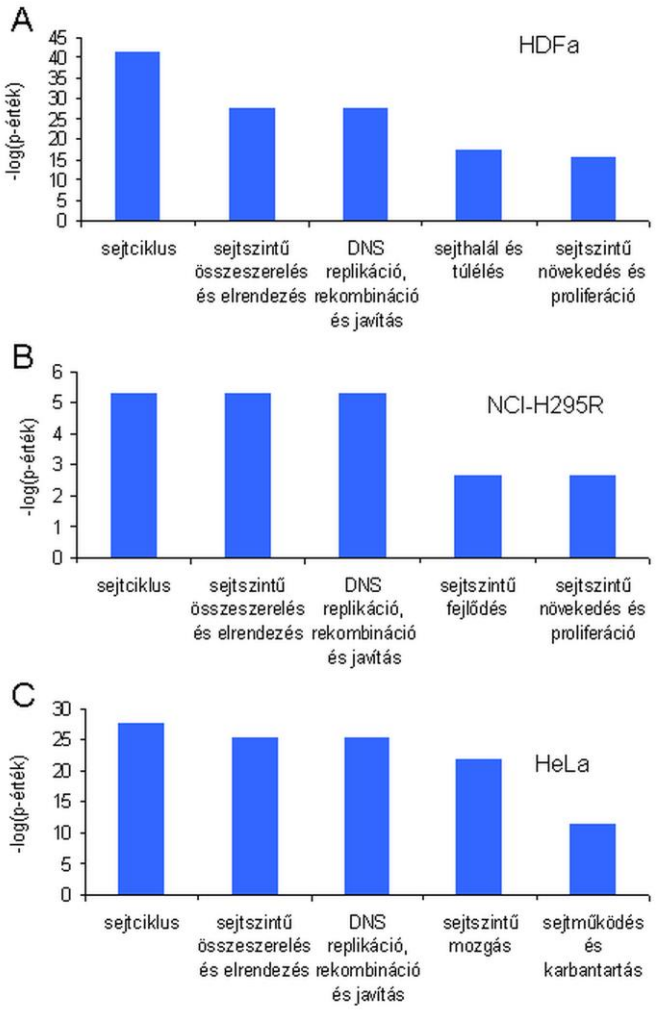
A génexpressziós microarray vizsgálatok NCI-H295R sejtvonal esetén 55, míg HeLa sejtek esetében 252 szignifikánsan sejtciklusfüggő kifejeződésű transzkriptumot igazoltak (**6. ábra és 1. és 2. kiegészítő táblázatok**). A sejtciklusfüggő expressziójú gének többségének mRNS szintje a sejtciklus előrehaladtával egyre fokozódik.



6. ábra - A sejtciklusfüggő transzkriptumok azonosítása microarray módszerrel és megerősítése qRT-PCR módszerrel – *A és B: a szignifikánsan sejtciklusfüggő kifejeződésű gének hőtérképei NCI-H295R (A) és HeLa (B) sejtekben. A hőtérképen szereplő gének megnevezése az 1. és 2. kiegészítő táblázatban található. A hőtérképek felett feltüntettem a sejtciklus fázisok hierarchikus csoportosítását is. Panel C-E: A microarray elemzés alapján kiválasztott 6 gén sejtciklusfüggő expressziójának megerősítése HDFa (C), NCI-H295R (D) és HeLa (E) sejteken.* $p<0,05$. Ábra forrása: [212]*

A hierarchikus csoportosítás kimutatta, hogy ezen gének S és G2 fázisokban észlelt expressziós szintjei közelebb állnak egyáshoz, mint a G1 fázisban mért kifejeződési szintekhez. HDFa sejtekben a rigorózus statisztikai elemzés nem eredményezett szignifikánsan eltérő kifejeződésű gént. Ugyanakkor, a HDFa sejtekben a különböző fázisok közötti összehasonlítások legalább egyikében legalább kétszeres expresszió-változást mutató (FC2 génlista) gének útvonal-elemzése a sejtciklussal szorosan összefüggő folyamatok detektálásával igazolja, hogy ezeknek az expresszió-változásoknak szerepük van a sejtciklus szabályozásában (**7. ábra**). Az FC2 génlistába tartozó gének a sejtciklus során észlelt expresszió-változásai szignifikánsan korrelálnak a korábbi, szinkronizáláson alapuló módszerekkel kapott sejtciklusfüggő transzkripciós programmal (**8. ábra**).

A microarray vizsgálatok alapján kiválasztott hat gén sejtciklusfüggő expresszióját sikeresen megerősítettem qRT-PCR vizsgálattal mindhárom vizsgált sejttípusban (**6. ábra**).

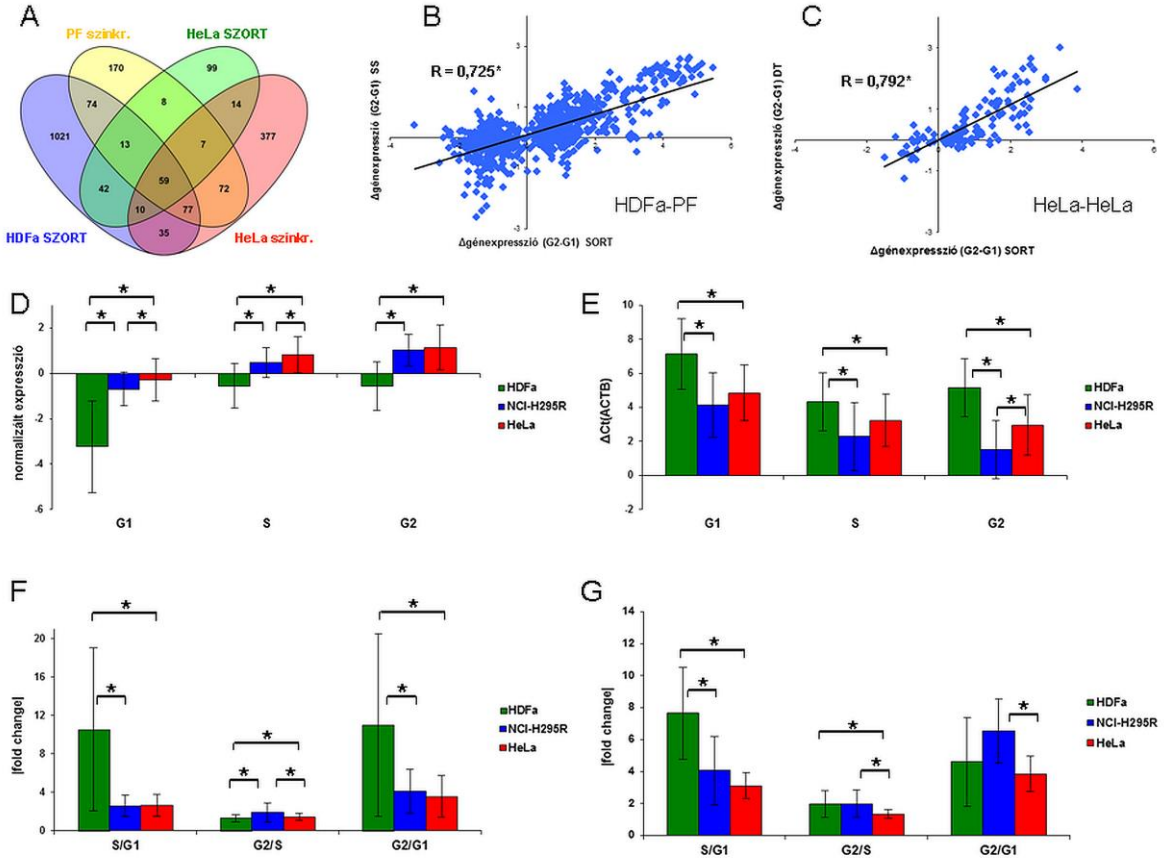


7. ábra – A sejtciklusfüggő expressziót mutató gének által befolyásolt jelátviteli útvonalak vizsgálata – *Az ábrán az öt legalacsonyabb p-értékkel jellemzett útvonal került feltüntetésre HDFa (A), NCI-H295R (B) és HeLa (C) sejtekben. p-érték=0,05 -log(p-érték)=1,301-nek felel meg. Ábra forrása: [212]*

A három vizsgált sejttípus sejtciklusfüggő transzkripciós programján végzett bioinformatikai útvonal-elemzés mindhárom esetben a sejtciklussal szorosan összefüggő biológiai útvonalakat verifikált. Mindhárom esetben a "sejtciklus", a "sejtszintű összeszerelés és elrendezés" valamint a "DNS replikáció, rekombináció és javítás" voltak a leginkább érintett útvonalak (**7. ábra**).

IV.1.3. A sejtciklus szerinti sejtválogatás módszerrel kapott sejtciklusfüggő transzkripciós program összehasonlítása a korábbi szinkronizáláson alapuló mérések eredményeivel

Mivel korábban számos kifogást fogalmaztak meg a szinkronizálási módszerek sejtciklusfüggő transzkripciós program vizsgálatában való alkalmazásával kapcsolatban (részletesen kifejtve a Bevezetés fejezetben) [80, 83, 135], a következőkben sejttípusonként összehasonlítottam a sejtciklus szerinti sejtválogatás módszerrel nyert eredményeket a korábbi, szinkronizálási módszerekkel nyert eredményekkel. Az összehasonlítás során jelentős átfedést találtam a sejtciklus szerinti sejtválogatás és a szinkronizálási módszereken alapuló eredmények között, valamint – mind primer fibroblaszt, mind HeLa sejtek esetében – szignifikáns korrelációt találtam a két módszer eredményei között (**8. ábra**).



8. ábra – A szinkronizálás és a sejtciklus szerinti sejtválogatás eredményeinek összehasonlítása a sejtciklusfüggő transzkripciós program tekintetében és a sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikájának összehasonlítása primer, nem-transzformált és tumoros sejtekben – *Sejtciklusfüggő expressziójú gének Venn diagramja primer fibroblaszt (sejtciklus szerinti sejtválogatás – HDFa SZORT és szinkronizáláson alapuló korábbi eredmények – PF szinkr. [75]) és HeLa (sejtciklus szerinti sejtválogatás – HeLa SZORT és szinkronizáláson alapuló korábbi eredmények – HeLa szinkr. [74]) sejteken (A). Pearson-féle korrelációs elemzés a szinkronizálással és a sejtciklus szerinti sejtválogatással detektált génexpressziós különbségek összehasonlítására primer humán fibroblaszt (B; szinkronizálási módszer: szérum éheztetés) és HeLa (C, szinkronizálási módszer: dupla timidin blokk) sejteken. D-E: A sejtciklusfüggő gének normalizált expressziós szintjei az egyes fázisokban és sejttípusokban microarray (D) és qRT-PCR (E) eredmények alapján. F-G: A sejtciklusfüggő gének expresziós szintjei változásainak nagysága S/G1, G2/S és G2/G1 fázisok között a különböző sejttípusokban microarray (F) és qRT-PCR (G) eredmények alapján. Az adatok átlag ± standard deviáció formában vannak ábrázolva. Rövidítések: DT – dupla timidin blokk, SS – szérum éheztetés, PF – primer fibroblaszt.* $p<0,05$. *Ábra forrása: [212]*

Emellett, HeLa sejtekben vizsgáltam a sejtciklusfüggő transzkripciós program szinkronizálásra (HeLa szinkr. \ HeLa SZORT), sejtciklus szerinti sejtválogatásra (HeLa

SZORT \ HeLa szinkr.) specifikus, valamint a fenti két halmaz metszetéhez tartozó (HeLa SZORT ∩ HeLa szinkr. – a halmazelméleti műveletek a 8. ábra A paneljén ábrázolt Venn diagramon értendőek) gének által meghatározott biológiai folyamatokat (**4. táblázat**).

4. táblázat – A HeLa sejt sejtciklusfüggő transzkripciós programja által befolyásolt biológiai útvonalak vizsgálata *– A DAVID program alkalmazásával vizsgáltuk a HeLa SZORT \ HeLa szinkr. (A), a HeLa szinkr. \ HeLa SZORT (B), valamint a HeLa SZORT ∩ HeLa szinkr. (C) halmazokhoz tartozó gének által érintett biológiai útvonalakat. A táblázatban a Bonferroni-korrigált $p < 0,05$ értékű biológiai folyamatokat tüntettem fel. Az A és B panelen* **kiemelve** *ábrázoltam a C panelen nem szereplő, a vizsgált módszerre specifikus biológiai folyamatokat. Táblázat forrása:[212]*

A – eredmények a HeLa SZORT csoportra specifikus génekre

GO (Gene Ontology) biológiai folyamat azonosítója és neve		*érintett gének száma*	*p-érték*	*Bonferroni-korrigált p-érték*
GO:0007049	sejtciklus	19	$4,62\times10^{-6}$	$3,32\times10^{-3}$
GO:0000280	sejtmag osztódása	10	$1,99\times10^{-5}$	$1,42\times10^{-2}$
GO:0007067	mitózis	10	$1,99\times10^{-5}$	$1,42\times10^{-2}$
GO:0000087	sejtciklus M-fázisa	10	$2,29\times10^{-5}$	$1,64\times10^{-2}$
GO:0048285	sejtszervecskék hasadása	10	$2,73\times10^{-5}$	$1,95\times10^{-2}$
GO:0051301	sejtosztódás	11	$3,41\times10^{-5}$	$2,43\times10^{-2}$
GO:0007017	mikrotubulus-alapú folyamatok	10	$5,94\times10^{-5}$	$4,19\times10^{-2}$

B – eredmények a HeLa szinkr. csoportra specifikus génekre

GO (Gene Ontology) biológiai folyamat azonosítója és neve		*érintett gének száma*	*p-érték*	*Bonferroni-korrigált p-érték*
GO:0006259	**DNS anyagcsere folyamatai**	15	$1,20\times10^{-8}$	$7,35\times10^{-6}$
GO:0007049	sejtciklus	17	$5,65\times10^{-8}$	$3,45\times10^{-5}$
GO:0006281	**DNS javítás**	10	$2,23\times10^{-6}$	$1,36\times10^{-3}$
GO:0006974	**DNS károsodásra adott válasz**	11	$2,59\times10^{-6}$	$1,58\times10^{-3}$
GO:0022403	sejtciklus fázis	11	$6,53\times10^{-6}$	$3,99\times10^{-3}$
GO:0006260	**DNS replikáció**	8	$1,25\times10^{-5}$	$7,63\times10^{-3}$
GO:0033554	**sejtszintű stressz-válasz**	12	$1,67\times10^{-5}$	$1,02\times10^{-2}$
GO:0000278	mitotikus sejtciklus	10	$1,89\times10^{-5}$	$1,15\times10^{-2}$

C – eredmények a HeLa SZORT és HeLa szinkr. csoportok metszetének génjeire

GO (Gene Ontology) biológiai folyamat azonosítója és neve		*érintett gének száma*	*p-érték*	*Bonferroni-korrigált p-érték*
GO:0022403	sejtciklus fázis	46	$2{,}21\times10^{-49}$	$1{,}40\times10^{-46}$
GO:0000279	M-fázis	43	$1{,}12\times10^{-48}$	$7{,}09\times10^{-46}$
GO:0000278	mitotikus sejtciklus	44	$3{,}69\times10^{-48}$	$2{,}33\times10^{-45}$
GO:0022402	sejtciklus folyamatai	48	$2{,}39\times10^{-46}$	$1{,}51\times10^{-43}$
GO:0007049	sejtciklus	52	$6{,}85\times10^{-46}$	$4{,}33\times10^{-43}$
GO:0007067	mitózis	37	$3{,}87\times10^{-45}$	$2{,}45\times10^{-42}$
GO:0000280	sejtmag osztódása	37	$3{,}87\times10^{-45}$	$2{,}45\times10^{-42}$
GO:0000087	sejtciklus M-fázisa	37	$7{,}76\times10^{-45}$	$4{,}90\times10^{-42}$
GO:0048285	sejtszervecskék hasadása	37	$1{,}81\times10^{-44}$	$1{,}15\times10^{-41}$
GO:0051301	sejtosztódás	32	$3{,}01\times10^{-32}$	$1{,}90\times10^{-29}$
GO:0007017	mikrotubulus-alapú folyamatok	23	$7{,}87\times10^{-21}$	$4{,}97\times10^{-18}$
GO:0000226	mikrotubulus-citoszkeleton szerveződés	17	$7{,}86\times10^{-17}$	$7{,}02\times10^{-14}$
GO:0007346	mitotikus sejtciklus szabályozása	15	$8{,}68\times10^{-14}$	$5{,}48\times10^{-11}$
GO:0051726	sejtciklus szabályozása	19	$1{,}68\times10^{-13}$	$1{,}06\times10^{-10}$
GO:0007051	mitotikus orsó szerveződése	10	$2{,}28\times10^{-12}$	$1{,}44\times10^{-9}$
GO:0007059	kromoszómák szétválása	11	$2{,}02\times10^{-11}$	$1{,}28\times10^{-8}$
GO:0010564	sejtciklus folyamatainak szabályozása	12	$2{,}90\times10^{-11}$	$1{,}84\times10^{-8}$
GO:0007010	citoszkeleton szerveződése	18	$1{,}70\times10^{-10}$	$1{,}08\times10^{-7}$
GO:0051783	sejtmag osztódásának szabályozása	9	$6{,}98\times10^{-10}$	$4{,}41\times10^{-7}$
GO:0007088	mitózis szabályozása	9	$6{,}98\times10^{-10}$	$4{,}41\times10^{-7}$
GO:0000070	testvérkromatidák szétválása mitózisban	8	$8{,}88\times10^{-10}$	$5{,}61\times10^{-7}$
GO:0000819	testvérkromatidák szétválása	8	$1{,}09\times10^{-9}$	$6{,}89\times10^{-7}$
GO:0051276	kromoszómák szétválása	17	$7{,}07\times10^{-9}$	$4{,}47\times10^{-6}$
GO:0000075	sejtciklus ellenőrzőpont	9	$3{,}58\times10^{-8}$	$2{,}26\times10^{-5}$
GO:0040001	mitotikus orsó lokalizációja	5	$6{,}00\times10^{-8}$	$3{,}79\times10^{-5}$
GO:0051656	sejtszervecskék lokalizációjának szerveződése	8	$9{,}92\times10^{-8}$	$6{,}27\times10^{-5}$
GO:0030071	metafázis/anafázis átmenet szabályozása	6	$1{,}12\times10^{-7}$	$7{,}07\times10^{-5}$
GO:0007093	mitotikus sejtciklus ellenőrzőpont	7	$1{,}23\times10^{-7}$	$7{,}76\times10^{-5}$
GO:0051653	mitotikus orsó lokalizációja	5	$1{,}78\times10^{-7}$	$1{,}13\times10^{-4}$
GO:0051293	mitotikus orsó lokalizációjának szervezése	5	$1{,}78\times10^{-7}$	$1{,}13\times10^{-4}$
GO:0048015	foszfoinozitol-mediálta jelátvitel	8	$5{,}37\times10^{-7}$	$3{,}39\times10^{-4}$
GO:0008283	sejtproliferáció	14	$6{,}95\times10^{-7}$	$4{,}39\times10^{-4}$
GO:0051640	sejtszervecskék lokalizációja	8	$7{,}28\times10^{-7}$	$4{,}60\times10^{-4}$
GO:0007052	mitotikus orsó szerveződése	5	$1{,}14\times10^{-6}$	$7{,}17\times10^{-4}$
GO:0051329	mitotikus sejtciklus interfázisa	8	$1{,}57\times10^{-6}$	$9{,}90\times10^{-4}$
GO:0051325	interfázis	8	$1{,}90\times10^{-6}$	$1{,}20\times10^{-3}$
GO:0007018	mikrotubulus-alapú mozgás	8	$2{,}92\times10^{-6}$	$1{,}85\times10^{-3}$
GO:0000910	citokinézis	6	$2{,}93\times10^{-6}$	$1{,}85\times10^{-3}$
GO:0033043	sejtszervecskék szerveződésének szabályozása	10	$2{,}99\times10^{-6}$	$1{,}89\times10^{-3}$
GO:0010948	sejtciklus negatív szabályozása	5	$1{,}01\times10^{-5}$	$6{,}36\times10^{-3}$
GO:0007094	mitotikus sejtciklus metafázis ellenőrzőpont	4	$2{,}62\times10^{-5}$	$1{,}64\times10^{-2}$

GO:0045841	metafázis/anafázis átmenet negatív szabályozása	4	$2,62\times10^{-5}$	$1,64\times10^{-2}$
GO:0031577	metafázis ellenőrzőpont	4	$3,47\times10^{-5}$	$2,17\times10^{-2}$
GO:0045839	mitózis negatív szabályzozása	4	$3,47\times10^{-5}$	$2,17\times10^{-2}$
GO:0051784	sejtmag osztódásának negatív szabályozása	4	$3,47\times10^{-5}$	$2,17\times10^{-2}$
GO:0051439	ubiquitin-protein ligáz tevékenység szabályozása a mitotikus sejtciklus során	6	$4,48\times10^{-5}$	$2,79\times10^{-2}$
GO:0051438	ubiquitin-protein ligáz tevékenység szabályozása	6	$7,05\times10^{-5}$	$4,36\times10^{-2}$
GO:0051303	kromoszómák lokalizációjának szerveződése	4	$7,10\times10^{-5}$	$4,39\times10^{-2}$
GO:0050000	kromoszómák lokalizációja	4	$7,10\times10^{-5}$	$4,39\times10^{-2}$

Mindhárom vizsgált csoport génjei szignifikáns összefüggést mutattak különböző, sejtciklushoz kötődő biológiai folyamatokkal. A két halmaz metszetéhez tartozó gének mutatták a legszorosabb összefüggést ezekkel a folyamatokkal, kereszt-validálva a sejtciklus szerinti sejtválogatás és a szinkronizálások alapján is sejtciklusfüggőnek talált gének kiemelt fontosságát a sejtciklus folyamatában. Míg a sejtciklus szerinti sejtválogatásra specifikus gének által meghatározott biológiai folyamatok mindegyike megtalálható volt a két halmaz metszete által meghatározott folyamatok között, addig a szinkronizálásra specifikus gének által meghatározott folyamatok többsége (5/8) nem volt megtalálható a közös gének által meghatározott funkciók között (**4. táblázat**). Ezen, szinkronizálásra specifikus biológiai folyamatok közül kiemelendőek a ”DNS javítás”, ”DNS károsodásra adott válasz” és a ”sejtszintű stressz-válasz” folyamatok.

IV.1.4. A sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikájának összehasonlítása primer, nem-transzformált és tumoros sejttenyészetek között

A microarray eredmények qRT-PCR módszerrel történő validálása (**6. ábra**) során szembetűnő volt, hogy - bár mindhárom sejttípusban különbségek mutatkoztak a génexpressziós szintekben a fázisok függvényében - a génexpressziós változások nagysága küldönbséget mutatott a sejttípusok között: a primer fibroblaszt esetében jóval nagyobbak voltak a transzformált sejtekhez (NCI-H295R és HeLa) viszonyítva. Ebből kiindulva vizsgáltam, hogy a sejtciklusfüggő gének milyen expressziós szinteket mutatnak

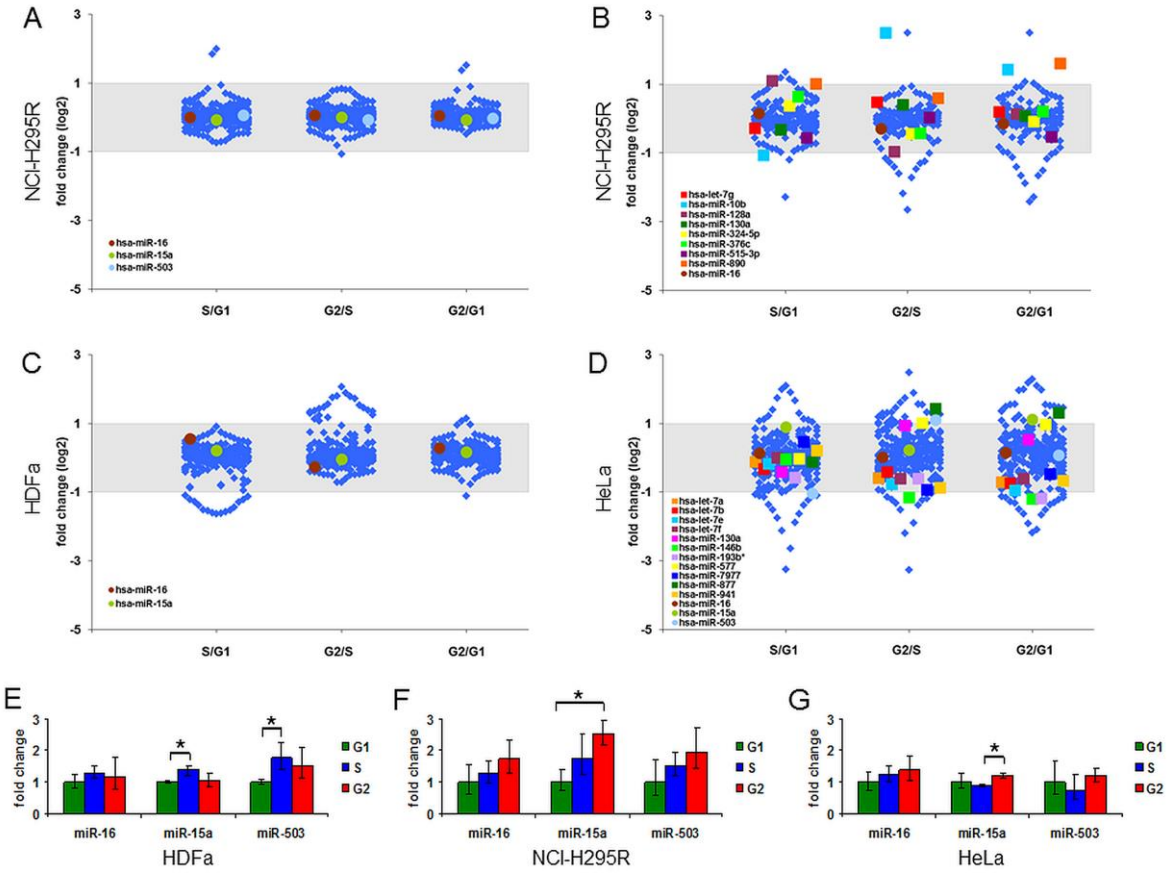
fázisonként az egyes sejttípusokban, valamint, hogy – abszolút értékben – mekkora nagyságú expresszió-változásokat mutatnak a S/G1, a G2/S valamint a G2/G1 fázisok között az egyes sejttípusokban. Megállapítottam, hogy primer fibroblaszt sejtekben a sejtciklusfüggő gének átlagos expressziós szintje minden fázisban alacsonyabb volt a transzformált sejtekéhez képest, ugyanakkor ezen gének expressziójának átlagos változásai lényegesen meghaladták a transzformált sejtekben tapasztalt mértéket. Ez utóbbi különbség leginkább a G1/S átmenetben volt szembetűnő (**8. ábra**).

IV.2. A sejtciklusfüggő miRNS expresszió vizsgálata

Három nagy áteresztőképességű technikát (microarray, qRT-PCR alapú TLDA, Illumina kis RNS szekvenálás) alkalmaztam a sejtciklusfüggő miRNS expresszió vizsgálatára[5] (**9. ábra**). Ezek közül a microarray eredmények mutatták a legkisebb változásokat, amelyek közül egy sem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak. A qRT-PCR alapú TLDA módszerrel 8 miRNS mutatott szignifikáns expressziós eltérést a sejtciklus fázisai között, amelyek közül a hsa-miR-10b, a hsa-miR-128a és a hsa-miR-890 esetén nagyobb, mint kétszeres expressziós változásokat tapasztaltam a fázisok között, melyeket azonban nem sikerült egyedi qRT-PCR assay-k alkalmazásával megerősíteni (**10. ábra**). A kis RNS szekvenálás bizonyult a legszélesebb dinamikus mérési tartománnyal rendelkező módszernek. Ezzel a módszerrel HeLa sejtekben 11 szignifikáns miRNS-expressziós különbséget találtam, amelyek közül a hsa-miR-146b, a hsa-miR-577, a hsa-miR-877 és a hsa-miR-193b* esetében nagyobb, mint kétszeres expressziós változások is ábrázolódtak (**9. ábra**). A fenti változások szintén nem voltak igazolhatók egyedi qRT-PCR módszerrel sem HeLa, sem NCI-H295R sejtekben (**10. ábra és 1. kiegészítő ábra**).

[5] Az NCI-H295R sejtvonal kis RNS szekvenálási eredményeit és a validációs próbálkozásokat -, mivel csoportonként csupán egy minta volt vizsgálva és így statisztika ebből a mérésből nem volt elérhető – az **1. kiegészítő ábrán** mutatom be.

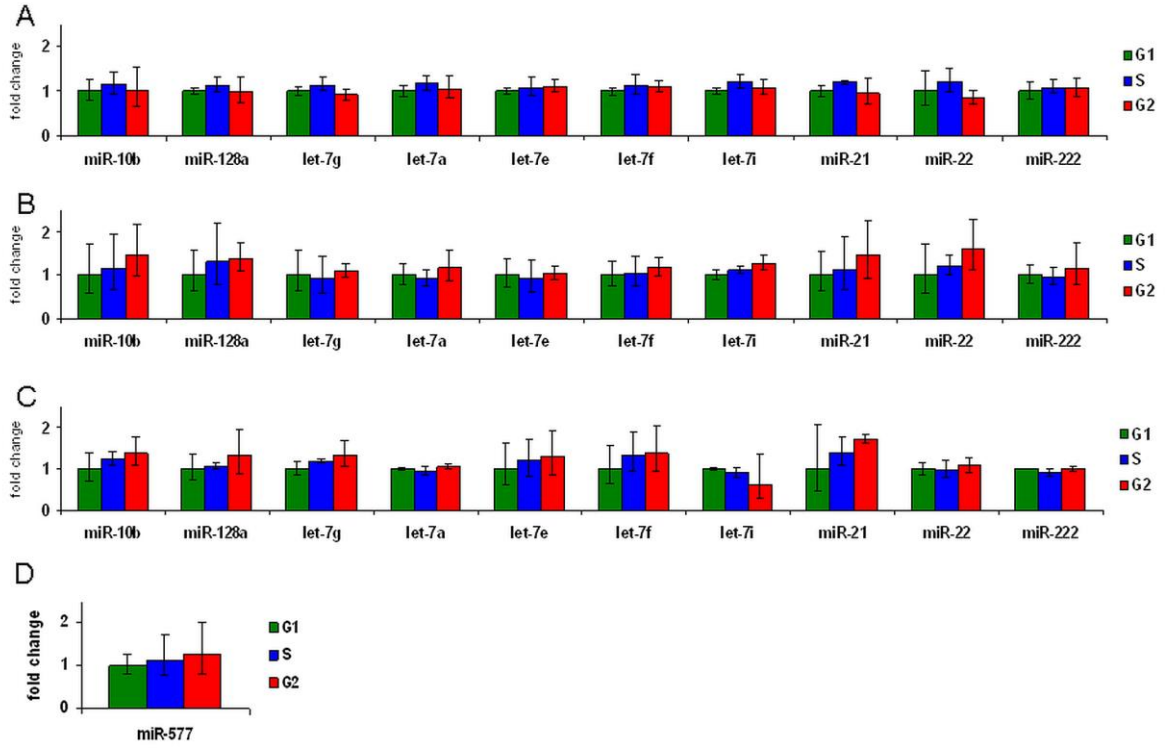
Ezzel szemben, négy, a nagy áteresztőképességű méréseken stabil expressziót mutató miRNS expressziójának egyedi qRT-PCR assay-kel történő mérése megerősítette ezen miRNS-k sejtciklustól független kifejeződését (**10. ábra**).



9. ábra – Sejtciklusfüggő miRNS expresszió vizsgálata nagy áteresztőképességű technikákkal és a hsa-miR-16 család néhány tagja expressziójának vizsgálata qRT-PCR módszerrel *– MiRNS expressziók log2-transzformált fold change értékei S/G1 G2/S és G2/G1 összehasonlításokban különböző nagy áteresztőképességű mérések alapján NCI-H295R sejtekben microarray (A) és TLDA (B) módszerrel, HDFa sejtekben microarray módszerrel (C) és HeLa sejtekben kis RNS szekvenálással (D).Szürke háttér jelöli a fold change < 2 eltérések területét. Színezett négyzetek jelölik a szignifikánsan (p<0,05) változó expressziójú miRNS-ek szintjének változását, míg színezett körök jelölik a hsa-miR-16 család néhány tagjának változását, amennyiben volt rájuk adat. A miR-16 család néhány tagjának expressziója a sejtciklus különböző fázisaiban qRT-PCR mérések alapján HDFa (E), NCI-H295R (F) és HeLa (G) sejtekben. Az adatok átlag ± standard deviáció formában vannak ábrázolva.* p<0,05. Ábra forrása: [212]*

Mivel a hsa-miR-16 család számos tagja bír igazolt sejtciklust befolyásoló hatással és kifejezett expresszió-változásukat igazolták nyugalmi G0 és aktívan proliferáló

sejttenyészetek között [172], qRT-PCR vizsgálatokat végeztem a hsa-miR-16, a hsa-miR-15a és a hsa-miR-503 sejtciklusfüggő expressziójának tanulmányozására mindhárom vizsgált sejttípuson (**9. ábra**). Az eredmények néhány kis amplitúdójú változást igazoltak, különösen a hsa-miR-15a esetében.

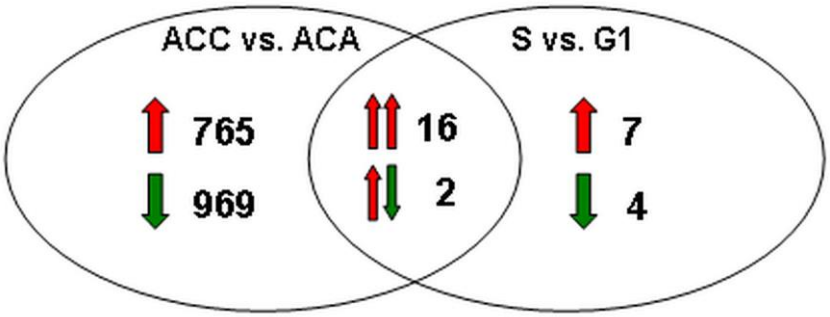


10. ábra – A nagy áteresztőképességű miRNS vizsgálatok megerősítési eredményei qRT-PCR módszerrel HDFa (A), NCI-H295R (B) és HeLa (C, D) sejteken – *A hsa-miR-10b, a hsa-miR-128a és a hsa-let-7g a TLDA mérések alapján, a hsa-let-7a, a hsa-let-7e, a hsa-let-7f a kis RNS szekvenálási eredmények alapján kerültek kiválasztásra. A hsa-let-7i, a hsa-miR-21, a hsa-miR-22 és a hsa-miR-222 miRNS-k stabil, sejtciklustól független expressziót mutattak a nagy áteresztőképességű vizsgálatokban és a stabil miRNS expresszió megerősítése céljából lettek egyedi qRT-PCR assay-kel vizsgálva. Emellett – a kis RNS szekvenálás eredményeiből kiindulva –, vizsgáltam a hsa-miR-577 miRNS expresszióját HeLa sejtekben is, amely nem igazolta ennek sejtciklusfüggő expresszióját (D). Az adatok átlag ± standard deviáció formában vannak ábrázolva. Az elvégzett statisztikai elemzések egyetlen esetben sem igazoltak szignifikáns (p<0,05) eltérést. Ábra forrása: [212]*

IV.3. Új, sejtciklusfüggő expressziót mutató proliferációs marker kimutatása mellékvesekéreg-karcinómában

IV.3.1. A mellékvesekéreg-karcinóma malignitás mintázatának összehasonlítása az NCI-H295R sejtciklusfüggő transzkripciós programjával

A három *in silico* újraelemzett microarray tanulmány [196-199] átlagában 1752 gén mutatott szignifikáns, legalább kétszeres expressziós különbséget ACA és ACC között. Az S/G1 összehasonlításban 29 gén bizonyult szignifikáns, legalább kétszeres expressziós különbséget mutatónak NCI-H295R humán ACC sejtvonalon. A két lista metszetét a **11. ábra** és az **5. táblázat** részletezi.



11. ábra – Az ACC malignitás mintázatának és az NCI-H295R sejtciklusfüggő transzkripciós programjának Venn diagramja – *Piros nyilak a szignifikánsan fokozott expressziót, zöld nyilak a szignifikánsan csökkent expressziót, a mellettük lévő számok a változó kifejeződésű gének számát jelölik. A metszetben a dupla nyilak a ACC vs. ACA változást (bal nyíl) és a S vs. G1 változást (jobb nyíl) jelölik. A metszethez tartozó gének az 5. táblázatban vannak részletezve. Ábra forrása: [213]*

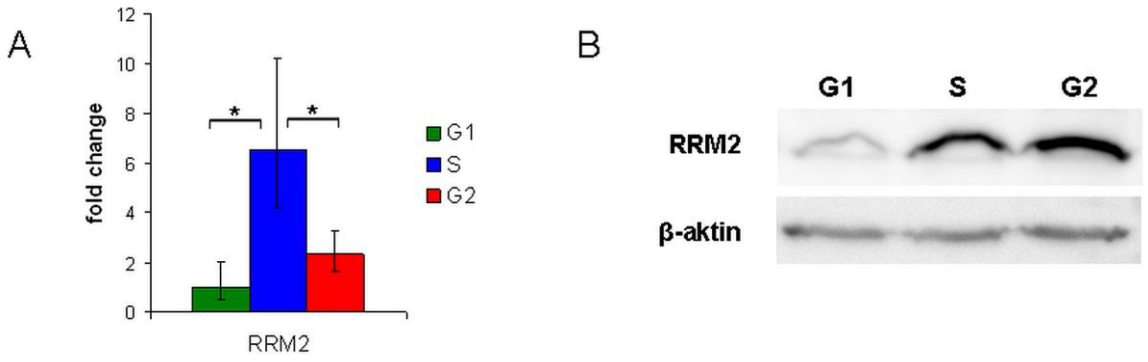
Az S vs. G1 összehasonlításban változó kifejeződésű gének többsége része a malignitás mintázatnak is. A két halmaz metszetének tagjai közül az *RRM2* (ribonukleotid reduktáz M2 alegység) és az *ASPM* (abnormális orsó-homológ, microcephalia-asszociált) gének mutattak fokozott expressziót mindhárom ACC vs. ACA microarray tanulmányban, emellett az *RRM2* adta a legmagasabb génexpressziós különbséget S vs. G1 összehasonlításban (**5. táblázat**). További kutatásaim az *RRM2* részletesebb vizsgálatát célozták.

5. táblázat – Az ACC malignitás mintázatának és az NCI-H295R sejtciklusfüggő transzkripciós programjának metszetéhez tartozó gének – *A 11. ábrán bemutatott Venn diagram metszetéhez tartozó gének és azok expresszió-változásainak bemutatása. A hiányzó adatok nem szignifikáns vagy FC < 2 szignifikáns eltérések. A malignitás mintázathoz tartozó gének Szabó Péter és munkatársai közlése [199] alapján. Táblázat forrása: [213]*

gének	fold change (ACC vs. ACA)				fold change S- vs. G1-fázis
	de Reynies és mtsai. [196]	Giordano és mtsai. [197]	Tömböl és mtsai. [198]	átlag	
RRM2	5,245	12,662	9,586	9,164	5,365
HJURP		2,709	7,373	5,041	5,120
SPC24			8,543	8,543	5,022
WDR62			2,597	2,597	4,414
RTKN2			7,382	7,382	4,410
CDCA2		3,084	13,485	8,285	4,068
SKA1			7,462	7,462	3,638
GTSE1		3,949	6,678	5,314	3,614
STIL		2,671	3,114	2,893	3,415
ASPM	3,466	11,213	28,779	14,486	3,307
IQGAP3		2,169		2,169	3,296
ARHGAP11A			8,580	8,580	3,283
PLK4		2,201	2,279	2,240	3,086
CDKN2D			4,593	4,593	2,733
SMC2		2,571		2,571	2,676
KIF14		4,031	9,100	6,566	2,472
COL1A1		2,680		2,680	-3,805
HOXB13			10,458	10,458	-3,615

IV.3.2. Az RRM2 sejtciklusfüggő expressziójának igazolása

A kiválasztott RRM2 sejtciklusfüggő expresszióját sejtciklus szerint leválogatott NCI-H295R mintákon mRNS és fehérje szinten egyaránt megerősítettem (**12. ábra**). A korábban leírt észrevételeknek megfelelően, a G1-fázisban alacsony expressziós szint S-fázisban megnő, ahol az RRM2 a ribonukleotid reduktáz enzimkomplex részeként kulcsfontosságú a ribonukleotid-dezoxiribonukleotid átalakulásban [214].



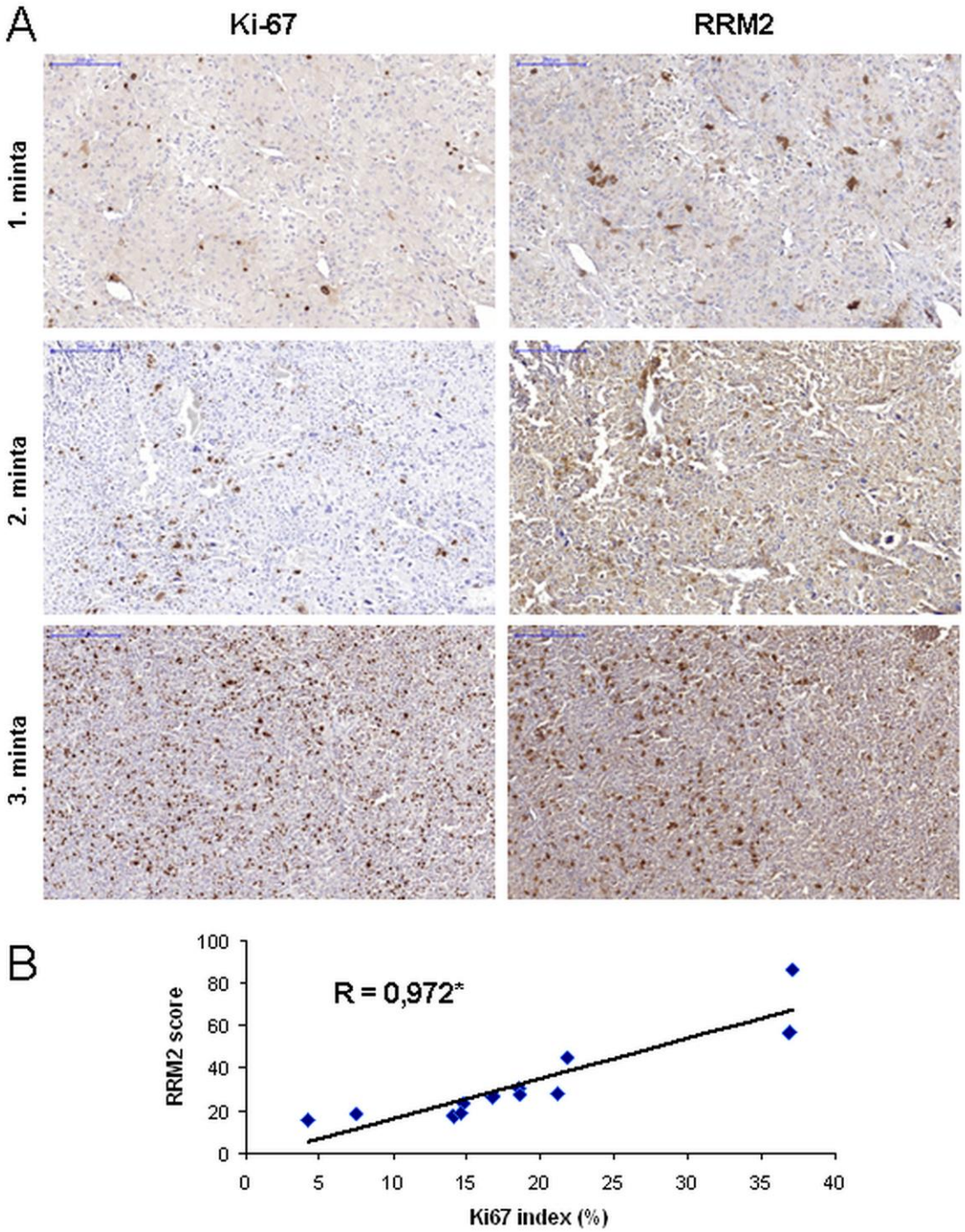
12. ábra – Az RRM2 sejtciklusfüggő expressziójának igazolása sejtciklus szerint szétválogatott NCI-H295R sejteken – *Igazolás mRNS szinten qRT-PCR módszerrel (A) és fehérje szinten Western blot módszerrel (B). Az adatok átlag ± standard deviáció formában vannak ábrázolva.* p<0,05. Ábra forrása: [213]*

IV.3.3. Az RRM2 expressziójának vizsgálata humán ACC szöveteken

Tizenkét, szövettanilag igazolt humán ACC-n végeztünk immunhisztokémiai vizsgálatokat az RRM2 és Ki-67 fehérjék meghatározása céljából. A daganatok jellemzőit a **6. táblázat**, az immunhisztokémiai reakciók eredményeit a **13. ábra** szemlélteti. Eredményeink szignifikáns, szoros pozitív korrelációt mutattak a Ki-67 index és az RRM2 score között (**13. ábra**).

6. táblázat – A vizsgálatokba bevont ACC minták jellemzése - *N: nő, F: férfi, ábra forrása: [213]*

sorszám	nem	életkor (év)	legnagyobb átmérő (mm)	módosított Weiss score	Ki-67 index (%)	RRM2 score
1	N	62	85	5	14,8	23,3
2	F	79	120	5	7,5	18,2
3	N	46	200	6	36,9	56,7
4	F	25	100	6	14,1	17,5
5	N	50	120	5	14,6	18,6
6	N	55	90	6	21,2	28,0
7	N	69	110	6	21,8	44,8
8	N	61	80	5	16,8	26,8
9	N	54	80	5	18,5	30,2
10	N	62	130	6	4,2	15,7
11	N	61	120	5	18,6	27,6
12	N	47	140	5	37,1	86,2



13. ábra – A Ki-67 és RRM2 expresszió vizsgálata humán ACC mintákon – *3 reprezentatív minta ugyanazon területének Ki-67 (bal oszlop) és RRM2 (jobb oszlop) festődése (A). A kék skála 200 µm-nek felel meg, nagyítás: ×100. A Ki-67 index és az RRM2 score korrelációjának vizsgálata (B).* p < 0,005. Ábra forrása: [213]*

IV.4. Daganatellenes szerek hatásának vizsgálata humán ACC sejtvonalon

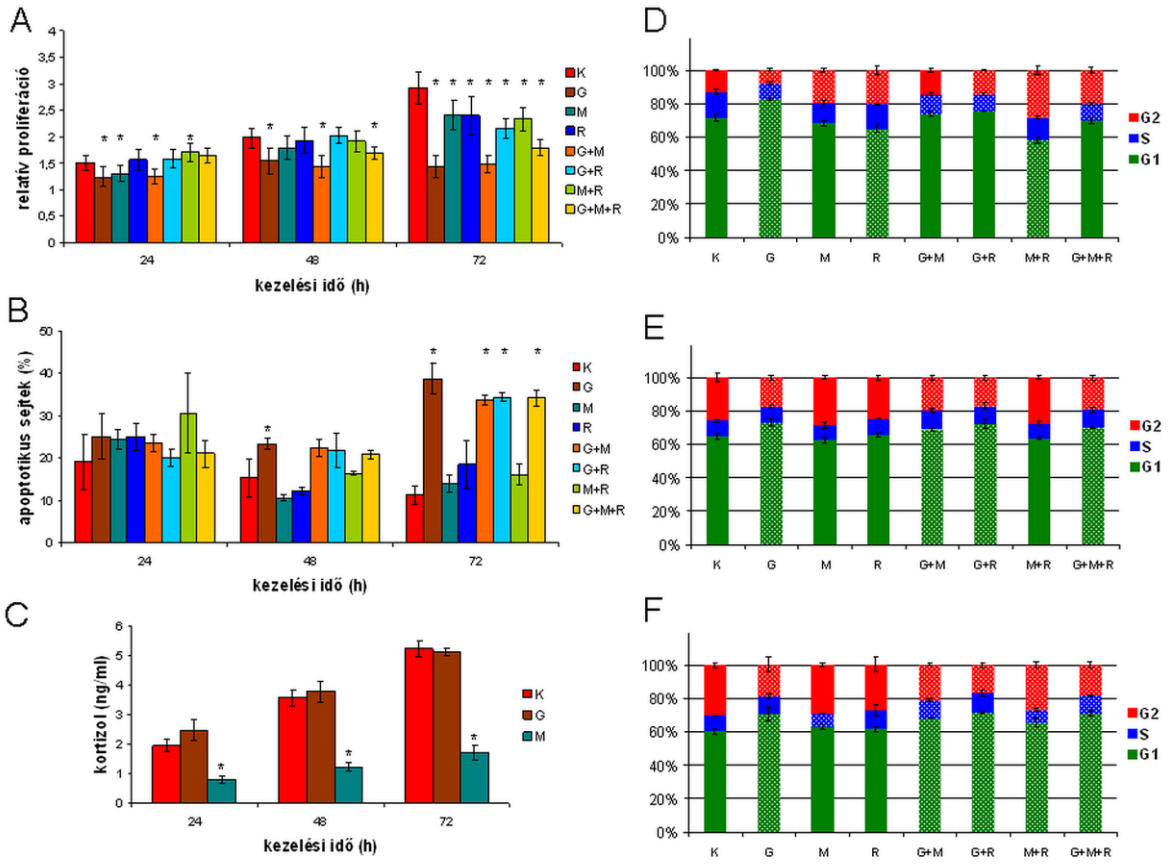
IV.4.1. Az alkalmazott daganatellenes szerek hatása az NCI-H295R sejtek proliferációjára, apoptózisára, kortizoltermelésére valamint a sejtciklus fázisainak eloszlására

Az NCI-H295R hormontermelő mellékvesekéreg-karcinóma sejtvonalon a gemcitabin, a mitotán és a 9-cisz-retinsav önálló és kombinált adásának hatásait vizsgáltam. A daganatellenes szerrel nem kezelt kontroll minták mellett 7 különböző kezelést (gemcitabin, mitotán, 9-cisz-retinsav, gemcitabin+mitotán, gemcitabin+9-cisz-retinsav, mitotán+9-cisz-retinsav, gemcitabin+mitotán+9-cisz-retinsav) alkalmaztam 24, 48, illetve 72 óra hosszan.

A 72 órás kezelés során mindegyik alkalmazott daganatellenes szer csökkentette az NCI-H295R sejtek proliferációját. A gemcitabin rövidebb kezelési időtartam (24, 48 órás) esetén is csökkentette a proliferációt, és a csökkenés mértéke is nagyobb volt, mint a másik két daganatellenes szerrel külön-külön kezelve. A gemcitabin-mediálta proliferáció-csökkenés hátterében szerepe volt a – a 72 órás kezelés során kifejezetten nagy mértékű – apoptózisnak is (**14. ábra**).

Az elvártaknak megfelelően a mitotán kezelés nagymértékben csökkentette az NCI-H295R sejtek kortizoltermelését, ugyanakkor a gemcitabin alkalmazása nem befolyásolta a sejtek kortizoltermelését (**14. ábra**).

A gemcitabin alkalmazása növelte a G1-fázisú sejtek arányát mindhárom kezelési időtartam esetén. A mitotán és a 9-cisz-retinsav, valamint különösen a kettő kombinált alkalmazása szignifikánsan emelte a G2-fázisú sejtek arányát a 24 órás kezelés során (**14. ábra**).

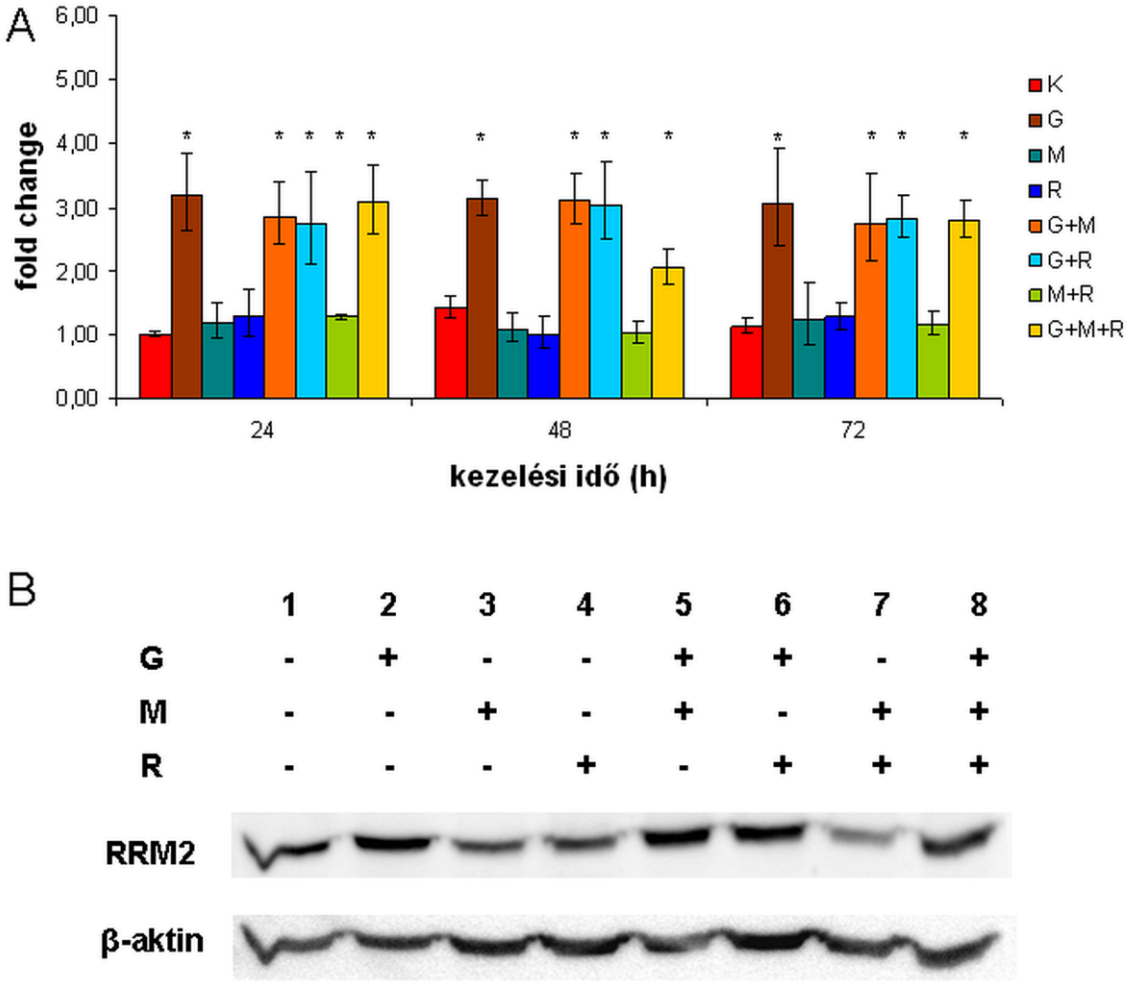


14. ábra – Az alkalmazott kezelések hatása az NCI-H295R sejtek proliferációjára, apoptózisára, kortizoltermelésére és sejtciklusára – *Az ábra a proliferációra (A), az apoptózira (B), a kortizoltermelésre (C) valamint a sejtciklus fázisainak megoszlására vonatkozó 24 (D), 48 (E) és 72 (F) órás kezeléseket követően mért értékeket mutatja be. K – kontroll, G – gemcitabin, M – mitotán, R – 9-cisz-retinsav. Az adatok átlag ± standard deviáció formában vannak ábrázolva. A csillagok (A-C) és a fehéren pontozott oszlopok (D-F) a kontrolltól való szignifikáns (p<0,05) eltérést jelölik. Ábra forrása: [213]*

IV.4.2. A daganatellenes szerekkel történt kezelések RRM2 expresszióra gyakorolt hatásai

A gemcitabin – a kezelési időtől függetlenül – háromszorosára emelte az RRM2 mRNS szintjét NCI-H295R sejtekben. A gemcitabin kombinációja más szerekkel nem módosította a gemcitabin hatását (**15. ábra**). A 48 órás minták fehérjelizátumain végzett

Western blot vizsgálatok igazolták a gemcitabin RRM2 expressziót fokozó hatását fehérjeszinten is (**15. ábra**).



15. ábra – Az alkalmazott kezelések hatása az NCI-H295R sejtek RRM2 expressziójára – *Az RRM2 mRNS expressziója a különböző kezelések hatására (A). Az adatok átlag ± standard deviáció formában vannak ábrázolva. Az RRM2 fehérje expressziója a különböző kezelések hatására (B). K – kontroll, G – gemcitabin, M – mitotán, R – 9-cisz-retinsav.* $p<0,05$. Ábra forrása: [213]*

V. Megbeszélés

"If you're going to be a good and faithful judge,
you have to resign yourself to the fact that you're
not always going to like the conclusions you reach.
If you like them all the time,
you're probably doing something wrong."[6]

V.1. A sejtciklusfüggő génexpressziós program

A nagy áteresztőképességű transzkripciós vizsgálatok elterjedésével lehetővé vált a különböző élettani állapotokra jellemző génexpressziós mintázatok leírása és vizsgálata. A génexpressziós microarray vizsgálatokat sikeresen alkalmazták a sejciklus vizsgálatában is. A sejtciklusfüggő transzkripciós program leírásához a megelőzően szinkronizált tenyészetekből meghatározott időközönként mintát véve vizsgálták a periódikus géntranszkripciót mind primer, nem-transzformált, mind tumoros sejtekben [73-75].

A szinkronizálás alkalmazása a natív sejtciklus leírására ugyanakkor kétségeket ébresztett [135]. A szinkronizálási módszerek növekedési egyensúly eltolódást (growth imbalance) és a ciklinek expressziójának időelőtti fokozódását okozzák [80, 81], valamint – bizonyos gátlószerek (pl. timidin) esetén – a DNS szintézis gátlásának eredményeképpen aktiválódik a G2/M ellenőrzőpont és az ATM/ATR jelátvitel [82]. Az ennek hatására indukálódó génexpresszió független a sejtciklus optimális működésekor végbemenő programtól és elfedheti, mesterségesen megváltoztathatja azt. Emellett a korábban szinkronizált sejtek hamarosan elveszítik szinkronizáltságukat, amely szintén tovább nehezíti a sejtciklusfüggő transzkripció pontos leírását. A fenti korlátoknak a kiküszöbölésére Shedden és Cooper egy szigorú kritériumrendszert dolgozott ki (részletesen lásd I.1.4. fejezetet) [135], amelyben foglaltak teljesítése szerintük előfeltétele

[6] idézet Antonin Gregory Scalia (1936-2016) az Amerikai Egyesült Államok néhai (1986-2016) legfelsőbb bírájának 2005. augusztus 29-én a Chapman Egyetemen elmondott beszédéből

a natív sejtciklus sejtciklusfüggő transzkripciós programja jellemzésének. Ezen kritériumok teljesítéséhez új módszerek kidolgozására és alkalmazására volt szükség.

A centrifugális ülepítés [85] és a sejtciklus szerinti sejtválogatás [90, 92, 93] két, a shedden-cooperi kritériumoknak eleget tevő módszer a sejtciklusfüggő transzkripció vizsgálatára, ugyanakkor – tudomásunk szerint –, ezekkel a módszerekkel még nem vizsgálták a sejtciklusfüggő transzkripciót humán sejtekben. Amíg a centrifugális ülepítés során a sejtek nagysága alapján [85], addig a sejtciklus szerinti sejtválogatás során [92, 93] a sejtek DNS-tartalma alapján történik a különböző fázisú sejtek szétválogatása, amely mindkét esetben sikeresen szegregálta a sejtciklus különböző fázisaiban lévő sejtpopulációkat [85, 87, 88, 92, 93].

Jelen munkámban sikeresen alkalmaztam az optimalizált sejtciklus szerinti sejtválogatás módszerét a sejtciklusfüggő transzkripciós program leírására mind primer fibroblaszt sejteken, mind transzformált (méhnyakrák és mellékvesekéreg-karcinóma) sejtvonalakon. A sejtciklus szerinti sejtválogatás megfelelően fázis-homológ sejtpopulációkat eredményezett, amit igazolt a leválogatott sejtek újraelemzése FACS vizsgálattal, valamint a leválogatott sejtek fehérjelizátumain Western blot módszerrel végzett p-CDC-2 meghatározás is.

Számos, a sejtciklusban és annak szabályozásában kulcsfontosságú gén sejtciklusfüggő expresszióját sikerült validálnom. Ezek közül kiemelendőek a ciklinek (például a CCNA2, a CCNB1, a CCNB2 és a CCNE2) és más fontos effektor fehérjék (az AURKA és AURKB auróra kinázok és a DNS-topoizomeráz 2α) génjei. A sejtciklus fázisok között eltérő expressziót mutató gének funkcionális bioinformatikai elemzése megerősítette a fenti gének meghatározó szerepét a sejtciklus szabályozásában.

Ezt követően kíváncsi voltam arra, hogy a sejtciklus szerinti sejtválogatás módszerrel észlelt fázisok közötti génexpressziós különbségek hogyan korrelálnak a korábbi, szinkronizálás alapú mérésekkel. Ezen vizsgálatomhoz felhasználtam a primer

fibroblaszt és HeLa sejtek szabadon elérhető génexpressziós adatsorait [74, 75], és a G2 és G1 fázisok közötti génexpressziós eltéréseket hasonlítottam össze. A vizsgálatom szignfikáns korrelációt adott a két módszer eredményei között, kereszt-validálva a sejtciklus szerinti sejtválogatás és a szinkronizálás módszereivel kapott sejtciklusfüggő transzkripciós programot.

Vizsgálatokat folytattam annak felderítésére is, hogy van-e különbség a szinkronizálással, illetve a sejtciklus szerinti sejtválogatással detektált transzkripciós program között? Ehhez a sejtciklus szerinti sejtválogatásra, valamint a szinkronizálásra specifikus sejtciklusfüggő génlisták által meghatározott biológiai folyamatokat hasonlítottam össze a két lista metszete által meghatározott biológiai folyamatokkal. A sejtciklus szerinti sejtválogatásra jellemző sejtciklusfüggő génlista által meghatározott biológiai folyamatok mindegyike megtalálható volt a metszet által meghatározott biológiai folyamatok között, addig a szinkronizálásra jellemző sejtciklusfüggő gének által meghatározott folyamatok többsége specifikus volt a szinkronizálásra és nem volt megtalálható a metszet által meghatározott sejtfolyamatok között. A ”DNS javítás”, a ”DNS károsodásra adott válasz” és a ”sejtszintű stressz-válasz” folyamatok érintettsége igazolja a szinkronizálás korábban leírt replikációs stresszt okozó következményeit [80, 83, 215]. A fenti eredményem alapján azt állíthatjuk, hogy a sejtciklus szerinti sejtválogatás a szinkronizálásnál specifikusabban, a sejt élettani folyamatainak megváltoztatása nélkül képes vizsgálni a sejtciklusfüggő folyamatokat (**7. táblázat**).

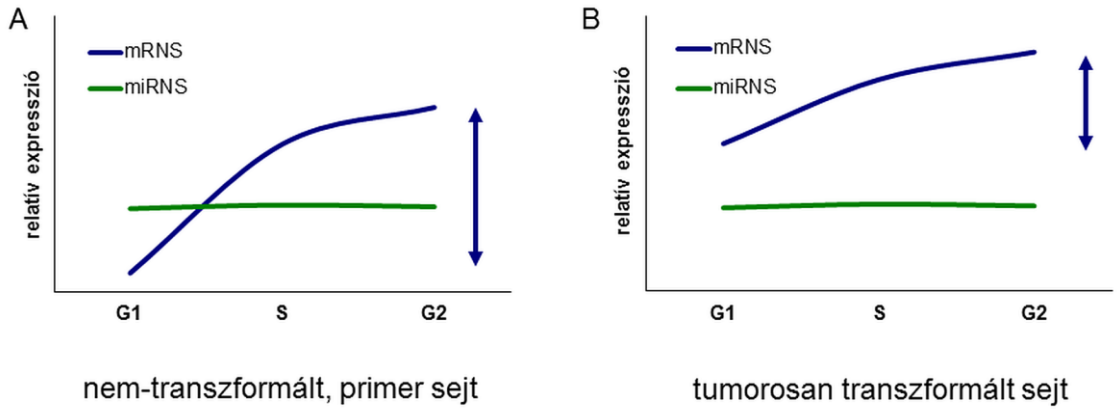
Miután sikeresen igazoltam a sejtciklus szerinti sejtválogatás kitűnő alkalmazhatóságát a sejtciklusfüggő folyamatok vizsgálatában, további elemzéseket végeztem a sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikájának tanulmányozására primer, nem-transzformált fibroblasztok és tumoros sejtek összehasonlításával. Whitfield és munkatársai korábban azt találták, hogy a sejtciklusfüggő expressziót mutató gének fokozottan fejeződnek ki a rosszindulatú daganatokban és így a daganatok malignitás mintázatának részét képezik [74]. Ezt azzal magyarázták, hogy a rosszindulatú daganatok nagyobb arányban tartalmaznak osztódó sejteket [74]. A malignus transzformáció során a

7. táblázat – A szinkronizálás és a sejtciklus szerinti sejtválogatás módszereinek összehasonlítása

		szinkronizálás	sejtciklus szerinti sejtválogatás
kivitelezéshez szükséges technikák		általános sejttenyésztés	általános sejttenyésztés és újabb generációs áramlási citométer
homogén sejtpopulációk nyerése		kivitelezhető (időarányosan csökkenő tisztaság)	kivitelezhető
a nyert minta	**gén- és miRNS expresszió vizsgálat**	alkalmas	alkalmas
	fehérje expresszió vizsgálat	alkalmas	alkalmas
korábbi alkalmazása		széleskörű	korlátozott
anyagi vonzata		alacsonyabb	magasabb (főleg ritka sejtpopulációk kiválogatásánál)
sejtciklus élettani folyamatainak befolyásolása		igazolt	nem igazolt
shedden és cooperi kritériumok [135]		nem felel meg	megfelel

sejtciklus különböző fázisainak hossza egyenlőtlenül rövidül [216]. A *HRAS*, az *SRC*, a *MYC*, a *CCND1* protoonkogének aktivációja [217-219], valamint a *PTEN* tumor szuppresszor kiesése [220] a G1 fázis rövidülését eredményezi [216]. Emellett a kulcsfontosságú M fázis regulátor *LZTS1* és *LATS2* gének hiánya az M fázis rövidüléséhez vezet [216, 221, 222]. Mivel az S és G2 fázisok hossza lényegesen nem változik, így – a malignus transzformáció során megváltozott sejtciklus-dinamika következtében – az S és G2 fázisú sejtek aránya viszonylagosan megnő. Bar-Joseph és munkatársai tanulmánya kimutatta, hogy bizonyos géncsoportok specifikusan a primer, nem-transzformált, más géncsoportok pedig specifikusan a malignus transzformáción átesett sejtekben mutatnak sejtciklusfüggő kifejeződést [75].

Eredményeim támogatják a malignus transzformáció következményeként megváltozó, a sejtciklus transzkripciós szabályozására vonatkozó megfigyeléseket. Mivel csupán három sejttípust vizsgáltam, ezért eredményeimből nem vonhatok le általános érvényű következtetéseket a sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikájának a malignus transzformáció következtében létrejövő megváltozására, ugyanakkor eredményeink alapján felállíthatunk egy hipotézist (**16. ábra**).



16. ábra – A sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikájáról alkotott hipotézis sematikus ábrázolása – *Az ábrán a nem-transzformált, primer (A) és a tumorosan transzformált (B) sejtekben egy-egy reprezentatív, sejtciklus-gén (kék vonal) és miRNS (zöld vonal) expressziójának dinamikus változását ábrázoltuk. A kék kettősnyíl jelöli a sejtciklus-gén expresszió-változásának amplitúdóját a sejtciklus során. A sejtciklusfüggő transzkripciós programhoz tartozó mRNS-ek expressziója minden fázisban alacsonyabb a nem-transzformált, primer sejtekben a tumorosan transzformált sejtekéhez képest, míg expressziójuk a különböző fázisok között nagyobb amplitúdójú változásokat mutat. A miRNS-ek ugyanakkor nem mutattak sejtciklusfüggő változásokat. Ábra forrása: [212]*

Hipotézisünk szerint a sejttípustól független, univerzális humán sejtciklusfüggő transzkripciós program dinamikája megváltozik a malignus transzformáció hatására: a sejciklusfüggő transzkripciós program génjei minden fázisban magasabb kifejeződésűek a transzformált sejtekben a primer, nem-transzformált sejtek megfelelő fázisaiban észlelt expressziójukhoz képest. Így a fent említett – a sejtciklus egyes fázisai időtartamának változásaiból adódó –, fázisfüggő mód mellett egy fázisfüggetlen expresszió-növekedés is jellemzi a malignusan transzformált sejteket. Emellett a G1/S és az S/G2 fázisok között a sejtciklus-gének expresszió-változásai jóval alacsonyabbak tumorosan transzformált sejtekben, mint a primer, nem-transzformált sejtekben. Ez utóbbi különbségért a nem-transzformált, primer sejtekben jellemző hosszabb és jobban szabályozott G1 fázis és különösen a szigorúbban szabályozott G1/S átmenet lehet a felelős [216]. A tumoros átalakulásban szerepet játszó Myc-amplifikáció következtében stimulálódó E2F expresszió-fokozódás is szerepet játszhat a G1 és S fázisok között észlelt alacsonyabb génexpressziós változásokban, mivel a Myc-amplifikáció következtében fokozódó E2F expresszió elősegíti a G1/S átmenet transzkripciós programját [223, 224].

V.2. A miRNS expresszió vizsgálata a sejtciklus függvényében

A miRNS-ek számos ponton befolyásolják a sejtciklus működését [140]. A szövetspecifikusan onkogén (onko-miR) és tumor szuppresszor (TS-miR) miRNS-ek expresszióinak megváltozása – a sejtciklus folyamatainak gyorsításán keresztül [141, 142] – hosszú távon számos daganat kialakulásában játszik szerepet [140, 143, 148, 225-227]. A daganatokra jellemző miRNS expressziós változások mellett a mitogén stimulusok kiváltotta nyugalmi G0 fázisból aktívan osztódó sejtciklusba való átmenet is miRNS-mediálta folyamatok által befolyásolt [140, 172]. A mitogén stimulusok kiváltotta E2F-család expresszió-fokozódása – egyebek mellett – a hsa-miR-16 és a hsa-let-7 családhoz tartozó miRNS-ek kifejeződését is növelik [145, 146, 172]. A fenti miRNS-ek számos kulcsfontosságú sejtciklus-regulátort (pl. ciklin E) céloznak [146]. A létrejövő E2F-miRNS-ciklin tengely egy előreható csendesítő hatás kialakulásával finomhangolja a sejtciklus szabályozását [145, 146].

Doktori munkám során a sejtciklus szerinti sejtválogatás módszerével vizsgáltam a sejtciklusfüggő miRNS expresszió-változásokat. A miRNS expressziót három nagy áteresztőképességű módszerrel (microarray qRT-PCR alapú TLDA és kis RNS szekvenálás) mértem. A microarray módszerrel végzett vizsgálataim a sejtciklus során stabil miRNS expressziót mutattak, ezért vizsgálatomat kiterjesztettem a qRT-PCR alapú TLDA és a kis RNS szekvenálás módszereire is. A fenti módszerek nagyobb expressziós különbségeket detektáltak, amelyek közül néhány szignifikánsnak is bizonyolult. Korábbi tanulmányok – tapasztalatainkkal egybevágóan – az újgenerációs szekvenálási eljárások nagyobb dinamikus mérési tartományát igazolták [228-230].

A TLDA és a kis RNS szekvenálás során kimutatott szignifikáns miRNS expressziós különbségek megerősítésének céljából végzett egyedi qRT-PCR mérések ugyanakkor egyetlen esetben sem igazolták a sejtciklusfüggő expressziót. Mivel a hsa-miR-16 család több tagjának expresszió-változását korábban már leírták a nyugalmi G0 fázis és az aktívan osztódó állapot között [172], egyedi qRT-PCR méréseket végeztem a hsa-miR-

16, a hsa-miR-15a és a hsa-miR-503 sejtciklusfüggő expressziójának vizsgálatára. A hsa-miR-15a esetében ugyan igazolódott néhány szignifikáns expressziós különbség a sejtciklus fázisai között, ezen kis amplitúdójú különbségek nem mutattak hasonló dinamikát a különböző sejttípusok között, így ezekből messzemenő következtetést levonni nem tudok.

A miRNS expressziós vizsgálatok eredményeit összevetve azt állíthatom, hogy a vizsgált sejttípusokban a G1, S és G2 fázisok között nincs releváns miRNS expressziós különbség, a miRNS-ek kifejeződése stabil (**16. ábra**). Ez különösen érdekes a robusztus mRNS expressziós különbségek fényében, amelyek a sejtciklusfüggő transzkripciós programot alkotják. Eredményeink alapján azt tartjuk valószínűnek, hogy az ép és tumoros sejtciklus transzkripciós programjának irányításában az I.1.4.2. alfejezetben részletesen kifejtett oszcilláló transzkripciós faktor hálózat és a ciklin-CDK komplexek együttműködése a meghatározó [88].

A miRNS-ek sejtciklust befolyásoló hatásai sokrétűek ugyan és számos miRNS vesz részt szövetspecifikusan a malignitás mintázat kialakításában, eredményeim alapján azt valószínűsítjük, hogy ezen miRNS expressziós változások a daganatképződés során, hosszabb idő alatt alakulnak ki. Ezt támasztja alá az a megfigyelés is, hogy számos miRNS gén delécióját vagy folyamatos transzkripciós csendesítését igazolták krónikus limfoid leukémia kialakulása során [143, 144]. A tartós transzkripciós csendesítés vagy a miRNS gének deléciója is valószínűtlenné teszi ezen miRNS-ek expressziójának dinamikus változásait a sejtciklus folyamataiban. Hausser és munkatársai - a miRNS expressziós változások transzlációra gyakorolt hatásaival kapcsolatos matematikai és kísérletes eredményeik alapján - arra a következtetésre jutottak, hogy a fenti folyamatok lassabbak a korábban feltételezettnél [231]. Ennek hátterében a miRNS-ek összetett biogenézisét és érését, valamint az Argonaute fehérjékkel való komplex kialakulásának összetettségét írták le [231]. Felvetették, hogy a miRNS-ek lebomlásának gyorsan végbemenő, jól szabályozott volta előfeltétel bizonyos, gyorsan végbemenő biológiai folyamatok – napszaki változások, sejtciklus – miRNS-mediálta reguláláshoz [231]. Jelen eredményeim ezeket a gyors miRNS expressziós változásokat nem tudták igazolni.

V.3. Új, sejtciklusfüggő proliferációs marker vizsgálata mellékvesekéreg-karcinómában

A tumorosan transzformált sejtciklus folyamatai a daganatellenes kezelések régóta célzott támadáspontjai. Tanulmányozásuk számos alkalommal sikeres, új, antiproliferatív hatású gyógyszerek kifejlesztéséhez és alkalmazásához járult hozzá [232]. A különböző daganattípusok specifikus driver génjeinek vizsgálatával új molekuláris támadáspontok azonosíthatóak.

Az ACC gyógyszeres terápiájában az egyetlen mellékvesekéreg-specifikus szer a mitotán [174], míg a betegség előrehaladott állapotában számos citosztatikus szer alkalmazásával próbálkoznak, korlátozott eredménnyel [174, 204, 206, 233, 234]. Az ACC alacsony incidenciája miatt az új gyógyszerek megfelelő klinikai vizsgálata igen komoly kihívás [174].

Doktori munkám során az ACC malignitás mintázatának és az NCI-H295R humán ACC sejtvonal sejtciklusfüggő transzkripciós programjának összehasonlításával olyan új proliferációs biomarkert kerestem, amely megkönnyítheti az ACC hisztopatológiai diagnózisát. A jövőben az ilyen típusú biomarkerek az ACC terápiájának új, hatékony támadáspontjait is jelenthetik.

Eredményeim alapján az NCI-H295R sejtciklusfüggő transzkripciós programjának több, mint 60%-a részt vesz az ACC malignitás mintázatának kialakításában. Ennek hátterében a tumoros transzformáció következtében megvalósuló, a sejtciklusgéneket érintő fázisfüggő és fázisfüggetlen expresszió-fokozódások állnak [74, 212]. A sejtciklusgének fázisfüggő expresszió-emelkedését az okozza, hogy az S és G2 fázisú sejtek aránya magasabb a tumoros sejtek tenyészeteiben, és – ennek következtében – a fenti sejtciklus fázisokra jellemző gének kifejeződése is megnő a tenyészet egészének vizsgálata során [74]. A sejtciklusgének fázisfüggetlen expresszió-fokozódása viszont ezen gének minden

sejtciklusfázisban megfigyelt – jelen dolgozat IV.1.4. alfejezetében bemutatott – magasabb expressziójának következménye [212].

Az ACC malignitás mintázatának és az NCI-H295R ACC sejtvonal sejtciklusfüggő transzkripciós programjának metszetébe tartozó gének közül a ribonukleotid reduktáz M2 alegységét kódoló *RRM2* gén mutatta a legnagyobb expressziós változást S és G1 sejtciklus fázisok között. A metszetbe tartozó gének közül az *RRM2* és az *ASPM* gén kifejeződése fokozódott ACC-ben ACA-hoz viszonyítva mindhárom microarray tanulmány esetében [196-198]. Amíg az ASPM (abnormal spindle-like microcephaly-associated) megváltozott formáit autószómális recesszív primer microcephaliával hozták összefüggésbe, emelkedett expresszióját számos daganattípusban, ACC [196-198] mellett emlőrákban [235] és gliobasztómában [236] is leírták. Az aromatáz-gátló terápia következtében észlelt ASPM expresszió-változásnak jó prediktív értéke van emlőrákban [235]. Horvath és munkatársai a különböző jelátviteli útvonalak elemzésével azonosította az ASPM-t mint a glioblasztóma patogenezisében kulcsfontosságú faktort [236]. Tanulmányuk szerint az ASPM a mutáns EGF-receptortól induló jelátviteli útvonal kiemelt tagja, amely potenciálisan gátolható az EGF receptor tirozin-kináz-gátló erlotinib alkalmazásával [236]. Az erlotinib alkalmazása ugyanakkor csupán korlátozott eredménnyel bírt progresszív ACC terápiarefrakter eseteiben [234].

További vizsgálatokat az RRM2-vel kapcsolatban végeztünk. Az RRM2 a ribonukleotid reduktáz (RR) enzimkomplex alkotója, amely a ribonukleotid-dezoxiribonukleotid átalakulás katalizálásán keresztül [237] a DNS szintézis sebességének egyik meghatározója [238]. Génje evolúciósan egy transzlációsan szigorúan szabályozott szakaszon kódolt [239], amelynek komoly szerepe van az RRM2 S-fázis-függő aktivitásának kialakításában [214, 240]. A transzláció szabályozása mellett az RRM2 viszonylag rövid féléletideje is hozzájárul a fehérje sejtciklusfüggő aktivitásához [240].

A fentiek alapján – immunhisztokémiai módszerrel – vizsgáltuk az RRM2 mint az osztódó alakokra jellemző fehérje expresszióját humán ACC szövetekben. A korlátozott

esetszámon végzett vizsgálatunkban erős pozitív korrelációt tapasztaltam a Ki-67 és az RRM2 fehérjék kifejeződése között az egyes ACC-s minták esetében. A fenti megfigyelések – nagyobb esetszámon végzett hasonló megerősítő eredmények esetén – felvetik az RRM2 fehérje kifejeződés vizsgálatának jelentőségét az ACC hisztopatológiai diagnózisában. Korábbi vizsgálatok igazolták az RRM2 mint proliferációs marker fontosságát vastagbélrákban [241, 242], emlőrákban [243, 244], nem-kissejtes tüdőrákban [211] és hepatocelluláris karcinómában [245]. Az említett tanulmányok megerősítették a magas RRM2 expresszió a betegség rosszabb prognózisával való összefüggését is [211, 242, 244].

V.4. Daganatellenes gyógyszerek hatása NCI-H295R humán ACC sejtvonalra

Mivel igazoltam, hogy az RRM2 expresszió kitűnő proliferációs marker ACC-ben és korábbi eredmények a daganatellenes kezelések egyik molekuláris célpontjaként azonosították az RRM2-t [243, 244], megfigyeléseim kiterjedtek néhány daganatellenes szer hatásának vizsgálatára NCI-H295R humán ACC sejtvonalon. Tanulmányoztam a gemcitabin, a mitotán és a 9-cisz-retinsav önálló és kombinációs adagolásának az NCI-H295R sejtek proliferációjára, apoptózisára, a sejtciklus fázisainak eloszlására, valamint az RRM2 expresszióra gyakorolt hatását. Mindegyik kezelés csökkentette ugyan az NCI-H295R a sejtek proliferációját, a gemcitabin kezelés már rövidebb ideig alkalmazva és nagyobb mértékben vetette vissza a sejtproliferációt. Ennek hátterében a gemcitabin apoptózist serkentő szerepe állhat [204]. Munkacsoportunk korábbi eredményeit alátámasztva, igazoltuk a mitotán és a 9-cisz-retinsav sejtproliferációt csökkentő hatásait [205, 206, 246]. Mivel egy korábbi, a gemcitabin hatásait az NCI-H295R sejtvonalon vizsgáló közleményben nem elemezték a gemcitabin szteroid termelésre gyakorolt hatását, ezért megvizsgáltuk, hogyan befolyásolja a gemcitabin az NCI-H295R sejtek kortizoltermelését. Míg a mitotán esetében sikerült kimutatnunk a korábbiakban már igazolt adrenolítikus hatást [205], a gemcitabin nem befolyásolta az NCI-H295R sejtvonal

kortizoltermelését. A sejtciklus fázisainak eloszlását célzó vizsgálataim a G1 fázisú sejtek arányának megnövekedésével igazolták a gemcitabin korai S-fázist gátló hatását [204]. A mitotán és a 9-cisz-retinsav emelte a G2 fázisú sejtek arányát, a kombinált, 24 órás kezelés hatására a sejtek majdnem 30%-a tartózkodott a G2 fázisban. Ez az eredmény is egybecseng a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a mitotán a G2 fázist gátolja [247, 248], míg a 9-cisz-retinsav a sejtciklus G2/M átmenetet moduláló szerepe is hozzájárul a daganatellenes hatásának kialakításához [199, 206].

A következő lépésben az említett daganatellenes szerekkel történő kezelések RRM2 expresszióra gyakorolt hatását vizsgáltam. A gemcitabin esetében ennek külön jelentőséget adott az a tény, hogy a gemcitabin kifejezetten a ribonukleotid reduktáz enzimkomplex gátlásán keresztül is fejti ki antiproliferatív hatását [249]. A G1 fázisú sejtek arányának növekedése ugyan az RRM2 kifejeződés csökkenésének irányába hat, a gemcitabin alkalmazása egyedül és kombinációban mRNS és fehérjeszinten is számottevően emelte az RRM2 expressziót. Ez a megfigyelés is alátámasztja azokat korábbi adatokat, amelyek egy másik RR alkotórész, az RRM1 expresszió növekedését írták le gemcitabin kezelés hatására NCI-H295R sejtvonalon [204]. Nakamura és munkatársainak korábbi eredménye szerint a kezelést megelőző magasabb RRM1 expresszió a gemcitabinra adott terápiás válasz korlátozottabb hatékonyságát vonja maga után az epeutak rosszindulatú daganatában [250]. Emellett, a kis interferáló RNS (small interfering RNA – siRNS) és miRNS mediálta RRM2-csendesítés visszaállítja a daganatok gemcitabin-szenzitivitását hasnyálmirigyrákban [251, 252]. A fentiek alapján arra következtetünk, hogy a gemcitabin kezelés következtében létrejövő RRM2 expresszió-fokozódás egy gemcitabinnal szemben kialakuló kemorezisztencia következménye. Ez magyarázhatja a gemcitabin relatív hatástalanságát az ACC terápiájában [234]. A kemorezisztencia letörése (akár miRNS-k alkalmazásával) előfeltétele a gemcitabin sikeres alkalmazhatóságának ACC-ben. A mitotán és a 9-cisz-retinsav alkalmazása ugyan csökkentette a proliferációt, de nem változtatta az RRM2 kifejeződését ezen viszonylag rövid időtartamú kezelések hatására. A jövőben érdemes lehet az RRM2 kifejeződés vizsgálata hosszabb távú xenograft

modelleken is annak megállapítása céljából, hogy a proliferáció milyen mérvű és mennyi ideig tartó csökkenése esetén figyelhető meg az RRM2 expresszió csökkenése.

VI. Következtetések

Doktori munkám során végzett vizsgálataim eredményeiből az alábbi következtetéseket lehet levonni:

1. A sejtciklus szerinti sejtválogatás segítségével – a korábbi, szinkronizáláson alapuló módszerekhez képest kevesebb műterméket okozva – a sejtciklus működését optimálisan tudtam vizsgálni. Megfigyeléseim alátámasztották a sejtciklusfüggő transzkripciós program már ismert tagjainak expressziós változásait több sejttípusban is. Korábban már leírták, hogy a sejtciklusfüggő transzkripciós program génjei a daganatok malignitás mintázatában fokozottan expresszálódnak. Eredményeim alapján ennek hátterében fázisfüggő és fázisfüggetlen expresszió-fokozódást is valószínűsítek. Azt is feltételezem, hogy a tumoros sejtekben észlelt, a sejtciklusfüggő transzkripciós programot érintő, a sejtciklus fázisai között észlelt alacsonyabb expressziós különbségek a malignus transzformáció következményei lehetnek.

2. A vizsgált három sejttípus különböző fázisú sejtjein végzett három nagy áteresztőképességű és egyedi miRNS expressziós méréseink eredményeiből arra következtetünk, hogy dinamikus miRNS expressziós változások nem játszanak szerepet a sejtciklus szabályozásában a G1/S és S/G2 átmenetekben.

3. Az ACC malignitás mintázatának és az NCI-H295R humán ACC sejtvonal sejtciklusfüggő transzkripciós programjának összehasonlításával azonosítottam az RRM2-t mint az ACC új proliferációs markerét. Immunhisztokémiai vizsgálataink megerősítették az RRM2 proliferációs markerként való alkalmazhatóságát ACC-ben.

4. A gemcitabin citotoxikus és a sejtciklusra gyakorolt hatásait sikerült validálnunk NCI-H295R sejtvonalon. A gemcitabin egyik molekuláris célpontjaként azonosított RRM2 kifejeződésének a gemcitabin kezelés következtében kialakuló kifejezett emelkedése feltételezhetően egy kialakuló kemorezisztencia jele. Ennek a kemorezisztenciának a letörése előfeltétele a gemcitabin sikeres alkalmazhatóságának ACC-ben.

VII. Összefoglalás

A sejtciklusfüggő transzkripciós program vizsgálatában a legelterjedtebben alkalmazott módszer, a szinkronizálás során a sejttenyészeteket a sejtciklus gátlószereivel kezelik és a sejtek időfüggő, ciklikus változásait vizsgálják. A szinkronizálás azonban számos stressz-folyamatot indukál, így a fiziológiás sejtciklus optimális vizsgálatához új módszerekre van szükség. Ph.D. doktori munkámban viábilis DNS-festék alkalmazásával, a sejtek DNS-tartalma alapján válogattam szét a sejteket fluoreszcencia aktiválta áramlási citometria módszerrel, amely a sejtek élettani folyamatait kevésbé befolyásolja. A szétválogatott mintákon végzett nagy áteresztőképességű mRNS és miRNS expressziós mérésekkel megerősítettem a szinkronizálással leírt humán sejtciklusfüggő génexpressziós programot és rávilágítottam a sejtciklus eddig ismeretlen dinamikai tényezőire. A humán primer nem-transzfromált fibroblasztok és a tumorosan transzformált humán sejtvonalak (HeLa méhnyakrák és NCI-H295R mellékvesekéreg-karcinóma (ACC)) összehasonlításával azt tapasztaltam, hogy az univerzális sejtciklusgének expressziója minden vizsgált fázisban magasabb, és az expresszió-változások nagysága kisebb a tumorsejtekben, mint a primer, nem-transzformált sejtekben. A sejtciklus fázisai között a miRNS expresszióban nem mutatkoztak validálható különbségek, így a G1/S és S/G2 fázis-átmeneteket valószínűleg stabil miRNS expressziós mintázat jellemzi. Az ACC génexpressziós malignitás mintázatának és az NCI-H295R ACC sejtvonal sejtciklusfüggő transzkripciós programjának összehasonlításával új proliferációs biomarkert és potenciális gyógyszer támadáspontot azonosítottam. A két halmaz metszetébe tartozó ribonukleotid reduktáz M2 altípusa (RRM2) fehérje kifejeződése és a Ki-67 index között erős pozitív korreláció mutatkozott humán ACC mintákon, így felvetődik az RRM2 expresszió vizsgálatának lehetősége az ACC hisztopatológiai diagnózisában. *In vitro* kísérleteim során megállapítottam, hogy a ribonukleotid reduktáz komplexet is célzó gemcitabin szignifikánsan csökkenti az NCI-H295R sejtek proliferációját, növeli az apoptotikus sejtek, valamint a G1 fázisú sejtek arányát, és növeli az RRM2 expressziót. Utóbbi feltételezhetően egy, a gemcitabinnal szemben kialakuló kemorezisztencia következménye, ami alátámasztja a gemcitabin korlátozott klinikai hatékonyságát ACC-ben.

VIII. Summary

Synchronization is the most widely used method for analyzing the cell cycle dependent transcription program. After removal of the synchronization agent, time course gene expression data followed by bioinformatics analysis is needed for the description of cell cycle dependent mechanisms. However, synchronization results in molecular stress and alteration of the cell cycle machinery, therefore novel methods are needed for the optimal analysis of the cell cycle. In my Ph.D. thesis, I have presented a cell cycle sorting method, an optimized DNA content based fluorescence activated cell sorting procedure for the proper analysis of the cell cycle. High-throughput gene expression profiling confirmed the previously detected cell cycle dependent transcription program, moreover, some novel aspects regarding the dynamics of cell cycle dependent gene expression have been found. In particular, universal cell cycle genes are characterised with higher levels of expression in all cell cycle phases, and lower levels of dynamical gene expression changes between cell cycle phases in human cancer (NCI-H295R – adrenocortical cancer (ACC) and HeLa – cervical) compared to primary, untransformed (fibroblast) cells. Comparative analysis of three high-throughput miRNA expression methods failed to detect any cell cycle dependently expressed miRNAs, therefore we may conclude that miRNA expression is quite stable during cell cycle phases G1/S and S/G2. Upon the comparative analysis of the ACC malignancy signature with the cell cycle dependent transcription program of human ACC cell line NCI-H295R, I have identified ribonucleotide reductase M2 (RRM2), a member of the ribonucleotide reductase (RR) complex as a novel biomarker of proliferation in ACC. Immunohistochemical analysis confirmed the strong positive correlation between RRM2 expression and Ki-67 proliferation index in human ACC samples. During an *in vitro* approach, I have established that gemcitabine targeting the RR complex significantly inhibited the proliferation of NCI-H295R cells, and increased the rate of apoptotic and G1 phase cells. It also increased the expression of RRM2, which might be a consequence of an emerging chemoresistance against gemcitabine explaining its limited therapeutical effect in ACC. This chemoresistance should be overcome for successful clinical utilization of gemcitabine in ACC.

IX. Irodalomjegyzék

1. Johnson A Skotheim JM. (2013) Start and the restriction point. Curr Opin Cell Biol, 25(6): 717-23.
2. Nigg EA Stearns T. (2011) The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. Nat Cell Biol, 13(10): 1154-60.
3. Hinchcliffe EH. (2014) Centrosomes and the art of mitotic spindle maintenance. Int Rev Cell Mol Biol, 313: 179-217.
4. Godek KM, Kabeche L, Compton DA. (2015) Regulation of kinetochore-microtubule attachments through homeostatic control during mitosis. Nat Rev Mol Cell Biol, 16(1): 57-64.
5. Kotak S Gonczy P. (2013) Mechanisms of spindle positioning: cortical force generators in the limelight. Curr Opin Cell Biol, 25(6): 741-8.
6. Evans T, Rosenthal ET, Youngblom J, Distel D, Hunt T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. Cell, 33(2): 389-96.
7. Nurse P, Thuriaux P, Nasmyth K. (1976) Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. Mol Gen Genet, 146(2): 167-78.
8. Lee MG Nurse P. (1987) Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. Nature, 327(6117): 31-5.
9. Hartwell LH Weinert TA. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. Science, 246(4930): 629-34.
10. Grana X, Garriga J, Mayol X. (1998) Role of the retinoblastoma protein family, pRB, p107 and p130 in the negative control of cell growth. Oncogene, 17(25): 3365-83.
11. Sherr CJ. (1995) D-type cyclins. Trends Biochem Sci, 20(5): 187-90.
12. DeGregori J Johnson DG. (2006) Distinct and Overlapping Roles for E2F Family Members in Transcription, Proliferation and Apoptosis. Curr Mol Med, 6(7): 739-48.

13. Tsai LH, Harlow E, Meyerson M. (1991) Isolation of the human cdk2 gene that encodes the cyclin A- and adenovirus E1A-associated p33 kinase. Nature, 353(6340): 174-7.
14. Rosenblatt J, Gu Y, Morgan DO. (1992) Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. Proc Natl Acad Sci U S A, 89(7): 2824-8.
15. Ito M. (2000) Factors controlling cyclin B expression. Plant Mol Biol, 43(5-6): 677-90.
16. Hershko A. (1999) Mechanisms and regulation of the degradation of cyclin B. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 354(1389): 1571-5; discussion 1575-6.
17. Kozar K Sicinski P. (2005) Cell cycle progression without cyclin D-CDK4 and cyclin D-CDK6 complexes. Cell Cycle, 4(3): 388-91.
18. Gladden AB Diehl JA. (2003) Cell cycle progression without cyclin E/CDK2: breaking down the walls of dogma. Cancer Cell, 4(3): 160-2.
19. Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. (2008) CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. Dev Cell, 14(2): 159-69.
20. Ivanchuk SM, Mondal S, Dirks PB, Rutka JT. (2001) The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. J Neurooncol, 51(3): 219-29.
21. Morla AO, Draetta G, Beach D, Wang JY. (1989) Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis. Cell, 58(1): 193-203.
22. Krek W Nigg EA. (1991) Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. EMBO J, 10(11): 3331-41.
23. Parker LL, Atherton-Fessler S, Lee MS, Ogg S, Falk JL, Swenson KI, Piwnica-Worms H. (1991) Cyclin promotes the tyrosine phosphorylation of p34cdc2 in a wee1+ dependent manner. EMBO J, 10(5): 1255-63.

24. Lee MS, Ogg S, Xu M, Parker LL, Donoghue DJ, Maller JL, Piwnica-Worms H. (1992) cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. Mol Biol Cell, 3(1): 73-84.
25. Sherr CJ Roberts JM. (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev, 9(10): 1149-63.
26. Ravitz MJ Wenner CE. (1997) Cyclin-dependent kinase regulation during G1 phase and cell cycle regulation by TGF-beta. Adv Cancer Res, 71: 165-207.
27. O'Connell MJ, Walworth NC, Carr AM. (2000) The G2-phase DNA-damage checkpoint. Trends Cell Biol, 10(7): 296-303.
28. Lee JH Paull TT. (2007) Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. Oncogene, 26(56): 7741-8.
29. Jia L, Kim S, Yu H. (2013) Tracking spindle checkpoint signals from kinetochores to APC/C. Trends Biochem Sci, 38(6): 302-11.
30. Muller-Tidow C, Metzger R, Kugler K, Diederichs S, Idos G, Thomas M, Dockhorn-Dworniczak B, Schneider PM, Koeffler HP, Berdel WE, Serve H. (2001) Cyclin E is the only cyclin-dependent kinase 2-associated cyclin that predicts metastasis and survival in early stage non-small cell lung cancer. Cancer Res, 61(2): 647-53.
31. Bahnassy AA, Zekri AR, El-Houssini S, El-Shehaby AM, Mahmoud MR, Abdallah S, El-Serafi M. (2004) Cyclin A and cyclin D1 as significant prognostic markers in colorectal cancer patients. BMC Gastroenterol, 4: 22.
32. Shih HC, Shiozawa T, Kato K, Imai T, Miyamoto T, Uchikawa J, Nikaido T, Konishi I. (2003) Immunohistochemical expression of cyclins, cyclin-dependent kinases, tumor-suppressor gene products, Ki-67, and sex steroid receptors in endometrial carcinoma: positive staining for cyclin A as a poor prognostic indicator. Hum Pathol, 34(5): 471-8.
33. Takeno S, Noguchi T, Kikuchi R, Uchida Y, Yokoyama S, Muller W. (2002) Prognostic value of cyclin B1 in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Cancer, 94(11): 2874-81.

34. Cooper WA, Kohonen-Corish MR, McCaughan B, Kennedy C, Sutherland RL, Lee CS. (2009) Expression and prognostic significance of cyclin B1 and cyclin A in non-small cell lung cancer. Histopathology, 55(1): 28-36.
35. Sung WW, Lin YM, Wu PR, Yen HH, Lai HW, Su TC, Huang RH, Wen CK, Chen CY, Chen CJ, Yeh KT. (2014) High nuclear/cytoplasmic ratio of Cdk1 expression predicts poor prognosis in colorectal cancer patients. BMC Cancer, 14: 951.
36. Gyorffy B, Surowiak P, Budczies J, Lanczky A. (2013) Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. PLoS One, 8(12): e82241.
37. Xi Q, Huang M, Wang Y, Zhong J, Liu R, Xu G, Jiang L, Wang J, Fang Z, Yang S. (2015) The expression of CDK1 is associated with proliferation and can be a prognostic factor in epithelial ovarian cancer. Tumour Biol, 36(7): 4939-48.
38. Kim SJ, Masuda N, Tsukamoto F, Inaji H, Akiyama F, Sonoo H, Kurebayashi J, Yoshidome K, Tsujimoto M, Takei H, Masuda S, Nakamura S, Noguchi S. (2014) The cell cycle profiling-risk score based on CDK1 and 2 predicts early recurrence in node-negative, hormone receptor-positive breast cancer treated with endocrine therapy. Cancer Lett, 355(2): 217-23.
39. Velasco-Velazquez MA, Li Z, Casimiro M, Loro E, Homsi N, Pestell RG. (2011) Examining the role of cyclin D1 in breast cancer. Future Oncol, 7(6): 753-65.
40. Govatati S, Singamsetty GK, Nallabelli N, Malempati S, Rao PS, Madamchetty VK, Govatati S, Kanapuram R, Narayana N, Bhanoori M, Kassetty K, Nallanchakravarthula V. (2014) Contribution of cyclin D1 (CCND1) and E-cadherin (CDH1) alterations to colorectal cancer susceptibility: a case-control study. Tumour Biol, 35(12): 12059-67.
41. Costa-Guda J Arnold A. (2014) Genetic and epigenetic changes in sporadic endocrine tumors: parathyroid tumors. Mol Cell Endocrinol, 386(1-2): 46-54.
42. Wolowiec D, Mekki Y, Ffrench P, Manel AM, Bertrand Y, Rimokh R, Philippe N, Bryon PA, Ffrench M. (1996) Differential expression of cell proliferation regulatory proteins in B- and T-lineage acute lymphoblastic leukaemias. Br J Haematol, 95(3): 518-23.

43. Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, Yokozaki H, Semba S, Shimamoto F, Tahara E. (1996) Expression of cyclin E in human gastric adenomas and adenocarcinomas: correlation with proliferative activity and p53 status. J Exp Ther Oncol, 1(2): 88-94.
44. Tissier F, Louvel A, Grabar S, Hagnere AM, Bertherat J, Vacher-Lavenu MC, Dousset B, Chapuis Y, Bertagna X, Gicquel C. (2004) Cyclin E correlates with malignancy and adverse prognosis in adrenocortical tumors. Eur J Endocrinol, 150(6): 809-17.
45. Zhou Q, He Q, Liang LJ. (2003) Expression of p27, cyclin E and cyclin A in hepatocellular carcinoma and its clinical significance. World J Gastroenterol, 9(11): 2450-4.
46. Li JQ, Miki H, Ohmori M, Wu F, Funamoto Y. (2001) Expression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 correlates with metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. Hum Pathol, 32(9): 945-53.
47. Nar A, Ozen O, Tutuncu NB, Demirhan B. (2012) Cyclin A and cyclin B1 overexpression in differentiated thyroid carcinoma. Med Oncol, 29(1): 294-300.
48. van Diest PJ, van der Wall E, Baak JP. (2004) Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. J Clin Pathol, 57(7): 675-81.
49. Li JQ, Kubo A, Wu F, Usuki H, Fujita J, Bandoh S, Masaki T, Saoo K, Takeuchi H, Kobayashi S, Imaida K, Maeta H, Ishida T, Kuriyama S. (2003) Cyclin B1, unlike cyclin G1, increases significantly during colorectal carcinogenesis and during later metastasis to lymph nodes. Int J Oncol, 22(5): 1101-10.
50. Santala S, Talvensaari-Mattila A, Soini Y, Santala M. (2015) Prognostic value of cyclin B in endometrial endometrioid adenocarcinoma. Tumour Biol, 36(2): 953-7.
51. Chae SW, Sohn JH, Kim DH, Choi YJ, Park YL, Kim K, Cho YH, Pyo JS, Kim JH. (2011) Overexpressions of Cyclin B1, cdc2, p16 and p53 in human breast cancer: the clinicopathologic correlations and prognostic implications. Yonsei Med J, 52(3): 445-53.
52. Poomsawat S, Buajeeb W, Khovidhunkit SO, Punyasingh J. (2010) Alteration in the expression of cdk4 and cdk6 proteins in oral cancer and premalignant lesions. J Oral Pathol Med, 39(10): 793-9.

53. Lindberg D, Hessman O, Akerstrom G, Westin G. (2007) Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) expression in pancreatic endocrine tumors. Neuroendocrinology, 86(2): 112-8.

54. Wikman H, Nymark P, Vayrynen A, Jarmalaite S, Kallioniemi A, Salmenkivi K, Vainio-Siukola K, Husgafvel-Pursiainen K, Knuutila S, Wolf M, Anttila S. (2005) CDK4 is a probable target gene in a novel amplicon at 12q13.3-q14.1 in lung cancer. Genes Chromosomes Cancer, 42(2): 193-9.

55. Jiang Q, Mai C, Yang H, Wu Q, Hua S, Yan C, Long Y, Zhang Y, Long X, Fang W, Liu Z. (2014) Nuclear expression of CDK4 correlates with disease progression and poor prognosis in human nasopharyngeal carcinoma. Histopathology, 64(5): 722-30.

56. Al-Aynati MM, Radulovich N, Ho J, Tsao MS. (2004) Overexpression of G1-S cyclins and cyclin-dependent kinases during multistage human pancreatic duct cell carcinogenesis. Clin Cancer Res, 10(19): 6598-605.

57. Kawana H, Tamaru J, Tanaka T, Hirai A, Saito Y, Kitagawa M, Mikata A, Harigaya K, Kuriyama T. (1998) Role of p27Kip1 and cyclin-dependent kinase 2 in the proliferation of non-small cell lung cancer. Am J Pathol, 153(2): 505-13.

58. Egilmez R, Elagoz S, Kanik EA. (2001) Cdk1/P34Cdc2 and P21waf expression in colorectal adenomas and carcinomas. J Exp Clin Cancer Res, 20(4): 549-52.

59. Migaldi M, Sgambato A, Garagnani L, Ardito R, Ferrari P, De Gaetani C, Cittadini A, Trentini GP. (2000) Loss of p21Waf1 expression is a strong predictor of reduced survival in primary superficial bladder cancers. Clin Cancer Res, 6(8): 3131-8.

60. Galmozzi F, Rubagotti A, Romagnoli A, Carmignani G, Perdelli L, Gatteschi B, Boccardo F. (2006) Prognostic value of cell cycle regulatory proteins in muscle-infiltrating bladder cancer. J Cancer Res Clin Oncol, 132(12): 757-64.

61. Nam EJ Kim YT. (2008) Alteration of cell-cycle regulation in epithelial ovarian cancer. Int J Gynecol Cancer, 18(6): 1169-82.

62. Skomedal H, Kristensen GB, Lie AK, Holm R. (1999) Aberrant expression of the cell cycle associated proteins TP53, MDM2, p21, p27, cdk4, cyclin D1, RB, and EGFR in cervical carcinomas. Gynecol Oncol, 73(2): 223-8.

63. Huang LW, Chou YY, Chao SL, Chen TJ, Lee TT. (2001) p53 and p21 expression in precancerous lesions and carcinomas of the uterine cervix: overexpression of p53 predicts poor disease outcome. Gynecol Oncol, 83(2): 348-54.

64. Kobayashi S, Matsushita K, Isono K. (1998) [Messenger RNA expression of p21WAF1/CIP1 in colorectal carcinoma tissues]. Nihon Geka Gakkai Zasshi, 99(7): 457-62.

65. Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, Veronese A, Sabbioni S, Calin GA, Grazi GL, Giovannini C, Croce CM, Bolondi L, Negrini M. (2008) MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. Oncogene, 27(43): 5651-61.

66. Guo Y, Sklar GN, Borkowski A, Kyprianou N. (1997) Loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) protein in human prostate cancer correlates with tumor grade. Clin Cancer Res, 3(12 Pt 1): 2269-74.

67. Catzavelos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM. (1997) Decreased levels of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. Nat Med, 3(2): 227-30.

68. Rosenblatt R, Jonmarker S, Lewensohn R, Egevad L, Sherif A, Kalkner KM, Nilsson S, Valdman A, Ullen A. (2008) Current status of prognostic immunohistochemical markers for urothelial bladder cancer. Tumour Biol, 29(5): 311-22.

69. Kim YT Zhao M. (2005) Aberrant cell cycle regulation in cervical carcinoma. Yonsei Med J, 46(5): 597-613.

70. Fiorentino M, Altimari A, D'Errico A, Cukor B, Barozzi C, Loda M, Grigioni WF. (2000) Acquired expression of p27 is a favorable prognostic indicator in patients with hepatocellular carcinoma. Clin Cancer Res, 6(10): 3966-72.

71. Belluco C, Esposito G, Bertorelle R, Del Mistro A, Fassina A, Vieceli G, Chieco-Bianchi L, Nitti D, Lise M. (1999) Absence of the cell cycle inhibitor p27Kip1 protein predicts poor outcome in patients with stage I-III colorectal cancer. Ann Surg Oncol, 6(1): 19-25.

72. Hayashi H, Ogawa N, Ishiwa N, Yazawa T, Inayama Y, Ito T, Kitamura H. (2001) High cyclin E and low p27/Kip1 expressions are potentially poor prognostic factors in lung adenocarcinoma patients. Lung Cancer, 34(1): 59-65.
73. Cho RJ, Huang M, Campbell MJ, Dong H, Steinmetz L, Sapinoso L, Hampton G, Elledge SJ, Davis RW, Lockhart DJ. (2001) Transcriptional regulation and function during the human cell cycle. Nat Genet, 27(1): 48-54.
74. Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, Murray JI, Ball CA, Alexander KE, Matese JC, Perou CM, Hurt MM, Brown PO, Botstein D. (2002) Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. Mol Biol Cell, 13(6): 1977-2000.
75. Bar-Joseph Z, Siegfried Z, Brandeis M, Brors B, Lu Y, Eils R, Dynlacht BD, Simon I. (2008) Genome-wide transcriptional analysis of the human cell cycle identifies genes differentially regulated in normal and cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 105(3): 955-60.
76. Yoshizawa-Sugata N Masai H. (2014) Cell cycle synchronization and flow cytometry analysis of mammalian cells. Methods Mol Biol, 1170: 279-93.
77. Stumpf CR, Moreno MV, Olshen AB, Taylor BS, Ruggero D. (2013) The translational landscape of the mammalian cell cycle. Mol Cell, 52(4): 574-82.
78. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, Schuler G, Moore T, Lee JC, Trent JM, Staudt LM, Hudson J, Jr., Boguski MS, Lashkari D, Shalon D, Botstein D, Brown PO. (1999) The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. Science, 283(5398): 83-7.
79. Tobey RA, Valdez JG, Crissman HA. (1988) Synchronization of human diploid fibroblasts at multiple stages of the cell cycle. Exp Cell Res, 179(2): 400-16.
80. Gong J, Traganos F, Darzynkiewicz Z. (1995) Growth imbalance and altered expression of cyclins B1, A, E, and D3 in MOLT-4 cells synchronized in the cell cycle by inhibitors of DNA replication. Cell Growth Differ, 6(11): 1485-93.
81. Urbani L, Sherwood SW, Schimke RT. (1995) Dissociation of nuclear and cytoplasmic cell cycle progression by drugs employed in cell synchronization. Exp Cell Res, 219(1): 159-68.

82. Tanaka T, Huang X, Halicka HD, Zhao H, Traganos F, Albino AP, Dai W, Darzynkiewicz Z. (2007) Cytometry of ATM activation and histone H2AX phosphorylation to estimate extent of DNA damage induced by exogenous agents. Cytometry A, 71(9): 648-61.

83. Darzynkiewicz Z, Halicka HD, Zhao H, Podhorecka M. (2011) Cell synchronization by inhibitors of DNA replication induces replication stress and DNA damage response: analysis by flow cytometry. Methods Mol Biol, 761: 85-96.

84. Kishore S, Gruber AR, Jedlinski DJ, Syed AP, Jorjani H, Zavolan M. (2013) Insights into snoRNA biogenesis and processing from PAR-CLIP of snoRNA core proteins and small RNA sequencing. Genome Biol, 14(5): R45.

85. Leman AR, Bristow SL, Haase SB. (2014) Analyzing transcription dynamics during the budding yeast cell cycle. Methods Mol Biol, 1170: 295-312.

86. Walker GM. (1999) Synchronization of yeast cell populations. Methods Cell Sci, 21(2-3): 87-93.

87. Orlando DA, Lin CY, Bernard A, Wang JY, Socolar JE, Iversen ES, Hartemink AJ, Haase SB. (2008) Global control of cell-cycle transcription by coupled CDK and network oscillators. Nature, 453(7197): 944-7.

88. Simmons Kovacs LA, Mayhew MB, Orlando DA, Jin Y, Li Q, Huang C, Reed SI, Mukherjee S, Haase SB. (2012) Cyclin-dependent kinases are regulators and effectors of oscillations driven by a transcription factor network. Mol Cell, 45(5): 669-79.

89. Moore A, Donahue CJ, Bauer KD, Mather JP. (1998) Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. Methods Cell Biol, 57: 265-78.

90. Henderson L, Bortone DS, Lim C, Zambon AC. (2013) Classic "broken cell" techniques and newer live cell methods for cell cycle assessment. Am J Physiol Cell Physiol, 304(10): C927-38.

91. Martin RM, Leonhardt H, Cardoso MC. (2005) DNA labeling in living cells. Cytometry A, 67(1): 45-52.

92. Juan G, Hernando E, Cordon-Cardo C. (2002) Separation of live cells in different phases of the cell cycle for gene expression analysis. Cytometry, 49(4): 170-5.

93. Van der Aa N, Cheng J, Mateiu L, Zamani Esteki M, Kumar P, Dimitriadou E, Vanneste E, Moreau Y, Vermeesch JR, Voet T. (2013) Genome-wide copy number profiling of single cells in S-phase reveals DNA-replication domains. Nucleic Acids Res, 41(6): e66.

94. Bristow SL, Leman AR, Haase SB. (2014) Cell cycle-regulated transcription: effectively using a genomics toolbox. Methods Mol Biol, 1170: 3-27.

95. Hereford LM, Osley MA, Ludwig TR, 2nd, McLaughlin CS. (1981) Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA. Cell, 24(2): 367-75.

96. Cho RJ, Campbell MJ, Winzeler EA, Steinmetz L, Conway A, Wodicka L, Wolfsberg TG, Gabrielian AE, Landsman D, Lockhart DJ, Davis RW. (1998) A genome-wide transcriptional analysis of the mitotic cell cycle. Mol Cell, 2(1): 65-73.

97. Pramila T, Wu W, Miles S, Noble WS, Breeden LL. (2006) The Forkhead transcription factor Hcm1 regulates chromosome segregation genes and fills the S-phase gap in the transcriptional circuitry of the cell cycle. Genes Dev, 20(16): 2266-78.

98. Spellman PT, Sherlock G, Zhang MQ, Iyer VR, Anders K, Eisen MB, Brown PO, Botstein D, Futcher B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast Saccharomyces cerevisiae by microarray hybridization. Mol Biol Cell, 9(12): 3273-97.

99. Rustici G, Mata J, Kivinen K, Lio P, Penkett CJ, Burns G, Hayles J, Brazma A, Nurse P, Bahler J. (2004) Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. Nat Genet, 36(8): 809-17.

100. Peng X, Karuturi RK, Miller LD, Lin K, Jia Y, Kondu P, Wang L, Wong LS, Liu ET, Balasubramanian MK, Liu J. (2005) Identification of cell cycle-regulated genes in fission yeast. Mol Biol Cell, 16(3): 1026-42.

101. Oliva A, Rosebrock A, Ferrezuelo F, Pyne S, Chen H, Skiena S, Futcher B, Leatherwood J. (2005) The cell cycle-regulated genes of Schizosaccharomyces pombe. PLoS Biol, 3(7): e225.

102. Bertoli C, Skotheim JM, de Bruin RA. (2013) Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. Nat Rev Mol Cell Biol, 14(8): 518-28.

103. Bahler J. (2005) Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. Annu Rev Genet, 39: 69-94.

104. Fukuoka M, Uehara A, Niki K, Goto S, Kato D, Utsugi T, Ohtsu M, Murakami Y. (2013) Identification of preferentially reactivated genes during early G1 phase using nascent mRNA as an index of transcriptional activity. Biochem Biophys Res Commun, 430(3): 1005-10.

105. Helin K. (1998) Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. Curr Opin Genet Dev, 8(1): 28-35.

106. Gaubatz S, Lindeman GJ, Ishida S, Jakoi L, Nevins JR, Livingston DM, Rempel RE. (2000) E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. Mol Cell, 6(3): 729-35.

107. Takahashi Y, Rayman JB, Dynlacht BD. (2000) Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. Genes Dev, 14(7): 804-16.

108. Balciunaite E, Spektor A, Lents NH, Cam H, Te Riele H, Scime A, Rudnicki MA, Young R, Dynlacht BD. (2005) Pocket protein complexes are recruited to distinct targets in quiescent and proliferating cells. Mol Cell Biol, 25(18): 8166-78.

109. Beijersbergen RL, Kerkhoven RM, Zhu L, Carlee L, Voorhoeve PM, Bernards R. (1994) E2F-4, a new member of the E2F gene family, has oncogenic activity and associates with p107 in vivo. Genes Dev, 8(22): 2680-90.

110. Eser U, Falleur-Fettig M, Johnson A, Skotheim JM. (2011) Commitment to a cellular transition precedes genome-wide transcriptional change. Mol Cell, 43(4): 515-27.

111. Skotheim JM, Di Talia S, Siggia ED, Cross FR. (2008) Positive feedback of G1 cyclins ensures coherent cell cycle entry. Nature, 454(7202): 291-6.

112. Cartwright P, Muller H, Wagener C, Holm K, Helin K. (1998) E2F-6: a novel member of the E2F family is an inhibitor of E2F-dependent transcription. Oncogene, 17(5): 611-23.

113. de Bruin A, Maiti B, Jakoi L, Timmers C, Buerki R, Leone G. (2003) Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. J Biol Chem, 278(43): 42041-9.

114. Logan N, Graham A, Zhao X, Fisher R, Maiti B, Leone G, La Thangue NB. (2005) E2F-8: an E2F family member with a similar organization of DNA-binding domains to E2F-7. Oncogene, 24(31): 5000-4.

115. Trimarchi JM, Fairchild B, Verona R, Moberg K, Andon N, Lees JA. (1998) E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. Proc Natl Acad Sci U S A, 95(6): 2850-5.

116. Lammens T, Li J, Leone G, De Veylder L. (2009) Atypical E2Fs: new players in the E2F transcription factor family. Trends Cell Biol, 19(3): 111-8.

117. Xu M, Sheppard KA, Peng CY, Yee AS, Piwnica-Worms H. (1994) Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. Mol Cell Biol, 14(12): 8420-31.

118. Dynlacht BD, Flores O, Lees JA, Harlow E. (1994) Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. Genes Dev, 8(15): 1772-86.

119. Krek W, Ewen ME, Shirodkar S, Arany Z, Kaelin WG, Jr., Livingston DM. (1994) Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F-1 by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. Cell, 78(1): 161-72.

120. Trojer P, Cao AR, Gao Z, Li Y, Zhang J, Xu X, Li G, Losson R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Farnham PJ, Reinberg D. (2011) L3MBTL2 protein acts in concert with PcG protein-mediated monoubiquitination of H2A to establish a repressive chromatin structure. Mol Cell, 42(4): 438-50.

121. Xu X, Bieda M, Jin VX, Rabinovich A, Oberley MJ, Green R, Farnham PJ. (2007) A comprehensive ChIP-chip analysis of E2F1, E2F4, and E2F6 in normal and tumor cells reveals interchangeable roles of E2F family members. Genome Res, 17(11): 1550-61.

122. Lim S Kaldis P. (2013) Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation. Development, 140(15): 3079-93.

123. Alvarez-Fernandez M, Halim VA, Aprelia M, Laoukili J, Mohammed S, Medema RH. (2011) Protein phosphatase 2A (B55alpha) prevents premature activation of forkhead transcription factor FoxM1 by antagonizing cyclin A/cyclin-dependent kinase-mediated phosphorylation. J Biol Chem, 286(38): 33029-36.

124. Laoukili J, Kooistra MR, Bras A, Kauw J, Kerkhoven RM, Morrison A, Clevers H, Medema RH. (2005) FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. Nat Cell Biol, 7(2): 126-36.

125. Sadasivam S, Duan S, DeCaprio JA. (2012) The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. Genes Dev, 26(5): 474-89.

126. Wonsey DR Follettie MT. (2005) Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. Cancer Res, 65(12): 5181-9.

127. Chen YJ, Dominguez-Brauer C, Wang Z, Asara JM, Costa RH, Tyner AL, Lau LF, Raychaudhuri P. (2009) A conserved phosphorylation site within the forkhead domain of FoxM1B is required for its activation by cyclin-CDK1. J Biol Chem, 284(44): 30695-707.

128. Laoukili J, Alvarez M, Meijer LA, Stahl M, Mohammed S, Kleij L, Heck AJ, Medema RH. (2008) Activation of FoxM1 during G2 requires cyclin A/Cdk-dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain. Mol Cell Biol, 28(9): 3076-87.

129. Major ML, Lepe R, Costa RH. (2004) Forkhead box M1B transcriptional activity requires binding of Cdk-cyclin complexes for phosphorylation-dependent recruitment of p300/CBP coactivators. Mol Cell Biol, 24(7): 2649-61.

130. Park HJ, Wang Z, Costa RH, Tyner A, Lau LF, Raychaudhuri P. (2008) An N-terminal inhibitory domain modulates activity of FoxM1 during cell cycle. Oncogene, 27(12): 1696-704.

131. Chen D, Pacal M, Wenzel P, Knoepfler PS, Leone G, Bremner R. (2009) Division and apoptosis of E2f-deficient retinal progenitors. Nature, 462(7275): 925-9.

132. Engers R Gabbert HE. (2000) Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. J Cancer Res Clin Oncol, 126(12): 682-92.

133. Rodriguez Fernandez JL, Geiger B, Salomon D, Sabanay I, Zoller M, Ben-Ze'ev A. (1992) Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. J Cell Biol, 119(2): 427-38.

134. Rudiger M. (1998) Vinculin and alpha-catenin: shared and unique functions in adherens junctions. Bioessays, 20(9): 733-40.

135. Shedden K Cooper S. (2002) Analysis of cell-cycle-specific gene expression in human cells as determined by microarrays and double-thymidine block synchronization. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(7): 4379-84.

136. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. (2006) Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. Genes Dev, 20(5): 515-24.

137. Szabo PM, Butz H, Igaz P, Racz K, Hunyady L, Patocs A. (2013) Minireview: miRomics in endocrinology: a novel approach for modeling endocrine diseases. Mol Endocrinol, 27(4): 573-85.

138. Guo D, Barry L, Lin SS, Huang V, Li LC. (2014) RNAa in action: from the exception to the norm. RNA Biol, 11(10): 1221-5.

139. Pasquinelli AE. (2012) MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship. Nat Rev Genet, 13(4): 271-82.

140. Bueno MJ Malumbres M. (2011) MicroRNAs and the cell cycle. Biochim Biophys Acta, 1812(5): 592-601.

141. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. (2007) microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol, 302(1): 1-12.

142. Shenouda SK Alahari SK. (2009) MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? Cancer Metastasis Rev, 28(3-4): 369-78.

143. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(24): 15524-9.

144. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. Proc Natl Acad Sci U S A, 101(9): 2999-3004.

145. Bueno MJ, Gomez de Cedron M, Laresgoiti U, Fernandez-Piqueras J, Zubiaga AM, Malumbres M. (2010) Multiple E2F-induced microRNAs prevent replicative stress in response to mitogenic signaling. Mol Cell Biol, 30(12): 2983-95.

146. Ofir M, Hacohen D, Ginsberg D. (2011) MiR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E. Mol Cancer Res, 9(4): 440-7.

147. Sun G, Shi L, Yan S, Wan Z, Jiang N, Fu L, Li M, Guo J. (2014) MiR-15b targets cyclin D1 to regulate proliferation and apoptosis in glioma cells. Biomed Res Int, 2014: 687826.

148. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, D'Urso L, Pagliuca A, Biffoni M, Labbaye C, Bartucci M, Muto G, Peschle C, De Maria R. (2008) The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. Nat Med, 14(11): 1271-7.

149. Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M. (2008) MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. Cell Res, 18(5): 549-57.

150. Gong J, Li J, Wang Y, Liu C, Jia H, Jiang C, Wang Y, Luo M, Zhao H, Dong L, Song W, Wang F, Wang W, Zhang J, Yu J. (2014) Characterization of microRNA-29 family expression and investigation of their mechanistic roles in gastric cancer. Carcinogenesis, 35(2): 497-506.

151. Wang J, Xu G, Shen F, Kang Y. (2014) miR-132 targeting cyclin E1 suppresses cell proliferation in osteosarcoma cells. Tumour Biol, 35(5): 4859-65.

152. Zhang X, Hu S, Zhang X, Wang L, Zhang X, Yan B, Zhao J, Yang A, Zhang R. (2014) MicroRNA-7 arrests cell cycle in G1 phase by directly targeting CCNE1 in human hepatocellular carcinoma cells. Biochem Biophys Res Commun, 443(3): 1078-84.

153. Luo Q, Li X, Li J, Kong X, Zhang J, Chen L, Huang Y, Fang L. (2013) MiR-15a is underexpressed and inhibits the cell cycle by targeting CCNE1 in breast cancer. Int J Oncol, 43(4): 1212-8.

154. Mussnich P, Raverot G, Jaffrain-Rea ML, Fraggetta F, Wierinckx A, Trouillas J, Fusco A, D'Angelo D. (2015) Downregulation of miR-410 targeting the cyclin B1 gene plays a role in pituitary gonadotroph tumors. Cell Cycle, 14(16): 2590-7.

155. Khan S, Brougham CL, Ryan J, Sahrudin A, O'Neill G, Wall D, Curran C, Newell J, Kerin MJ, Dwyer RM. (2013) miR-379 regulates cyclin B1 expression and is decreased in breast cancer. PLoS One, 8(7): e68753.

156. Feng T, Xu D, Tu C, Li W, Ning Y, Ding J, Wang S, Yuan L, Xu N, Qian K, Wang Y, Qi C. (2015) miR-124 inhibits cell proliferation in breast cancer through downregulation of CDK4. Tumour Biol, 36(8): 5987-97.

157. Lin Y, Wu J, Chen H, Mao Y, Liu Y, Mao Q, Yang K, Zheng X, Xie L. (2012) Cyclin-dependent kinase 4 is a novel target in micoRNA-195-mediated cell cycle arrest in bladder cancer cells. FEBS Lett, 586(4): 442-7.

158. Liu G, Sun Y, Ji P, Li X, Cogdell D, Yang D, Parker Kerrigan BC, Shmulevich I, Chen K, Sood AK, Xue F, Zhang W. (2014) MiR-506 suppresses proliferation and induces senescence by directly targeting the CDK4/6-FOXM1 axis in ovarian cancer. J Pathol, 233(3): 308-18.

159. Wang X, Chen X, Han W, Ruan A, Chen L, Wang R, Xu Z, Xiao P, Lu X, Zhao Y, Zhou J, Chen S, Du Q, Yang H, Zhang X. (2015) miR-200c Targets CDK2 and Suppresses Tumorigenesis in Renal Cell Carcinoma. Mol Cancer Res.

160. Lin Y, Li D, Liang Q, Liu S, Zuo X, Li L, Sun X, Li W, Guo M, Huang Z. (2015) miR-638 regulates differentiation and proliferation in leukemic cells by targeting cyclin-dependent kinase 2. J Biol Chem, 290(3): 1818-28.

161. Afanasyeva EA, Mestdagh P, Kumps C, Vandesompele J, Ehemann V, Theissen J, Fischer M, Zapatka M, Brors B, Savelyeva L, Sagulenko V, Speleman F, Schwab M, Westermann F. (2011) MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival. Cell Death Differ, 18(6): 974-84.

162. Tian RQ, Wang XH, Hou LJ, Jia WH, Yang Q, Li YX, Liu M, Li X, Tang H. (2011) MicroRNA-372 is down-regulated and targets cyclin-dependent kinase 2 (CDK2) and cyclin A1 in human cervical cancer, which may contribute to tumorigenesis. J Biol Chem, 286(29): 25556-63.

163. Glover AR, Zhao JT, Gill AJ, Weiss J, Mugridge N, Kim E, Feeney AL, Ip JC, Reid G, Clarke S, Soon PS, Robinson BG, Brahmbhatt H, MacDiarmid JA, Sidhu SB. (2015) microRNA-7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma. Oncotarget.

164. Zhang Y, Huang W, Ran Y, Xiong Y, Zhong Z, Fan X, Wang Z, Ye Q. (2015) miR-582-5p inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma by targeting CDK1 and AKT3. Tumour Biol.

165. Chen S, Chen X, Xiu YL, Sun KX, Zhao Y. (2015) MicroRNA-490-3P targets CDK1 and inhibits ovarian epithelial carcinoma tumorigenesis and progression. Cancer Lett, 362(1): 122-30.

166. Kim YK, Yu J, Han TS, Park SY, Namkoong B, Kim DH, Hur K, Yoo MW, Lee HJ, Yang HK, Kim VN. (2009) Functional links between clustered microRNAs: suppression of cell-cycle inhibitors by microRNA clusters in gastric cancer. Nucleic Acids Res, 37(5): 1672-81.

167. Prasad R Katiyar SK. (2014) Down-regulation of miRNA-106b inhibits growth of melanoma cells by promoting G1-phase cell cycle arrest and reactivation of p21/WAF1/Cip1 protein. Oncotarget, 5(21): 10636-49.

168. Ouyang Y, Gao P, Zhu B, Chen X, Lin F, Wang X, Wei J, Zhang H. (2015) Downregulation of microRNA-429 inhibits cell proliferation by targeting p27Kip1 in human prostate cancer cells. Mol Med Rep, 11(2): 1435-41.

169. Wang XH, Cai P, Wang MH, Wang Z. (2014) microRNA25 promotes osteosarcoma cell proliferation by targeting the cellcycle inhibitor p27. Mol Med Rep, 10(2): 855-9.

170. Zheng Q, Sheng Q, Jiang C, Shu J, Chen J, Nie Z, Lv Z, Zhang Y. (2014) MicroRNA-452 promotes tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by targeting cyclin-dependent kinase inhibitor 1B. Mol Cell Biochem, 389(1-2): 187-95.

171. Fu Y, Liu X, Zhou N, Du L, Sun Y, Zhang X, Ge Y. (2014) MicroRNA-200b stimulates tumour growth in TGFBR2-null colorectal cancers by negatively regulating p27/kip1. J Cell Physiol, 229(6): 772-82.

172. Rissland OS, Hong SJ, Bartel DP. (2011) MicroRNA destabilization enables dynamic regulation of the miR-16 family in response to cell-cycle changes. Mol Cell, 43(6): 993-1004.

173. Zhou JY, Ma WL, Liang S, Zeng Y, Shi R, Yu HL, Xiao WW, Zheng WL. (2009) Analysis of microRNA expression profiles during the cell cycle in synchronized HeLa cells. BMB Rep, 42(9): 593-8.

174. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. (2013) Update in adrenocortical carcinoma. J Clin Endocrinol Metab, 98(12): 4551-64.

175. Kerkhofs TM, Verhoeven RH, Van der Zwan JM, Dieleman J, Kerstens MN, Links TP, Van de Poll-Franse LV, Haak HR. (2013) Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993. Eur J Cancer, 49(11): 2579-86.

176. Custodio G, Komechen H, Figueiredo FR, Fachin ND, Pianovski MA, Figueiredo BC. (2012) Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil. Mol Cell Endocrinol, 351(1): 44-51.

177. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, et al. (1990) Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. N Engl J Med, 322(17): 1195-201.

178. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. (2006) Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. J Clin Endocrinol Metab, 91(7): 2650-5.

179. Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. (2008) Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. Oncologist, 13(5): 548-61.

180. Li FP Fraumeni JF, Jr. (1969) Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? Ann Intern Med, 71(4): 747-52.

181. Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF, Jr., Li FP. (1998) Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. J Natl Cancer Inst, 90(8): 606-11.

182. Maher ER Reik W. (2000) Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. J Clin Invest, 105(3): 247-52.

183. Nystrom A, Cheetham JE, Engstrom W, Schofield PN. (1992) Molecular analysis of patients with Wiedemann-Beckwith syndrome. II. Paternally derived disomies of chromosome 11. Eur J Pediatr, 151(7): 511-4.

184. Else T. (2012) Association of adrenocortical carcinoma with familial cancer susceptibility syndromes. Mol Cell Endocrinol, 351(1): 66-70.

185. Kikuchi A. (2003) Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. Cancer Sci, 94(3): 225-9.

186. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, Rene-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J. (2005) Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. Cancer Res, 65(17): 7622-7.

187. Bonnet S, Gaujoux S, Launay P, Baudry C, Chokri I, Ragazzon B, Libe R, Rene-Corail F, Audebourg A, Vacher-Lavenu MC, Groussin L, Bertagna X, Dousset B, Bertherat J, Tissier F. (2011) Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. J Clin Endocrinol Metab, 96(2): E419-26.

188. Heaton JH, Wood MA, Kim AC, Lima LO, Barlaskar FM, Almeida MQ, Fragoso MC, Kuick R, Lerario AM, Simon DP, Soares IC, Starnes E, Thomas DG, Latronico AC, Giordano TJ, Hammer GD. (2012) Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and beta-catenin. Am J Pathol, 181(3): 1017-33.

189. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrancois-Martinez AM, Martinez A, Val P. (2010) Constitutive beta-catenin activation induces adrenal

hyperplasia and promotes adrenal cancer development. Hum Mol Genet, 19(8): 1561-76.

190. Anastas JN Moon RT. (2013) WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. Nat Rev Cancer, 13(1): 11-26.

191. Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F, Le Bouc Y. (1994) Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab, 78(6): 1444-53.

192. Drelon C, Berthon A, Ragazzon B, Tissier F, Bandiera R, Sahut-Barnola I, de Joussineau C, Batisse-Lignier M, Lefrancois-Martinez AM, Bertherat J, Martinez A, Val P. (2012) Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. PLoS One, 7(8): e44171.

193. Barlaskar FM, Spalding AC, Heaton JH, Kuick R, Kim AC, Thomas DG, Giordano TJ, Ben-Josef E, Hammer GD. (2009) Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. J Clin Endocrinol Metab, 94(1): 204-12.

194. De Martino MC, van Koetsveld PM, Feelders RA, Sprij-Mooij D, Waaijers M, Lamberts SW, de Herder WW, Colao A, Pivonello R, Hofland LJ. (2012) The role of mTOR inhibitors in the inhibition of growth and cortisol secretion in human adrenocortical carcinoma cells. Endocr Relat Cancer, 19(3): 351-64.

195. Fassnacht M, Berruti A, Baudin E, Demeure MJ, Gilbert J, Haak H, Kroiss M, Quinn DI, Hesseltine E, Ronchi CL, Terzolo M, Choueiri TK, Poondru S, Fleege T, Rorig R, Chen J, Stephens AW, Worden F, Hammer GD. (2015) Linsitinib (OSI-906) versus placebo for patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a double-blind, randomised, phase 3 study. Lancet Oncol, 16(4): 426-35.

196. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, Dousset B, Bertagna X, Clauser E, Bertherat J. (2009) Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. J Clin Oncol, 27(7): 1108-15.

197. Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, Sanders D, Thomas DG, Doherty G, Hammer G. (2009) Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. Clin Cancer Res, 15(2): 668-76.

198. Tombol Z, Szabo PM, Molnar V, Wiener Z, Tolgyesi G, Horanyi J, Riesz P, Reismann P, Patocs A, Liko I, Gaillard RC, Falus A, Racz K, Igaz P. (2009) Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. Endocr Relat Cancer, 16(3): 895-906.

199. Szabo PM, Tamasi V, Molnar V, Andrasfalvy M, Tombol Z, Farkas R, Kovesdi K, Patocs A, Toth M, Szalai C, Falus A, Racz K, Igaz P. (2010) Meta-analysis of adrenocortical tumour genomics data: novel pathogenic pathways revealed. Oncogene, 29(21): 3163-72.

200. Ross JS, Wang K, Rand JV, Gay L, Presta MJ, Sheehan CE, Ali SM, Elvin JA, Labrecque E, Hiemstra C, Buell J, Otto GA, Yelensky R, Lipson D, Morosini D, Chmielecki J, Miller VA, Stephens PJ. (2014) Next-generation sequencing of adrenocortical carcinoma reveals new routes to targeted therapies. J Clin Pathol, 67(11): 968-73.

201. Assie G, Letouze E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, Omeiri H, Rodriguez S, Perlemoine K, Rene-Corail F, Elarouci N, Sbiera S, Kroiss M, Allolio B, Waldmann J, Quinkler M, Mannelli M, Mantero F, Papathomas T, De Krijger R, Tabarin A, Kerlan V, Baudin E, Tissier F, Dousset B, Groussin L, Amar L, Clauser E, Bertagna X, Ragazzon B, Beuschlein F, Libe R, de Reynies A, Bertherat J. (2014) Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. Nat Genet, 46(6): 607-12.

202. Szabo DR, Luconi M, Szabo PM, Toth M, Szucs N, Horanyi J, Nagy Z, Mannelli M, Patocs A, Racz K, Igaz P. (2014) Analysis of circulating microRNAs in adrenocortical tumors. Lab Invest, 94(3): 331-9.

203. Papotti M, Libe R, Duregon E, Volante M, Bertherat J, Tissier F. (2011) The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma. Horm Cancer, 2(6): 333-40.

204. Germano A, Rapa I, Volante M, Lo Buono N, Carturan S, Berruti A, Terzolo M, Papotti M. (2014) Cytotoxic activity of gemcitabine, alone or in combination with mitotane, in adrenocortical carcinoma cell lines. Mol Cell Endocrinol, 382(1): 1-7.

205. Zsippai A, Szabo DR, Tombol Z, Szabo PM, Eder K, Pallinger E, Gaillard RC, Patocs A, Toth S, Falus A, Racz K, Igaz P. (2012) Effects of mitotane on gene expression in the adrenocortical cell line NCI-H295R: a microarray study. Pharmacogenomics, 13(12): 1351-61.

206. Szabo DR, Baghy K, Szabo PM, Zsippai A, Marczell I, Nagy Z, Varga V, Eder K, Toth S, Buzas EI, Falus A, Kovalszky I, Patocs A, Racz K, Igaz P. (2014) Antitumoral effects of 9-cis retinoic acid in adrenocortical cancer. Cell Mol Life Sci, 71(5): 917-32.

207. Tombol Z, Eder K, Kovacs A, Szabo PM, Kulka J, Liko I, Zalatnai A, Racz G, Toth M, Patocs A, Falus A, Racz K, Igaz P. (2010) MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas. Mod Pathol, 23(12): 1583-95.

208. Butz H, Liko I, Czirjak S, Igaz P, Korbonits M, Racz K, Patocs A. (2011) MicroRNA profile indicates downregulation of the TGFbeta pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. Pituitary, 14(2): 112-24.

209. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248-54.

210. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, Wemeau JL, Lecomte-Houcke M, Leteurtre E. (2002) Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. Am J Surg Pathol, 26(12): 1612-9.

211. Mah V, Alavi M, Marquez-Garban DC, Maresh EL, Kim SR, Horvath S, Bagryanova L, Huerta-Yepez S, Chia D, Pietras R, Goodglick L. (2015)

Ribonucleotide reductase subunit M2 predicts survival in subgroups of patients with non-small cell lung carcinoma: effects of gender and smoking status. PLoS One, 10(5): e0127600.

212. Grolmusz VK, Toth EA, Baghy K, Liko I, Darvasi O, Kovalszky I, Matko J, Racz K, Patocs A. (2016) Fluorescence activated cell sorting followed by small RNA sequencing reveals stable microRNA expression during cell cycle progression. BMC Genomics, 17(1): 412.

213. Grolmusz VK, Karászi K, Micsik T, Tóth EA, Mészáros K, Karvaly G, Barna G, Szabó PM, Baghy K, Matkó J, Kovalszky I, Tóth M, Rácz K, Igaz P, Patócs A. (2016) Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. Am J Cancer Res, 6(9): 2041-2053.

214. Eriksson S, Graslund A, Skog S, Thelander L, Tribukait B. (1984) Cell cycle-dependent regulation of mammalian ribonucleotide reductase. The S phase-correlated increase in subunit M2 is regulated by de novo protein synthesis. J Biol Chem, 259(19): 11695-700.

215. Kurose A, Tanaka T, Huang X, Traganos F, Darzynkiewicz Z. (2006) Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage. Cell Prolif, 39(3): 231-40.

216. Mizuno H, Nakanishi Y, Ishii N, Sarai A, Kitada K. (2009) A signature-based method for indexing cell cycle phase distribution from microarray profiles. BMC Genomics, 10: 137.

217. Liu JJ, Chao JR, Jiang MC, Ng SY, Yen JJ, Yang-Yen HF. (1995) Ras transformation results in an elevated level of cyclin D1 and acceleration of G1 progression in NIH 3T3 cells. Mol Cell Biol, 15(7): 3654-63.

218. Wimmel A, Lucibello FC, Sewing A, Adolph S, Muller R. (1994) Inducible acceleration of G1 progression through tetracycline-regulated expression of human cyclin E. Oncogene, 9(3): 995-7.

219. Karn J, Watson JV, Lowe AD, Green SM, Vedeckis W. (1989) Regulation of cell cycle duration by c-myc levels. Oncogene, 4(6): 773-87.

220. Sun H, Lesche R, Li DM, Liliental J, Zhang H, Gao J, Gavrilova N, Mueller B, Liu X, Wu H. (1999) PTEN modulates cell cycle progression and cell survival by regulating phosphatidylinositol 3,4,5,-trisphosphate and Akt/protein kinase B signaling pathway. Proc Natl Acad Sci U S A, 96(11): 6199-204.

221. Vecchione A, Croce CM, Baldassarre G. (2007) Fez1/Lzts1 a new mitotic regulator implicated in cancer development. Cell Div, 2: 24.

222. Yabuta N, Okada N, Ito A, Hosomi T, Nishihara S, Sasayama Y, Fujimori A, Okuzaki D, Zhao H, Ikawa M, Okabe M, Nojima H. (2007) Lats2 is an essential mitotic regulator required for the coordination of cell division. J Biol Chem, 282(26): 19259-71.

223. Leung JY, Ehmann GL, Giangrande PH, Nevins JR. (2008) A role for Myc in facilitating transcription activation by E2F1. Oncogene, 27(30): 4172-9.

224. Dong P, Maddali MV, Srimani JK, Thelot F, Nevins JR, Mathey-Prevot B, You L. (2014) Division of labour between Myc and G1 cyclins in cell cycle commitment and pace control. Nat Commun, 5: 4750.

225. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N, Kawamata M, Kelnar K, Bader AG, Brown D, Ochiya T. (2010) Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. Mol Ther, 18(1): 181-7.

226. Diaz R, Silva J, Garcia JM, Lorenzo Y, Garcia V, Pena C, Rodriguez R, Munoz C, Garcia F, Bonilla F, Dominguez G. (2008) Deregulated expression of miR-106a predicts survival in human colon cancer patients. Genes Chromosomes Cancer, 47(9): 794-802.

227. Guo X, Guo L, Ji J, Zhang J, Zhang J, Chen X, Cai Q, Li J, Gu Q, Liu B, Zhu Z, Yu Y. (2010) miRNA-331-3p directly targets E2F1 and induces growth arrest in human gastric cancer. Biochem Biophys Res Commun, 398(1): 1-6.

228. Stokowy T, Eszlinger M, Swierniak M, Fujarewicz K, Jarzab B, Paschke R, Krohn K. (2014) Analysis options for high-throughput sequencing in miRNA expression profiling. BMC Res Notes, 7: 144.

229. Tam S, de Borja R, Tsao MS, McPherson JD. (2014) Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies. Lab Invest, 94(3): 350-8.

230. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat Rev Genet, 10(1): 57-63.

231. Hausser J, Syed AP, Selevsek N, van Nimwegen E, Jaskiewicz L, Aebersold R, Zavolan M. (2013) Timescales and bottlenecks in miRNA-dependent gene regulation. Mol Syst Biol, 9: 711.

232. Pitts TM, Davis SL, Eckhardt SG, Bradshaw-Pierce EL. (2014) Targeting nuclear kinases in cancer: development of cell cycle kinase inhibitors. Pharmacol Ther, 142(2): 258-69.

233. Sperone P, Ferrero A, Daffara F, Priola A, Zaggia B, Volante M, Santini D, Vincenzi B, Badalamenti G, Intrivici C, Del Buono S, De Francia S, Kalomirakis E, Ratti R, Angeli A, Dogliotti L, Papotti M, Terzolo M, Berruti A. (2010) Gemcitabine plus metronomic 5-fluorouracil or capecitabine as a second-/third-line chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma: a multicenter phase II study. Endocr Relat Cancer, 17(2): 445-53.

234. Quinkler M, Hahner S, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Ritter C, Strasburger C, Allolio B, Fassnacht M. (2008) Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. J Clin Endocrinol Metab, 93(6): 2057-62.

235. Turnbull AK, Arthur LM, Renshaw L, Larionov AA, Kay C, Dunbier AK, Thomas JS, Dowsett M, Sims AH, Dixon JM. (2015) Accurate Prediction and Validation of Response to Endocrine Therapy in Breast Cancer. J Clin Oncol, 33(20): 2270-8.

236. Horvath S, Zhang B, Carlson M, Lu KV, Zhu S, Felciano RM, Laurance MF, Zhao W, Qi S, Chen Z, Lee Y, Scheck AC, Liau LM, Wu H, Geschwind DH, Febbo PG, Kornblum HI, Cloughesy TF, Nelson SF, Mischel PS. (2006) Analysis of oncogenic signaling networks in glioblastoma identifies ASPM as a molecular target. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(46): 17402-7.

237. Elledge SJ, Zhou Z, Allen JB. (1992) Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. Trends Biochem Sci, 17(3): 119-23.

238. Herrick J Sclavi B. (2007) Ribonucleotide reductase and the regulation of DNA replication: an old story and an ancient heritage. Mol Microbiol, 63(1): 22-34.

239. Standart NM, Bray SJ, George EL, Hunt T, Ruderman JV. (1985) The small subunit of ribonucleotide reductase is encoded by one of the most abundant translationally regulated maternal RNAs in clam and sea urchin eggs. J Cell Biol, 100(6): 1968-76.

240. Engstrom Y, Eriksson S, Jildevik I, Skog S, Thelander L, Tribukait B. (1985) Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. J Biol Chem, 260(16): 9114-6.

241. Fang Z, Gong C, Liu H, Zhang X, Mei L, Song M, Qiu L, Luo S, Zhu Z, Zhang R, Gu H, Chen X. (2015) E2F1 promote the aggressiveness of human colorectal cancer by activating the ribonucleotide reductase small subunit M2. Biochem Biophys Res Commun, 464(2): 407-15.

242. Liu X, Zhang H, Lai L, Wang X, Loera S, Xue L, He H, Zhang K, Hu S, Huang Y, Nelson RA, Zhou B, Zhou L, Chu P, Zhang S, Zheng S, Yen Y. (2013) Ribonucleotide reductase small subunit M2 serves as a prognostic biomarker and predicts poor survival of colorectal cancers. Clin Sci (Lond), 124(9): 567-78.

243. Zhang H, Liu X, Warden CD, Huang Y, Loera S, Xue L, Zhang S, Chu P, Zheng S, Yen Y. (2014) Prognostic and therapeutic significance of ribonucleotide reductase small subunit M2 in estrogen-negative breast cancers. BMC Cancer, 14: 664.

244. Putluri N, Maity S, Kommagani R, Creighton CJ, Putluri V, Chen F, Nanda S, Bhowmik SK, Terunuma A, Dorsey T, Nardone A, Fu X, Shaw C, Sarkar TR, Schiff R, Lydon JP, O'Malley BW, Ambs S, Das GM, Michailidis G, Sreekumar A. (2014) Pathway-centric integrative analysis identifies RRM2 as a prognostic marker in breast cancer associated with poor survival and tamoxifen resistance. Neoplasia, 16(5): 390-402.

245. Lee B, Ha SY, Song DH, Lee HW, Cho SY, Park CK. (2014) High expression of ribonucleotide reductase subunit M2 correlates with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. Gut Liver, 8(6): 662-8.

246. Nagy Z, Baghy K, Hunyadi-Gulyas E, Micsik T, Nyiro G, Racz G, Butz H, Perge P, Kovalszky I, Medzihradszky KF, Racz K, Patocs A, Igaz P. (2015) Evaluation of 9-

cis retinoic acid and mitotane as antitumoral agents in an adrenocortical xenograft model. Am J Cancer Res, 5(12): 3645-58.

247. Cerquetti L, Bucci B, Marchese R, Misiti S, De Paula U, Miceli R, Muleti A, Amendola D, Piergrossi P, Brunetti E, Toscano V, Stigliano A. (2008) Mitotane increases the radiotherapy inhibitory effect and induces G2-arrest in combined treatment on both H295R and SW13 adrenocortical cell lines. Endocr Relat Cancer, 15(2): 623-34.

248. Cerquetti L, Sampaoli C, Amendola D, Bucci B, Misiti S, Raza G, De Paula U, Marchese R, Brunetti E, Toscano V, Stigliano A. (2010) Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation. Int J Oncol, 37(2): 493-501.

249. Cerqueira NM, Fernandes PA, Ramos MJ. (2007) Understanding ribonucleotide reductase inactivation by gemcitabine. Chemistry, 13(30): 8507-15.

250. Nakamura J, Kohya N, Kai K, Ohtaka K, Hashiguchi K, Hiraki M, Kitajima Y, Tokunaga O, Noshiro H, Miyazaki K. (2010) Ribonucleotide reductase subunit M1 assessed by quantitative double-fluorescence immunohistochemistry predicts the efficacy of gemcitabine in biliary tract carcinoma. Int J Oncol, 37(4): 845-52.

251. Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE. (2004) RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. Oncogene, 23(8): 1539-48.

252. Bhutia YD, Hung SW, Krentz M, Patel D, Lovin D, Manoharan R, Thomson JM, Govindarajan R. (2013) Differential processing of let-7a precursors influences RRM2 expression and chemosensitivity in pancreatic cancer: role of LIN-28 and SET oncoprotein. PLoS One, 8(1): e53436.

X. A disszertáció témájához kötődő saját publikációk jegyzéke

1. Grolmusz VK, Toth EA, Baghy K, Liko I, Darvasi O, Kovalszky I, Matko J, Racz K, Patocs A. (2016) Fluorescence activated cell sorting followed by small RNA sequencing reveals stable microRNA expression during cell cycle progression. BMC Genomics, 17(1): 412.

2. Grolmusz VK, Karászi K, Micsik T, Tóth EA, Mészáros K, Karvaly G, Barna G, Szabó PM, Baghy K, Matkó J, Kovalszky I, Tóth M, Rácz K, Igaz P, Patócs A. (2016) Cell cycle dependent RRM2 may serve as proliferation marker and pharmaceutical target in adrenocortical cancer. Am J Cancer Res, 6(9): 2041-2053.

XI. A disszertáció témájától független saját publikációk jegyzéke

1. Takács E, Grolmusz VK, Vértessy BG. (2004) A tradeoff between protein stability and conformational mobility in homotrimeric dUTPases. FEBS Letters, 566(1-3): 48-54.

2. Kender Z, Torzsa P, Grolmusz K V, Patócs A, Lichthammer A, Veresné Bálint M, Rácz K, Reismann P. (2012) A metilglioxál metabolizmus szerepe 2-es típusú cukorbetegségben és szövődményeiben. Orvosi Hetilap, 153(15): 574-85.

3. Feldman K, Szappanos A, Butz H, Grolmusz V, Majnik J, Likó I, Kriszt B, Lakatos P, Tóth M, Rácz K, Patócs A. (2012) The rs4844880 polymorphism in the promoter region of the HSD11B1 gene associates with bone mineral density in healthy and postmenopausal osteoporotic women. Steroids, 77(13): 1345-51.

4. Feldman K, Likó I, Nagy Z, Szappanos A, Grolmusz VK, Tóth M, Rácz K, Patócs A. (2013) A 11-ß-hidroxiszteroid-dehidrogenáz enzim jelentősége klinikai kórképekben. Orvosi Hetilap, 154(8): 283-93.

5. Grolmusz VK, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, Patócs A, Rácz K, Reismann P. (2013) Lack of association between C385A functional polymorphism of the fatty acid amide hydrolase gene and polycystic ovary syndrome. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 121(6): 338-42.

6. Kender Z, Fleming T, Kopf S, Torzsa P, Grolmusz V, Herzig S, Schleicher E, Rácz K, Reismann P, Nawroth PP. (2014) Effect of metformin on methylglyoxal metabolism in patients with type 2 diabetes. Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes, 122(5): 316-9.

7. Grolmusz VK, Acs OD, Feldman-Kovács K, Szappanos Á, Stenczer B, Fekete T, Szendei G, Reismann P, Rácz K, Patócs A. (2014) Genetic variants of the HSD11B1 gene promoter may be protective against polycystic ovary syndrome. Molecular Biology Reports, 41(9): 5961-9.

8. Patócs A, Igaz P, Tőke J, Lendvai N, Sarkadi B, Grolmusz V, Butz H, Tóth G, Németh K, Gláz E, Kiss R, Pusztai P, Sármán B, Reismann P, Szücs N, Tóth M, Rácz K. (2016) Örökletes phaechromocytomák és paragangliomák molekuláris genetikai vizsgálatával szerzett hazai tapasztalatok. Magyar Belorvosi Archivum, 69: 83-92.

9. Patócs A, Lendvai NK, Butz H, Liko I, Sapi Z, Szucs N, Toth G, Grolmusz VK, Igaz P, Toth M, Rácz K. (2016) Novel SDHB and TMEM127 Mutations in Patients with Pheochromocytoma/Paraganglioma Syndrome. Pathology and Oncology Research, 22(4): 673-9.

XII. Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni köszönetemet **Prof. Dr. Rácz Károly**, **Prof. Dr. Tóth Miklós** és **Dr. Igaz Péter** tanár uraknak, a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika volt és jelenlegi igazgatóinak, hogy kutatómunkámat mindvégig támogatták. Nagyon köszönöm értékes szakmai tanácsaikat és javaslataikat is, melyek számottevően javították közös publikációink színvonalát!

Nagyon szépen köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Patócs Attila** egyetemi docens úrnak, hogy TDK és PhD munkám témavezetőjeként minden nap számíthattam értékes szakmai tanácsaira, és kérdésfeltevéseire és, hogy mindvégig támogatott és alakította kutatói szemléletem. Köszönöm szakmai és emberi példamutatását is!

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

Köszönöm TDK munkám témavezetőjének, **Dr. Reismann Péter**nek, hogy kutatómunkám kezdetén messzemenően támogatott és segített. Nagyon köszönöm **Dr. Borka Katalin** mindenben támogató szakmai és emberi segítségét!

Nagyon köszönöm az Eötvös Loránd Tudományegyetem Immunológiai Tanszékén **Dr. Matkó János** professzor úr és **Tóth Eszter Angéla** bizalmát, valamint szakmai és gyakorlati segítségét és együttműködését az áramlási citometriás sejtválogatásokkal kapcsolatban.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem I. sz Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében **Dr. Kovalszky Ilona** professzorasszony és munkacsoportja sokrétű segítségét a Western blot és immunhisztokémiai vizsgálatok tekintetében. Köszönöm **Dr. Baghy**

Kornélia és **Karászi Katalin** tanácsait és segítségét! Köszönöm **Dr. Micsik Tamás**nak a mellékvesekéreg-karcinómák metszeteinek immunhisztokémiai kiértékelésében és **Dr. Barna Gábor**nak az áramlási citometriás mérésekben nyújtott hozzáértő segítségét. Nagyon hálás vagyok néhai **Csorba Gézáné, Marica** asszisztensnőnek, aki megismertetett a sejttenyésztés alapjaival és precíz, tiszta, következetes munkájában példát mutatott!

Köszönöm **Dr. Likó István**nak és **Darvasi Ottó**nak a bioinformatikai kiértékelésekben nyújtott segítségüket! Köszönöm **Dr. Karvaly Gellért** és **Dr. Mészáros Katalin** segítségét a szteroid hormonok tömegspektrometriás mérésében! Köszönöm **Dr. Tőke Judit** és **Udvardyné Dr. Galamb Orsolya** munkahelyi opponensek lényeglátó kritikai megjegyzéseit és bölcs tanácsait!

Köszönöm a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika endokrin munkacsoportja minden tagjának valamint az Endokrin Genetikai Laboratórium posztdoktor kutatóinak (**Dr. Butz Henriett**, **Dr. Doleschall Márton**, **Dr. Nyírő Gábor**), volt és jelenlegi PhD hallgatóinak (**Dr. Feldman-Kovács Karolina**, **Dr. Kender Zoltán**, **Dr. Koncz Klára**, **Dr. Lendvai Nikoletta**, **Dr. Marczell István**, **Dr. Molnár Ágnes**, **Dr. Nagy Zoltán**, **Dr. Nagy Zsolt**, **Németh Kinga**, **Dr. Perge Pál**, **Dr. Stark Júlia**, **Szabó Diána** és **Dr. Zsippai Adrienn**) és asszisztenseinek (**Krauszné Vaczula Mária** és **Benkő Mariann**) mindennapos és szakmai segítségüket valamint a baráti légkört. Köszönöm a laboratóriumban dolgozó TDK hallgatók, **Szentpéteri Anna** és **Vásárhelyi Zsófia** bizalmát és munkáját.

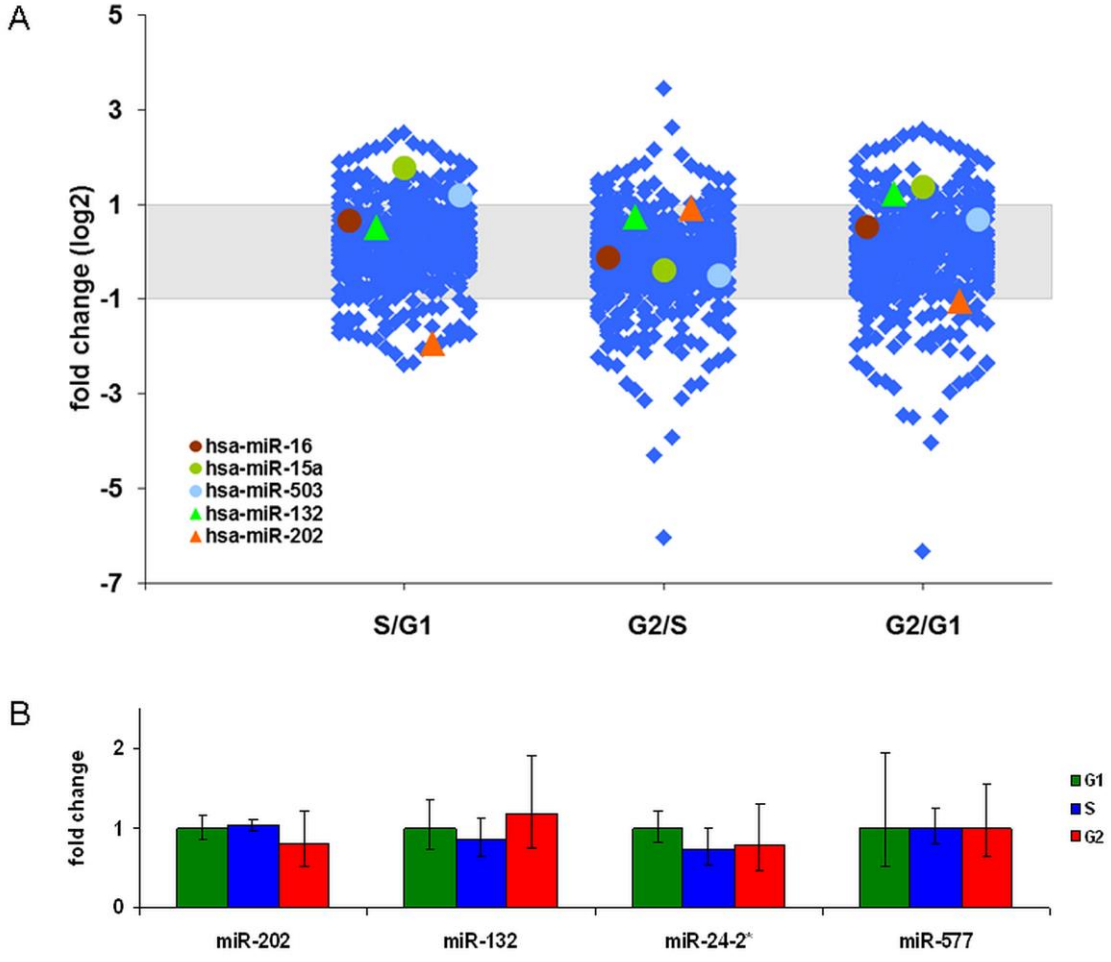
Köszönöm egész családom kitartó szeretét és támogatását! Nagyon köszönöm szüleim állandó bíztatását valamint a tudományos érdeklődés és kutatás iránti példamutató elkötelezettségüket és emberi tartásukat!

Munkámat feleségemnek, **Laurá**nak ajánlom, akit a legnagyobb köszönet illet szeretetéért, bíztatásáért és türelméért, melyek nélkül ez a munka nem születhett volna meg. Nagyon köszönöm **Johanna** leányom türelmét és szeretetét is!

XIII. Mellékletek

Kiegészítő ábrák és táblázatok

1. kiegészítő ábra – A sejtciklusfüggő miRNS expresszió vizsgálata kis RNS szekvenálással NCI-H295R sejtekben – A miRNS expresszió log2-transzformált fold change értékei S/G1 G2/S és G2/G1 összehasonlításokban NCI-H295R sejtekben (A). Szürke háttér jelöli a fold change < 2 eltérések területét. Színezett háromszögek jelölnek két kiválasztott, G2/G1 összehasonlításban legalább kétszeres expressziós különbséget mutató miRNS-t (hsa-miR-132 és hsa-miR-202), amelyeket kiválasztottunk a validálásra, míg színezett körök jelölik a hsa-miR-16 család néhány tagjának expressziós változását. B: A qRT-PCR megerősítési kísérletek eredményei. Az adatok átlag ± standard deviáció formában vannak ábrázolva. A statisztikai elemzés egyetlen esetben sem igazolt szignifikáns (p<0,05) eltérést. Ábra forrása: [212]



1. kiegészítő táblázat – A sejtciklus különböző fázisaiban szignifikánsan eltérő expressziójú transzkriptumok NCI-H295R sejtekben a génexpressziós microarray vizsgálat alapján - A táblázatban az egyes fázisok normalizált expressziós értékeinek átlagai szerepelnek. A táblázatban az egyes transzkriptumok sorrendje megfelel a 6. ábra A paneljén ábrázolt hőtérképen szereplő transzkriptumok sorrendjének.

próba név	gén	G1 átlag	S átlag	G2 átlag
A_24_P13041	RTKN2	-2,374	0,009	0,250
A_32_P471485	RTKN2	-1,849	0,000	0,617
A_33_P3807062	HJURP	-2,356	0,000	0,411
A_23_P345707	TICRR	-1,960	0,000	0,448
A_23_P385861	CDCA2	-2,024	0,000	0,786
A_24_P322354	SKA1	-1,773	0,091	0,056
A_24_P296254	ARHGAP11A	-1,930	0,000	1,318
A_33_P3254606	WDR62	-1,854	0,288	0,090
A_23_P57588	GTSE1	-1,853	0,000	0,668
A_23_P420551	CIT	-1,550	0,000	0,404
A_24_P214231	STIL	-1,708	0,064	0,067
A_24_P314571	SPC24	-1,629	0,699	0,142
A_23_P52017	ASPM	-1,752	0,000	1,181
A_33_P3288159	ASPM	-1,699	0,000	1,316
A_23_P49459	LOC81691	-1,528	0,002	0,047
A_33_P3321293	IQGAP3	-1,721	0,000	0,492
A_23_P89941	CDKN2D	-1,373	0,077	0,118
A_23_P155969	PLK4	-1,582	0,044	0,042
A_33_P3378334	SMC2	-1,378	0,042	0,112
A_23_P386241	FAM110A	-1,499	0,000	0,935
A_23_P80008	MYLK2	-1,446	0,000	0,748
A_33_P3210363	TMPO-AS1	-1,273	0,188	0,039
A_33_P3339361	ARHGAP11A	-1,462	0,000	0,752
A_32_P96692	POLH	-1,148	0,000	0,317
A_33_P3230548	KIF14	-1,306	0,000	1,412
A_33_P3327165	CCDC18	-0,958	0,000	0,579
A_33_P3377691	C4orf46	-0,885	0,081	0,082
A_24_P194714	UBALD2	-0,735	0,000	1,037
A_33_P3691860	FAM122B	-0,836	0,000	0,177
A_24_P945000	SKA2	-0,657	0,000	0,308
A_23_P127522	HYLS1	-0,776	0,000	1,079
A_23_P257043	GEM	-0,562	0,000	2,024
A_24_P225616	RRM2	-0,576	1,848	0,114
A_23_P367899	EPOR	-0,626	0,000	1,084
A_23_P71830	ZBTB26	-0,466	0,000	0,108
A_23_P338505	C19orf40	-0,464	0,451	0,443
A_33_P3289426	ZNF775	-0,384	0,119	0,004
A_33_P3268368	FZR1	-0,249	0,000	0,767
A_33_P3230017	AURKAPS1	-0,502	0,000	1,260
A_33_P3302428	TNRC6C	-0,224	0,067	0,006
A_33_P3304668	COL1A1	-0,065	-1,993	0,595
A_33_P3272558	NCAPH2	-0,172	0,740	0,027
A_24_P941336	TSR1	0,007	0,301	-0,126
A_23_P75889	PSMD13	0,010	0,355	-0,118

A_23_P370989	MCM4	0,017	0,464	-1,062
A_23_P93823	RFC2	0,036	0,658	-0,667
A_23_P80032	E2F1	0,045	0,639	-0,947
A_24_P305662	TRMT2A	0,280	0,000	-0,424
A_23_P259344	CECR6	0,345	0,000	-1,709
A_24_P365015	HOXB13	0,215	-1,639	-0,017
A_33_P3350074	SLC25A19	0,247	0,000	-0,611
A_33_P3407895	RINL	0,469	-0,502	-0,015
A_23_P145485	ULBP2	0,601	0,000	-0,810
A_23_P28120	SIX2	0,730	0,000	-0,272
A_24_P91991	NAT8L	1,037	-0,378	-0,048
A_33_P3237784	PORCN	0,792	-0,751	-0,034
A_23_P78608	DENND1C	0,948	-0,259	-0,078
A_23_P155376	CRELD1	1,055	-0,597	-0,085

2. kiegészítő táblázat – A sejtciklus különböző fázisaiban szignifikánsan eltérő expressziót mutató transzkriptumok HeLa sejtekben a génexpressziós microarray vizsgálat alapján - A táblázatban az egyes fázisok normalizált expressziós értékeinek átlagai szerepelnek. A táblázatban az egyes transzkriptumok sorrendje megfelel a 6. ábra B paneljén ábrázolt hőtérképen szereplő transzkriptumok sorrendjének.

próba név	gén	G1 átlag	S átlag	G2 átlag
A_24_P297539	UBE2C	-2,557	0,000	0,834
A_23_P416468	PIF1	-2,466	0,000	1,403
A_23_P323751	FAM83D	-2,653	0,000	0,940
A_24_P218979	CDCA3	-2,088	0,000	0,482
A_33_P3333187		-2,143	0,000	0,683
A_33_P3807062	HJURP	-2,150	0,075	0,207
A_23_P46539	PSRC1	-2,141	0,067	0,602
A_23_P130182	AURKB	-2,383	0,150	0,116
A_23_P118834	TOP2A	-2,253	0,000	0,293
A_24_P413884	CENPA	-2,257	0,000	0,740
A_32_P198731	NEURL1B	-2,567	0,007	0,682
A_23_P388146		-2,000	0,000	0,908
A_32_P151800	FAM72D	-1,900	0,000	0,798
A_23_P116387	INCENP	-2,076	0,011	0,251
A_23_P138507	CDK1	-2,088	0,137	0,481
A_24_P193592	CCNF	-2,248	0,000	0,410
A_33_P3256738	ARHGEF39	-1,730	0,000	0,273
A_23_P50108	NDC80	-2,028	0,141	0,130
A_33_P3242952	FAM72A	-1,972	0,000	0,733
A_23_P131866	AURKA	-1,943	0,000	1,057
A_23_P70249	CDC25C	-1,899	0,000	0,546
A_33_P3374205	MKI67	-1,678	0,000	0,201
A_23_P57588	GTSE1	-1,713	0,000	0,387
A_23_P150935	TROAP	-1,716	0,000	0,822
A_23_P375	CDCA8	-1,723	0,000	0,529
A_23_P48835	KIF23	-1,757	0,000	0,315
A_23_P34788	KIF2C	-1,754	0,000	0,470
A_23_P385861	CDCA2	-1,904	0,052	0,222
A_33_P3230548	KIF14	-1,768	0,000	0,632
A_23_P100127	CASC5	-1,630	0,000	0,254
A_23_P52017	ASPM	-1,527	0,000	0,692
A_33_P3230254	NCAPG	-1,590	0,176	0,175
A_24_P227091	KIF11	-1,528	0,000	0,121
A_23_P58321	CCNA2	-1,803	0,000	0,474
A_23_P35219	NEK2	-1,474	0,000	0,811
A_23_P388812	CKAP2L	-1,732	0,097	0,124
A_23_P88331	DLGAP5	-1,631	0,000	0,607
A_33_P3311755	KIF23	-1,866	0,000	0,276
A_32_P186474	RACGAP1	-1,569	0,051	0,317
A_23_P70007	HMMR	-1,566	0,000	0,959
A_23_P259586	TTK	-1,602	0,000	0,448
A_33_P3288159	ASPM	-1,449	0,000	0,688
A_24_P346855	MKI67	-1,584	0,180	0,199
A_23_P25626	BORA	-1,675	0,000	0,741

A_23_P253752	MTFR2	-1,594	0,041	0,169
A_23_P411335	SGOL2	-1,531	0,000	0,404
A_33_P3350488	NUSAP1	-1,350	0,076	0,346
A_23_P32707	ESPL1	-1,646	0,234	0,094
A_33_P3401621	CCNB1	-1,377	0,000	1,339
A_23_P125265	KPNA2	-1,501	0,000	0,962
A_23_P118174	PLK1	-1,466	0,000	1,041
A_33_P3321293	IQGAP3	-1,451	0,000	0,178
A_23_P51085	SPC25	-1,609	0,649	0,051
A_33_P3298387	PLK1	-1,465	0,000	0,920
A_23_P89509	SPAG5	-1,417	0,075	0,157
A_23_P68610	TPX2	-1,379	0,000	0,565
A_23_P65041	RACGAP1P	-1,455	0,000	0,304
A_23_P124417	BUB1	-1,380	0,000	0,690
A_23_P155765	HMGB2	-1,306	0,111	0,302
A_24_P813147	TUBB8	-1,300	0,000	0,383
A_23_P145016	BRD8	-1,299	0,018	0,329
A_23_P356684	ANLN	-1,475	0,000	0,219
A_23_P115872	CEP55	-1,371	0,000	0,560
A_24_P319613	NEK2	-1,511	0,000	0,760
A_23_P163481	BUB1B	-1,264	0,104	0,323
A_33_P3224105	KNSTRN	-1,333	0,000	0,892
A_24_P296254	ARHGAP11A	-1,320	0,000	0,225
A_23_P361419	DEPDC1B	-1,438	0,000	0,333
A_32_P62997	PBK	-1,344	0,256	0,053
A_33_P3411025	ARHGAP19	-1,423	0,065	0,190
A_23_P253524	CENPE	-1,240	0,000	0,592
A_24_P99090	CKAP2	-1,120	0,000	0,596
A_33_P3230017	AURKAPS1	-1,081	0,000	0,990
A_24_P941759	G2E3	-1,058	0,000	0,681
A_24_P322354	SKA1	-1,099	0,351	0,050
A_23_P148475	KIF4A	-1,088	0,000	0,360
A_33_P3327165	CCDC18	-1,229	0,000	0,254
A_23_P387630	STARD8	-1,315	0,000	0,834
A_23_P200310	DEPDC1	-1,227	0,000	0,709
A_23_P133956	KIFC1	-1,426	0,089	0,080
A_23_P345707	TICRR	-1,007	0,275	0,026
A_33_P3376116	SPC24	-0,986	0,422	0,069
A_33_P3306024	SIGLEC16	-1,140	0,000	0,373
A_23_P118150	ARL6IP1	-1,361	0,000	1,131
A_33_P3300800	GUCY2EP	-1,097	0,000	0,439
A_33_P3339375	ARHGAP11B	-1,109	0,000	0,239
A_33_P3340468	CENPI	-1,022	0,252	0,081
A_33_P3242649	KIF18A	-1,082	0,000	0,915
A_23_P44684	ECT2	-1,083	0,000	0,346
A_23_P151405	CKAP2	-1,179	0,000	0,768
A_23_P206901	NDE1	-1,024	0,000	0,510
A_33_P3716128	SMC4	-1,039	0,159	0,009
A_33_P3261182	POC5	-1,081	0,041	0,175
A_23_P420551	CIT	-1,033	0,000	0,262
A_23_P66777	CDC27	-0,925	0,020	0,131
A_23_P401	CENPF	-0,952	0,000	0,529

A_23_P99604	G2E3	-1,052	0,000	0,384
A_24_P923381		-0,907	0,000	0,386
A_23_P256956	KIF20A	-0,775	0,000	1,168
A_23_P206059	PRC1	-1,063	0,082	0,365
A_23_P126120	CENPL	-0,837	0,136	0,042
A_33_P3406090		-1,105	0,219	0,051
A_23_P66732	GSG2	-1,056	0,151	0,024
A_24_P314571	SPC24	-1,027	0,509	0,074
A_32_P96719	SHCBP1	-1,066	0,255	0,086
A_33_P3360718	CDC27	-0,822	0,009	0,144
A_23_P122197	CCNB1	-0,792	0,000	1,170
A_23_P151150	FOXM1	-1,044	0,221	0,148
A_33_P3221313	CENPI	-0,925	0,285	0,035
A_33_P3413523	DBF4	-1,007	0,000	0,211
A_24_P397489	GCNT2	-0,999	0,000	0,656
A_33_P3281716		-0,923	0,053	0,166
A_23_P94422	MELK	-0,665	0,545	0,037
A_23_P386241	FAM110A	-0,776	0,000	0,641
A_23_P4944	CALM3	-0,733	0,000	0,209
A_33_P3257558	CNTRL	-0,866	0,000	0,818
A_23_P137586	GMEB1	-0,725	0,210	0,033
A_23_P209619	ATL2	-0,731	0,000	0,357
A_23_P502312	CD97	-0,793	0,000	0,429
A_23_P9761	CNTROB	-0,779	0,065	0,151
A_23_P127522	HYLS1	-0,829	0,000	0,613
A_23_P65757	CCNB2	-0,716	0,000	0,783
A_24_P13041	RTKN2	-0,815	0,638	0,116
A_23_P429491	DDIAS	-0,648	0,099	0,085
A_23_P342727	STARD13	-0,786	0,000	0,412
A_23_P201979	CREM	-0,775	0,289	0,111
A_23_P211428	SMTN	-0,953	0,000	0,752
A_23_P149200	CDC20	-0,783	0,000	0,897
A_33_P3419735		-0,760	0,051	0,099
A_23_P209394	CFLAR	-0,625	0,003	0,126
A_24_P135406	KCTD9	-0,734	0,001	0,121
A_23_P106127	KIAA0586	-0,585	0,000	0,464
A_33_P3358037		-0,632	0,033	0,180
A_23_P145134	FGFR1OP	-0,756	0,100	0,012
A_33_P3286218	DLEU2L	-0,527	0,067	0,021
A_23_P83110	CDK5RAP2	-0,554	0,034	0,083
A_33_P3240229	CREBBP	-0,575	0,021	0,057
A_23_P133133	ALPK1	-0,558	0,000	0,531
A_33_P3308905	CEP57L1	-0,537	0,174	0,018
A_23_P86599	DMBT1	-0,559	0,497	0,075
A_24_P323598	ESCO2	-0,577	0,988	0,050
A_33_P3359753	CCSAP	-0,545	0,000	0,567
A_33_P3342957	STK17B	-0,772	0,000	0,385
A_24_P403244	PILRB	-0,557	0,015	0,039
A_33_P3502640	DTX2	-0,492	0,003	0,115
A_33_P3306352		-0,482	0,211	0,037
A_23_P254271	TUBB6	-0,537	0,024	0,113
A_24_P137897	IFRD1	-0,543	0,279	0,048

A_33_P3361202	CCSAP	-0,534	0,000	0,629
A_33_P3405500	SACS	-0,466	0,000	0,268
A_23_P218131	INF2	-0,523	0,395	0,061
A_23_P153197	TGIF1	-0,450	0,299	0,034
A_33_P3374723	ZEB1	-0,477	0,000	0,203
A_23_P28953	DNMT3B	-0,562	0,000	0,379
A_33_P3888365	RSBN1	-0,557	0,002	0,111
A_33_P3340404	SCLT1	-0,409	0,000	0,785
A_33_P3286372	C2orf48	-0,536	0,592	0,104
A_23_P21473	CEP70	-0,494	0,000	0,515
A_23_P307328	WHSC1	-0,437	0,031	0,105
A_33_P3234118	FAM122B	-0,467	0,070	0,039
A_23_P41476	SHISA3	-0,572	0,000	1,481
A_23_P113803	KATNA1	-0,476	0,000	0,284
A_23_P96209	REEP4	-0,527	0,000	0,742
A_23_P23074	IFI44	-0,426	0,436	0,015
A_23_P37391	CCDC85C	-0,271	0,000	0,910
A_33_P3256685	TTF2	-0,429	0,016	0,116
A_33_P3267814	MICAL3	-0,466	0,000	0,265
A_24_P925664	MDM2	-0,441	0,018	0,124
A_24_P86868	METTL10	-0,347	0,000	0,254
A_23_P204436	GIT2	-0,344	0,231	0,033
A_23_P134835	CSGALNACT1	-0,357	0,000	0,257
A_33_P3217103	RBFOX2	-0,412	0,058	0,035
A_32_P106732	FANCM	-0,246	0,235	0,006
A_33_P3222218	NEURL1B	-0,394	0,000	0,698
A_23_P19291	TUBB2A	-0,408	0,000	0,321
A_23_P141738	SS18	-0,232	0,000	0,442
A_23_P13663	FAM60A	-0,241	0,000	0,416
A_23_P593	GPBP1L1	-0,230	0,000	0,173
A_33_P3577671	DPP8	-0,251	0,030	0,039
A_24_P313822	PAK4	-0,247	0,000	0,277
A_24_P148043	FAM20B	-0,201	0,004	0,037
A_23_P372467	AHSA2	-0,189	0,343	0,013
A_23_P305938	ZNF75D	-0,255	0,000	0,221
A_33_P3398922	MBD1	-0,196	0,066	0,018
A_32_P72341	TRIM59	-0,186	-0,019	0,859
A_32_P222684	PRDM6	-0,089	-0,092	0,598
A_24_P222997	ZRANB3	-0,156	0,000	0,244
A_23_P81408	MAT2B	-0,140	0,000	0,080
A_33_P3346302	UBAP2	-0,142	0,000	0,228
A_23_P257593	LOH12CR1	-0,033	-0,100	0,394
A_23_P108823	OSBPL6	0,051	0,092	-0,592
A_24_P208345	SLC45A3	-0,037	-0,529	0,478
A_33_P3285545	CLDN4	-0,026	-0,222	0,557
A_33_P3390643	MMACHC	-0,021	-0,165	0,261
A_23_P70328	CENPQ	0,030	0,415	-0,242
A_23_P74115	RAD54L	0,018	0,962	-0,104
A_23_P23303	EXO1	0,036	0,536	-0,643
A_23_P318581	KIAA1430	-0,016	-0,331	0,106
A_24_P100517	SAPCD2	-0,089	-0,092	1,263
A_24_P173754	C1orf21	0,009	0,620	-0,109

A_23_P359277	ELOVL7	0,031	0,238	-0,663
A_24_P56270	DYRK2	-0,012	-0,188	0,132
A_23_P208013	ZNF407	-0,014	-0,338	0,086
A_33_P3358312	OTUD6B	-0,004	-0,091	0,258
A_33_P3214884	KPNA3	-0,010	-0,016	0,237
A_23_P41327	LYAR	-0,016	-0,101	0,373
A_23_P25403	HCFC2	0,020	0,610	-0,096
A_32_P184279	CCDC6	-0,015	-0,031	0,150
A_33_P3217238	ATAD2	0,009	0,669	-0,245
A_33_P3258612	PCNA	0,226	0,001	-0,648
A_23_P65741	DIS3L	0,131	-0,332	-0,030
A_23_P129956	DUSP3	0,208	-0,275	-0,027
A_32_P104478	FGD6	0,175	0,000	-0,602
A_33_P3287502	MSH2	0,226	0,000	-0,408
A_24_P33156	AFMID	0,230	-0,284	-0,015
A_23_P38677	SLMO1	0,127	-0,323	-0,018
A_32_P84009	CMTM4	0,230	-0,221	-0,022
A_32_P5276	ARHGEF26	0,151	0,079	-1,041
A_33_P3222892	SLC10A3	0,269	-0,055	-0,003
A_23_P383278	PYCRL	0,188	-0,666	-0,029
A_33_P3327961	ZNF615	0,297	-0,128	-0,014
A_23_P23639	MCOLN2	0,323	-0,179	-0,018
A_33_P3370832	FAM117B	0,302	-0,582	-0,026
A_24_P19810	PPCS	0,360	0,000	-0,055
A_32_P215938	GPSM1	0,384	-0,296	-0,019
A_33_P3371564	FAM86B3P	0,311	-0,301	-0,041
A_32_P151782	XLOC_010709	0,405	-0,067	-0,021
A_33_P3238280	ESYT3	0,343	0,000	-0,569
A_24_P30194	IFIT5	0,380	-0,508	-0,044
A_33_P3382412	ZNF468	0,425	-0,170	-0,050
A_23_P80032	E2F1	0,481	0,000	-0,480
A_24_P234732	MXD4	0,577	-0,351	-0,018
A_23_P132175	RTN4R	0,562	0,000	-0,414
A_24_P91991	NAT8L	0,396	-0,468	-0,031
A_23_P94762	ZNF354B	0,378	-0,073	-0,015
A_33_P3247022	CCNE2	0,587	0,000	-0,910
A_24_P16214	LINC00665	0,560	-0,302	-0,044
A_24_P734953	TRNP1	0,480	0,000	-0,154
A_33_P3280965	SNHG9	0,420	0,000	-0,115
A_33_P3252359	BDH1	0,509	-0,278	-0,045
A_33_P3414389	SH2B2	0,523	-0,127	-0,049
A_33_P3219591	RNF213	0,587	-0,252	-0,019
A_23_P143935	PIGZ	0,601	0,000	-0,479
A_23_P423695	MXD4	0,568	-0,214	-0,022
A_24_P129277	NOD1	0,503	-0,047	-0,067
A_33_P3242234	F8A2	0,596	0,000	-0,142
A_23_P251421	CDCA7	0,641	-0,516	-0,039
A_23_P125078	SLC26A11	0,599	-0,008	-0,089
A_23_P311640	AGFG2	0,675	-0,473	-0,012
A_23_P80839	MAP6D1	0,733	0,000	-0,135
A_23_P414273	SMIM3	0,600	0,000	-0,125
A_23_P314250	FAM78A	0,813	-0,376	-0,067

A_23_P397347	MCM9	0,763	-0,020	-0,047
A_33_P3427239	LOC100134937	0,824	-0,105	-0,058
A_32_P79492		0,889	-0,134	-0,058
A_23_P110882	TSPYL4	0,726	-0,071	-0,040
A_24_P118011	PRORSD1P	0,971	-0,231	-0,075
A_23_P74449	HPDL	1,129	-0,890	-0,150
A_33_P3234521	DIS3L	0,862	-0,390	-0,040
A_33_P3270657	FAM111B	0,866	0,000	-0,643
A_23_P397341	PAQR4	0,839	0,000	-0,291
A_33_P3394140	ZMIZ1-AS1	1,035	-0,020	-0,041
A_23_P344531	SYNPO	0,942	-0,162	-0,093
A_32_P46840	LOC729680	1,010	-0,327	-0,052
A_32_P6172	LINC01003	1,106	-0,568	-0,082
A_23_P76071	B3GNT4	0,986	0,000	-0,356
A_24_P181254	OLFM4	1,361	-0,538	-0,053