

Nem kódoló szöveti RNS-ek vizsgálata jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg daganatokban

Doktori értekezés

Dr. Turai Péter István

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Igaz Péter, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Bödör Csaba, DSc, tudományos főmunkatárs
Dr. Bodor Miklós, PhD, egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Szalai Csaba, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Hubina Erika, PhD, főorvos

Dr. Balogh Lídia, PhD, főorvos

Budapest
2022

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke

1. Bevezetés	6
1.1. A mellékvese daganatai	6
1.1.1. A mellékvesekéreg karcinóma	7
1.1.2. A mellékvesekéreg adenoma.....	12
1.2. A mellékvesekéreg daganatok differenciál diagnózisának kihívásai.....	14
1.3. A nem kódoló RNS-ek.....	17
1.3.1 A mikroRNS-ek.....	17
1.3.2. A cirkuláris RNS-ek.....	24
2. Célkitűzések	30
3. Módszerek	32
3.1 Minták, betegadatok.....	32
3.2. mikroRNS kombinációk vizsgálata mesterséges intelligencia segítségével mellékvesekéreg adenomában és carcinomában.....	34
3.2.1. A jó- és rosszindulatú mellékvesetumorokban szignifikánsan eltérő expressziójú mikroRNS-ek szakirodalmi kutatása.....	34
3.2.2. Mintafeldolgozás és mikroRNS izolálás szövetből.....	35
3.2.3. Szöveti mikroRNS mérés RT-qPCR módszerrel.....	36
3.2.4. Biostatistikai elemzés	37
3.3. Cirkuláris RNS profilozás mellékvesekéreg adenomában, carcinomában és ép mellékveseszövetben	40
3.3.1. Mintafeldolgozás és cirkuláris RNS dúsítás szövetből	40
3.3.2. Szöveti cirkuláris RNS expressziós profilozás újgenerációs szekvenálással	42
3.3.3. A szignifikánsan eltérő expressziójú cirkuláris RNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel	43

3.3.4. Biostatistikai elemzés	44
3.3.5. A <i>circPHC3</i> lehetséges mikroRNS interakcióinak vizsgálata	44
4. Eredmények	46
4.1. mikroRNS kombinációk vizsgálata mesterséges intelligencia segítségével mellékvesekéreg adenomában és carcinomában.....	46
4.1.1. Szöveti mikroRNS mérés RT-qPCR módszerrel	46
4.2. Cirkuláris RNS profilozás mellékvesekéreg adenomában, carcinomában és ép mellékveseszövetben	49
4.2.1. Szöveti cirkuláris RNS expressziós profilozás újgenerációs szekvenálással	49
4.2.2. A szekvenálás során szignifikánsan eltérő expressziójú cirkuláris RNS-ek validációja	51
4.2.3. A <i>circPHC3</i> lehetséges mikroRNS interakcióinak vizsgálata.....	53
5. Megbeszélés	55
5.1. mikroRNS kombinációk vizsgálata mesterséges intelligencia segítségével mellékvesekéreg adenomában és carcinomában.....	55
5.2. Cirkuláris RNS profilozás mellékvesekéreg adenomában, carcinomában és ép mellékveseszövetben	59
6. Következtetések.....	62
7. Összefoglalás.....	64
9. Irodalomjegyzék.....	67
10. Saját publikációk jegyzéke	92
10.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke	92
10.2. Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó saját közlemények jegyzéke.....	92
11. Köszönetnyilvánítás	94

Rövidítések jegyzéke

ACA: Adrenocorticalis (mellékvesekéreg) adenoma

ACC: Adrenocorticalis (mellékvesekéreg) karcinóma

AGO: Argonaute

AUC: Area Under Curve (görbe alatti terület)

BWS: Beckwith-Wiedemann-szindróma

cDNS: komplementer DNS

ciRNS: cirkuláris intronikus RNS

circRNS: cirkuláris RNS

Ct: Cycle threshold (ciklus küszöbérték)

CPA: kortizol termelő adenoma

CT: Computer Tomográfia

DHEAS: Dehidroepiandroszteron-szulfát

DNS: Dexoxiribonukleinsav

EDP: Etopozid-Doxorubicin-Platina

EIciRNS: Exon-Intron Cirkuláris RNS

ENS@T: European Network for the Study of Adrenal Tumors

ESE: European Society of Endocrinology

FAP: Familiáris Adenomatous Polyposis-szindróma

FC: Fold change

FFPE: Formalin-Fixed Paraffin Embedded (formalinnal fixált, paraffinba ágyazott)

HU: Hounsfield Unit

MEN1: Multiplex Endokrin Neoplasia szindróma 1-es típusa

MACS: Mild Autonomous Cortisol Secretion (enyhe autonóm kortizoltermelés)

miRISC: microRNA-Induced Silencing Complex (mikroRNS indukálta csendesítő komplex)

MRI: Magnetic Resonance Imaging (mágneses magrezonancia képalkotás)

miR, miRNS: mikroRNS

mRNS: Messenger RNS, hírvivő RNS

NAC: Normal Adrenal Cortex

NGS: Next-generation sequencing (újgenerációs szekvenálás)

NF1: Neurofibromatosis 1-es típusa

Oncomir: Onkogén mikroRNS

Pre-mikroRNS: Prekurzor mikroRNS

Pri-mikroRNS: Elsődleges mikroRNS

ROC: Receiver operating characteristic (hatásfokmérő karakterisztika)

snoRNS: small nucleolar RNA (kis nukleoláris RNS)

1. Bevezetés

1.1. A mellékvese daganatai

A mellékvese daganatai gyakoriak. Az úgynevezett incidentalomák prevalenciája, melyek véletlenszerűen, mellékleletként felismert mellékvese daganatok, 4,4% [1]. A mellékvese-daganatok előfordulási aránya életkorral növekszik, az idősebb populációban 10% körüli [2]. Túlnyomó többségük (49-69%) jóindulatú mellékvesekéreg adenoma (ACA), melyek sokszor panaszt sem okoznak és nem is igényelnek további orvosi teendőt [3]. Másrészt, a legritkább mellékvese daganat a mellékvesekéreg karcinóma (ACC) incidenciája 0,7-2/millió/év [4]. Habár az ACC ritka daganat, bármely véletlenszerűen felfedezett mellékvese térfoglalás differenciál diagnózisában szerepel. A mellékvese-daganatok differenciál diagnózisába nemcsak a kérget érintő daganatok tartoznak, hanem a csontvelői elemeket és zsírt tartalmazó myelolipoma és a mellékvesevelő eredetű pheochromocytoma is [5]. A mellékvesék gyakran tartalmaznak távoli malignus daganatokból származó áttéteket is. Mindezen túlmenően a mellékvesekéreg hiperpláziát, a mellékvese cystát, a mellékvese bevézését, ganglioneurinomát és nagyon ritkán a mellékvese lymphomát és a mellékvese tuberkulózist is szem előtt kell tartani, mint lehetséges mellékvese patológiákat [5]. A jó- és rosszindulatú mellékvese daganatok elkülönítése gyakran nehéz. Az elkülönítő diagnózist segítheti a mellékvese eredetű daganatok hormontermelése: ilyenek például az aldoszteron termelő tumor (Conn-szindróma), kortizol termelő tumor (Cushing-szindróma), illetve az androgéneket termelő tumor. A mellékvesekéreg adenomák az esetek kétharmadában hormonálisan inaktívak [3]. A több hormont is termelő daganatok mindig felvetik a mellékvesekéreg karcinóma gyanúját. A mellékvese-daganatok nagy bizonyossággal való elkülönítése gyakran nem lehetséges csupán a klinikai szempontok figyelembevételével, sokszor csak a szövettani vizsgálat ad diagnosztikus értékű információt. Mindazonáltal, nem ritkán még a mellékvesepatológiában jártas szakemberek számára is nagy kihívást jelent a mellékvese-daganatok szövettani elkülönítése [6].

1.1.1. A mellékvesekéreg karcinóma

A mellékvesekéreg-rák (adrenokortikális karcinóma, ACC) a mellékvesekéreg legritkább daganata [7]. Másrészt viszont az ACC szerepel az igen gyakori mellékvese incidentalomák kivizsgálásában. Míg az incidentalomák gyakorisága korral növekszik, addig az ACC bimodális, tehát kétcsúcsú életkori gyakorisági eloszlást mutat gyermekkorban és 40-50 éves korban [8]. Az ACC azon kívül, hogy igen rossz prognózisú betegség (előrehaladott stádiumban az 5 éves túlélése 30% alatti) [9], az életminőséget is súlyosan befolyásolja, ezáltal nagy terhet róva a beteg közvetlen környezetére a betegség előrehaladása, a hormonális túltermelés és a kezeléssel összefüggő toxicitás következtében [7]. Az ACC-ben szenvedő betegek gyakran gyermekek és termékeny korban lévő nők [8]. Fiatal életkorban talált incidentaloma, az ACC fiatalok körében észlelt relatív gyakorisága okán, mindig gyanút kelt az ACC diagnózisára. Ezzel szemben az idősebb korban felfedezett incidentaloma hátterében leggyakrabban adenoma áll [2].

1.1.1.1. A mellékvesekéreg karcinóma etiológiája

A mellékvesekéreg karcinóma (adrenocorticalis karcinóma, ACC) legtöbbször sporadikusan fordul elő, de lehet családi halmozódást mutató tumorszindróma része is [10]. A mellékvesekéreg daganatok klonalitásával foglalkozó számos tanulmány szerint a legtöbb jóindulatú mellékvesekéreg elváltozás poliklonális, ezzel szemben az ACC monoklonális proliferációt jelez [11]. A legtöbb mellékvesekéreg daganat, legyen az jó- vagy rosszindulatú, monoklonális elváltozás, ami azt jelzi, hogy bizonyos lókuszek genetikai változásai szerepet játszhatnak a mellékvesekéreg daganatok kialakulásában [12]. Például, a béta-katenin útvonal megváltozásáért felelős kromoszomális átrendeződések mind a jó-, mind a rosszindulatú mellékvese daganatokat érintik, habár a carcinomákat gyakrabban [13].

Ismert, hogy a gének csírsejtes elváltozása – amely örökletes familiáris tumorszindrómát okoz – szintén előfordul sporadikus daganatokban szomatikus mutáció formájában is. Ilyen például a Li-Fraumeni familiáris rákszindróma, amely a 17p13 kromoszomális

elhelyezkedésű *TP53* csírasejtes mutációjából ered és az ACC-n kívül hajlamosít mellrák, sarcoma, agytumor és leukaemia kialakulására [13]. Ezen betegség változatai megjelenhetnek olyan gyermekeknél is, akiknél sporadikus ACC alakult ki és csíravonalas p53-mutációja van, de nincs Li-Fraumeni-szindrómára jellemző kórelőzménye. Különösen jellemző ez a p.R337H mutáció esetében, amely az arginin (R) hisztidinre (H) való szubsztitúcióját foglalja magában, és egy olyan gyakori mutáció, amelyet Dél-Braziliában írtak le [14]. A gyermekkori ACC előfordulása nagyon magas Dél-Braziliában (10-15-szörös a globális adatokhoz viszonyítva), a p.R337H *TP53* hotspot (mutációra fokozottan hajlamos DNS szekvencia) mutáció szegregációja miatt [14]. Továbbá, úgy tűnik, hogy a felnőtt betegek *TP53* polimorfizmusai is befolyásolják az általános túlélést [15]. A p53 fehérje alapvető szerepet játszik a stresszre adott sejtválaszban, az onkogén aktivációban és a DNS-károsodásban a sejtciklus és az apoptózis szabályozása révén. A *TP53* szomatikus mutációja gyakori esemény, amely az ACC-k 16-70%-ában fordul elő [10]. A heterozigótaság elvesztése (loss of heterozygosity, LOH) a 17p13-nál az ACC eseteinek 85%-ában jelentkezik [16]. A *TP53*-at tumorszuppresszor génnek, a „genom őrzőjének” (1993-ban az év molekulája címet kapta [17]) tekintik, és a tumorszövetben mindkét allél inaktivációja megfigyelhető. A daganatképződés további tényezői között szerepel az agyalapi mirigy tumortranszformáló gén 1 (*PTTG1*) túlzott expressziója, amely a securint, a p53 negatív szabályozóját kódolja, amelyet a rossz prognózissal összefüggésben azonosítottak [18]. A retinoblasztóma (Rb) fehérje elvesztését a mellékvesekéreg karcinóma 27%-ában állapították meg [19]. Ezen kohorsz daganatai közt további 11% tartalmazta a ciklindependens kináz-inhibitor 2A (*CDKN2A*) mutációit, és 2%-a a *CDK4* magas szintű amplifikációját mutatta ki [19]. Összességében a mellékvese daganatok 33%-ában írták le a *TP53* útvonal változását [15].

A familiáris adenomatosus polipózisban (FAP) vagy Gardner-szindrómában szenvedő betegek 5q21 kromoszómáján található a Wnt/beta-catenin gátlásáért felelős adenomatosus polyposis coli (APC) tumorszuppresszor gén csírasejtes inaktiváló mutációja. Ezen betegek többszörös vastagbélpolipokkal és a korai vastagbélkarcinóma fokozott kockázatával rendelkeznek. Mellékvesekéreg daganatok, különösen a nem funkcionális noduláris hiperplázia, a kortizoltermelő adenomák (CPA) és az ACC a FAP-ban szenvedő betegek 7-13%-ában fordulnak elő [10]. A Wnt/beta-catenin útvonal

aktivációja az ACC esetek harmadában-, illetve az ACA esetek egy kisebb részében is szerepet játszik. A beta-catenin aktiválása főként a Catenin béta-1 gén (*CTNNB1*) mutációjával áll összefüggésben. A transzkripciós vizsgálatok következetesen a Wnt/ β -catenin célgének túlzott expresszióját mutatták ki ACC-ben [20]. A *CTNNB1* mutációját vagy aktiválódásának szövettani módszerekkel kimutatható jeleit rossz prognózissal hozták összefüggésbe [21,22]. Érdekes módon a p53 és a béta-catenin mutációk gyakoriak az ACC-ben és rossz prognózissal járnak, de szinte mindig kölcsönösen kizárják egymást. A Wnt/beta-catenin útvonal egy másik, nemrégiben felfedezett negatív regulátora a cink és a gyűrűsujj 3 (*ZNRF3*) sejtfelszíni transzmembrán E3 ubiquitin ligáz. A *ZNRF3* a leggyakrabban megváltozott gén az ACC két nagy kohorsz vizsgálatában, 21%-os, illetve 19%-os prevalenciával [22,23]. A *ZNRF3* egy új tumorszuppresszor gén. A *CTNNB1*- és *ZNRF3* módosult ACC-k alapján a Wnt/b-catenin útvonal aktivációja az ACC-k 39%-ában lehet jelen.

A Beckwith-Wiedemann-szindróma (BWS) jellemzően genetikai és epigenetikai események hatására jön létre a 11p15.5 régióban, beleértve a ciklinfüggő kináz inhibitor 1C (*CDKN1C*), inzulinszerű növekedési faktor 2 (*IGF-2*) és *H19* gének alterációját, ami túlnövekedési rendellenességet, visceromegaliát (macroglossia, hemihyperplasia), fejlődési rendellenességeket (omphalokele) és az embrionális rosszindulatú daganatokra való hajlamot okoz [24]. Az ACC a BWS tumorspektrumhoz tartozik, amely magában foglalja a Wilms-tumort, a hepatoblastomát, a rhabdomyosarcomát és a neuroblastomát is és a daganatok kialakulásának általános kockázata gyermekeknél 7,5%-ra becsülhető. A legtöbb daganat az élet első 8-10 évében fordul elő [23]. Az *IGF-2* felülexpressziója a legkifejezettebb és az egyik első molekuláris rendellenesség a sporadikus felnőttkori ACC esetek körülbelül 60-90%-ában, és csak ritkán az ACA-ban [23,25]. Az *IGF2* lokusznál leírt rendellenességeken túl a metilációs minták globális megváltozását írták le az ACC-ben a genomszintű vizsgálatok [26–28]. A *CDKN1C* mutációi a BW örökletes formáit okozzák [29].

Az 1-es típusú multiplex endokrin neoplázia hátterében 11q13 locus eltérését mutatták ki, ami a *MEN1* gént foglalja magába. A *MEN1* gén egy tumorszuppresszor fehérjét kódol, amely a Menin fehérje. E fehérje kóros működése hajlamosítja a beteget

mellékpajzsmirigy-, agyalapi mirigy-, endokrin hasnyálmirigy- és mellékvesekéreg daganatokra, beleértve a mellékvesekéreg carcinomát is.

Egyéb ACC-re hajlamosító szindrómák például a neurofibromatosis 1-es típusa (NF1), Lynch-szindróma és a Carney-komplex [30,31]

Mindezek mellett, a mikroRNS-ek expressziója is szignifikánsan eltér a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg tumorok között, amely témakört a későbbiekben részletezem a doktori értekezésem során.

1.1.1.2.A mellékvesekéreg karcinóma klinikai megjelenése

A mellékvesekéreg-rák nem specifikus, változatos klinikai megjelenése is hozzájárul a betegség gyakori előrehaladott stádiumban való felfedezéséhez (ENSAT stádium III: 18-26%; IV: 21-46%) [9]. Az ACC klinikai képe a hormonális túltermelés jeleiből, általános tünetekből és a képalkotó vizsgálatokon látott eltérésekből áll. Az ACC leggyakrabban hormonális túltermelés jeleivel (50-60%-ban) kerül felismerésre [7]. Leggyakrabban a kortizol hormon túltermelése (Cushing-szindróma) figyelhető meg, amely izomgyengeséggel, alvászavarral, centripetális elhízással és időnként diabetes mellitussal, hypokalaemiával (aldoszteron receptorok kortizollal történő aktivációja miatt) jelentkezik. Nők esetében kevesebb, mint 10%-ban előfordulhat emellett virilizáció is, amelyet jellemez a mély hang, clitoris hypertrophia, hirsutismus (férfias jellegű szőrösödés) és androgén testalkat az androgén hormonok – mint például a tesztoszteron, dihidrotesztoszteron, dehidroepiandroszteron-szulfát (DHEAS) – túltermelése (hyperandrogenismus) következtében [32]. Kevésbé gyakori a mineralocorticoid (primer hyperaldosteronizmus, Conn-szindróma) és az ösztrogén termelő ACC [33]. A nemi hormonokat és kortizolt ko-szekretáló mellékvese daganatok hátterében leggyakrabban ACC áll. A vizelettel ürülő glükokortikoid metabolitok klinikailag tüneteket nem okozó daganatok esetén is segítséget jelenthetnek az ACC diagnózisához. A hormonálisan inaktív tumorok gyakran okoznak a daganat térfoglalásából adódó tüneteket, mint például a hányinger, hányás, derékfájdalom (30-40%-ban), illetve a tüneteken kívül a fizikális vizsgálattal tapintható hasi terime is előfordulhat [30]. Habár, a tünetek jelentkezhettek a senyvesztő betegségekre általánosan

jellemző fogyás, anorexia, fáradtság, láz és éjszakai izzadás formájában is, ezek csak az esetek kisebb részében vannak jelen, azonban jelenlétük mindig figyelmeztető jel kell, hogy legyen. A napjainkban egyre többet használt képalkotó vizsgálatok folytán az ACC az esetek 10-15%-ában incidentalomaként kerül felfedezésre [7]. Annak ellenére, hogy a képalkotó vizsgálatok jelenleg nem képesek egyértelműen elkülöníteni a jóindulatú és rosszindulatú mellékvesedaganatokat, az ACC kizárható azokban az esetekben, amikor a mellékvese térfoglalás homogén és alacsony denzitásúnak adódik – ≤ 10 Hounsfield unit (HU) – computer tomográfiával (CT). Ezzel szemben az ACC gyanúja felmerül a CT-vel inhomogén képet adó és magas denzitású (az alacsony zsírtartalom miatt) látott kép esetén, ami azonban nem elégséges a diagnózisalkotáshoz [7]. Mindezekon felül a nagy méret (≥ 4 cm), intratumoralis necrosis jelei, irreguláris terime és határok tovább erősítik az ACC gyanúját [7]. Mindazonáltal ezek egyike sem ad biztos diagnózist, és nem ritka, hogy ACC gyanúját keltő képalkotó eredmények miatt operált daganat a szövettani vizsgálat során jóindulatúnak bizonyul. A már tárgyalt fiatalkori incidentaloma már önmagában is gyanút kelt ACC diagnózisára.

1.1.1.3. A mellékvesekéreg karcinóma kezelése és prognosztikája

Az egyetlen kuratív terápia ACC esetén a radikális tumoreltávolítás, amely elsőnek választandó távoli áttétet nem adó (ENSAT stádium I-III) tumorok esetén, amennyiben nincs műtéti kontraindikáció. A műtét végezhető nyitott laparotomiás bemetszésen keresztül, illetve egyre gyakrabban már laparoszko-pos megoldással is. A nyitott műtét ajánlott nagyobb tumorátmérő esetén, míg a kisebb (≤ 6 cm), lokális invázió jeleit nem mutató tumorok laparoszko-posan is eltávolíthatók. Az ACC műtétet lehetőség szerint tapasztalt sebészek végezzék lehetőleg erre specializált központokban, mivel a túlélést a daganat stádiuma mellett az eltávolítás mértéke is befolyásolja [7]. Az ACC prognosztikai markerei közé tartozik a szövettani diagnózis alapját képező Weiss- és modifikált Weiss-score, amelyek a szövettani képet a nukleáris grádus, világos sejtes összetevők aránya, mitotikus ráta, atípusos mitózisok, diffúz eloszlás, nekrosis, vénás vagy sinusoidális betörés, tokinvázió szerint osztályozzák [7,34,35]. Egy másik prognosztikai mutató a Ki-67 index, amely a mitotikus sejtek aránya alapján értékel és amelynek vizsgálata ajánlott minden adrenocorticalis tumor esetén [7,36]. A műtét mellett lehetőség van gyógyszeres

kezelésre, amelynek egyetlen mellékvesekéreg specifikus gyógyszere a nagy toxicitási profillal rendelkező mitotán képezi, amelynek adjuváns alkalmazására is vannak adatok [7]. A metasztatikus esetek kezelésében a szisztémás kemoterápia az alapvető, aminek általános alkalmazott módja az EDP-protokoll: etopozid-doxorubicin-platina [7].

1.1.2. A mellékvesekéreg adenoma

A jóindulatú mellékvesekéreg adenoma (adrenocorticalis adenoma, ACA) a véletlenszerűen, mellékleletként felfedezett incidentalomák (adrenal incidentaloma, AI) leggyakoribb oka (megközelítőleg 54%) [37]. Egy epidemiológiai vizsgálat szerint 1995 és 2017 között a mellékvese incidentalomák diagnózisa, mintegy tízszeres emelkedést mutatott, rendre a 40 év feletti korosztályban felfedezett kisméretű mellékvesekéreg adenomák miatt – köszönhetően az egyre jobb felbontású képalkotó vizsgálatoknak [38]. Valamivel gyakrabban kerülnek felfedezésre nőkben (55%), mint férfiakban (45%) [38]. Az adenomák lehetnek hormonálisan aktívak vagy inaktívak, illetve megkülönböztetünk enyhe autonóm kortizol termelést (mild autonomous Kortizol secretion, MACS) mutató eseteket az AI-ák több, mint 50%-ában [33]. Ritkán előfordulhat, hogy a betegnek kétoldali adenomája van, és ebben az esetben a kétoldali mellékvese térfoglalás egyéb okait is figyelembe kell venni, mint például metasztatikus betegség, veleszületett mellékvese hyperplasia, lymphoma, fertőzések, vérzés és a mellékvese infiltratív állapotai.

1.1.2.1. A mellékvesekéreg adenoma etiológiája

A mellékvese adenomák hátterében már számos genetikai mutációt sikerült kimutatni, azonban a patogenezisük még nem teljesen ismert [39]. A *CTNNB1* gének mutációi, amelyek a Wnt/béta-catenin útvonal előállításához szükséges információkat hordozzák, a nagyobb és nem funkcionális mellékvesekéreg adenomákhoz kapcsolódnak. A kortizol termelő mellékvese daganatokkal kapcsolatos mutációk közé tartozik még a *PRKACA*, *GNAS1* (McCune Albright-szindróma), *MENIN* (1-es típusú multiplex endokrin neoplázia) és *ARMC5* (örökletes bilaterális mellékvese adenoma) [40–42] Az

aldoszterontermelő mellékvese adenomákkal kapcsolatos mutációk közé tartozik a *KCNJ5*, *ATP1A1*, *ATP2B3*, *CACNA1D* és *CTNNB1* gének mutációi [43,44].

1.1.2.2.A mellékvesekéreg adenoma klinikai képe

A hormonálisan inaktív vagy kisfokú hormontermeléssel járó adenomák (pl. MACS) általában tünetmentesek, és gyakran véletlenszerűen fedezik fel a hasi képalkotás során [33]. A glükokortikoid termelő mellékvese daganatok a Cushing-szindróma tüneteivel és jeleivel járhatnak, ideértve az elhízást, magas vérnyomást, hiperglikémiát, fáradtságot, depressziót, nőknél menstruációs rendellenességeket és virilizációt, proximális izomgyengésséget, livid striákat, pattanásokat, arc vérbőséget, osteopeniát és csonttöréseket [37]. Az aldosterontermelő daganatok (Conn-szindróma) magas vérnyomással jelentkezhetnek, amely gyakran rezisztens a három vagy több különböző osztályba tartozó vérnyomáscsökkentő gyógyszer alkalmazása ellenére. Conn-szindróma gyanúját fel kell vetni fiatalkori magasvérnyomásbetegség okaként, illetve mindig, amikor a magasvérnyomás hipokalémiával is jár.

A válaszadáshoz segítségül első választandó modalitás a mellékvese CT [45]. A 6 cm-nél nagyobb mellékvese tumorok esetében nagyobb a malignitás esélye [7]. A nem kontrasztos CT-vizsgálaton 10 HU-nál (Hounsfield egységnél) kevesebb mellékvese elváltozások jóindulatú adenomára utalnak [7,45]. Egyes jóindulatú adenomák 10 HU-nál magasabbak lehetnek. A kontrasztanyag kimosódás vizsgálata is segíthet a jó- és rosszindulatú folyamatok elkülönítésében [45]. Az MRI a CT-vizsgálat alternatívája lehet a mellékvese daganatok értékelésére [45].

A mellékvese-daganatok biopsziája általában nem javasolt, elsősorban a szövettani vizsgálat nehézsége, ill. a mintavétel esetleges szövődményei miatt. Nagyon ritkán, például máshogy nem kimutatható áttét, vagy egyéb etiológia (lymphoma) gyanúja esetén végezzük. Biopszia előtt először ki kell zárni a pheochromocytomát, mielőtt bármilyen invazív beavatkozásra sor kerülne.

Minden mellékvese-adenomában szenvedő betegnél ki kell vizsgálni a Cushing-szindróma lehetőségét, a pheochromocytomát és a hypertóniás betegeket pedig primer

aldoszteronizmus irányában kell tovább vizsgálni [37]. A Cushing-szindróma diagnosztizálásának első lépése az alacsony dóziszú (1 mg) dexametazon-szuppressziós teszt, amelyet minden esetben ajánlott elvégezni. A Cushing-szindróma esetében a legjobb negatív prediktív érték az 1,8 mcg/dl-nél kisebb plazma kortizolszint 1 mg dexametazon éjszakai beadása után. Emellett a 24 órás vizelet szabad kortizol meghatározása, valamint a kortizolritmus vizsgálata alkalmas szűrővizsgálatnak.

Phaeochromocytoma vizsgálatához a katekolaminok ill. lebomlási termékeinek kimutatása szükséges gyűjtött vizeletből vagy vérplazmából.

A plazma aldoszteronszint és a plazma renin aktivitás vagy koncentráció mérése javasolt azoknál a betegeknél, akiknél a mellékvese adenomához magas vérnyomásbetegség és/vagy hypokalaemia is társul.

1.1.2.3. A mellékvesekéreg adenoma kezelése és prognózisa

A hormontermelő mellékvese-daganatok műtéti eltávolítása szükséges. A hormonálisan inaktív, egyértelműen jóindulatú képalkotó jellemzőket mutató daganatok esetén a jelenlegi irányelvek szerint 4 cm-es átmérő alatt további vizsgálat, sőt követés sem szükséges. 4 cm-nél nagyobb méretű, de malignitásra nem gyanús mellékveseképlet esetén követés is elfogadható lehet, mindazonáltal 6 cm feletti átmérő felett a malignitás esélye nagyobb. Jelenleg nem állnak rendelkezésre hosszú távú prospektív adatok a szubklinikai Cushing-szindrómában (MACS) szenvedő betegek gyógyszeres vagy sebészeti kezelésének kiválasztásához. A mellékvese adenomában szenvedő betegek hosszú távú prognózisa kiváló. A hormontermelés nélküli mellékvese incidentalomák esetében 17%, 29% és 47% a hormonális aktivitás kockázata 1, 2 és 5 éven belül [46]. A jelenleg általános felfogás szerint a mellékvesekéreg adenoma nem a mellékvesekéreg-rák megelőző állapota, csak néhány irodalmi közlés utal arra, hogy nagyon ritkán a mellékvesekéreg-rákot megelőzően adenoma volt kimutatható.

1.2. A mellékvesekéreg daganatok differenciál diagnózisának kihívásai

Az utóbbi két évtizedben az egyre inkább igénybe vett képalkotó eljárásoknak is köszönhetően (ultrahang, computer tomográfia, mágneses rezonancia képalkotás stb.) a mellékvese térfoglalások egyre gyakrabban incidentaloma formájában, azaz véletlenszerűen, mellékleletként kerülnek felfedezésre [38]. A mellékvese-daganatok háttérében leggyakrabban mellékvesekéreg adenoma vagy egyéb benignus mellékvese daganat áll, mint például myelolipoma vagy cysta [45]. A malignus mellékvese daganatok háttérében populációs szinten leggyakrabban mellékvese metasztázis áll [3]. A differenciál diagnózisban a daganat klinikai viselkedése, képalkotó vizsgálatok és a hormonális fenotípus segíthet.

Bármely mellékvese térfoglalás esetén az alábbi két kardinális kérdést meg kell vizsgálni.

- Malignus tumorról van-e szó?
- Hormonálisan aktív-e?

A malignitás preoperatív megítélése gyakran nagy kihívást jelent. A daganat malignitásának megítélésében a képalkotó vizsgálatokon alapuló Európai Hálózat a Mellékvese Tumorok Kutatásáért (European Network for the Study of Adrenal Tumors, ENSAT) és az Európai Endokrinológiai Társaság (European Society of Endocrinology, ESE) irányelvei nyújtanak segítséget [7,36]. A nem kontrasztos CT felvételen látott 4 cm-nél kisebb legnagyobb daganat átmérő, homogén massa, magas lipidtartalomra utaló alacsony denzitás (<10 HU) esetén a daganat további kontrollja nem szükséges, annak malignitása kizárható [45]. Ettől eltérő esetekben szükség van egyéb képalkotó vizsgálatra és a beteg utánkövetésére vagy pedig azonnali sebészi eltávolításra. A jelenlegi irányelvek szerint a mellékvese biopszia csak ritkán képezi részét a preoperatív differenciáldiagnosztikai algoritmusnak, kiváltképp a vizsgálat ACC-re vonatkozó gyenge szenzitivitása (70%) és az esetleges komplikációk (2,5%) volta miatt [47,48]. A mellékvese biopszia hormonális aktivitást nem mutató mellékvese térfoglalás és nem egyértelmű képalkotó eredmények esetén indokolt, különösképp aktív extra-adrenalis malignitás megléte esetén. A gyenge szenzitivitás háttérében a mellékvese biopsziával nyert szövetminta gyakran nehéz mikroszkópos megítélhetősége állhat. Jelenleg nem ismert olyan szöveti vagy vérből vizsgálható biomarker vagy biomarkerek, amely megbízhatóan informálna a daganatok jó- vagy rosszindulatúságát illetően. A malignitás posztoperatív hisztológiai megállapítása is gyakran nehézkes és nagy szakértelmet

igényel. A jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg daganatok megkülönböztetésére számos szövettani és/vagy további markeren alapuló osztályozási rendszer létezik (Weiss-score, modifikált Weiss-score, van Slooten index, Helsinki osztályozás, reticulín festődés vizsgálata), amely tükrözi a differenciáldiagnosztikában rejlő nehézségeket [49–51]. A Weiss-rendszert használva a három vagy magasabb pontszám ACC diagnózisát támasztja alá [34]. Weiss-score esetén a 2 és 3 pont a jóindulatú és rosszindulatú daganatok közötti határvonalnak tekinthető (bizonytalan malignus potenciálú daganatok). Ebben az esetben a többi felsorolt osztályozási rendszer egyikét lehet segítségül hívni a diagnózis eldöntéséhez [36]. Különös figyelmet kell fordítani a mellékvesekéreg daganatok nem szokványos szövettani változataira, elsősorban az onkociter daganatokra, amelyek sajátosságaik miatt dignitástól függetlenül mindig legalább 3-as Weiss-pontszámmal rendelkeznek [52–54]. Ezeknél a daganatoknál a Lin-Weiss-Bisceglia adaptált pontozási rendszert kell alkalmazni [36].

Ezen felül, a nem egyértelműen eldönthető határeseti diagnózisok és a szakértői leírások közötti jelentős variabilitás is a diagnosztikai korlátok közé tartozik. Leginkább ezen tényezők miatt nem ajánlott jelenleg a mellékvesekéreg biopszia a legfrissebb irányelvek alapján.

A mellékvese daganattal diagnosztizált betegek esetén a mellékvesekéreg (mineralokortikoid, glükokortikoid, androgén hormonok) és velő (katekolaminok) valamennyi hormonjának kivizsgálása indokolt. Tünetektől függetlenül, minden beteget ki kell vizsgálni éjszakai 1 mg dexametazon szuppressziós teszttel [45]. Primer aldosteronizmus kivizsgálása magas vérnyomásbetegség esetén, míg pheochromocytoma kivizsgálása minden kétes esetben elvégzendő [45]. Továbbá, a hormonális vizsgálatok segíthetnek a jó- és rosszindulatúság megítélésében is. Kombinált hormontúlermelés például kortizol- és androgén ko-szekréció igen jellegzetes ACC-re. Az egyedüli hormontermelés háttérben lehet adenoma, karcinóma és pheochromocytoma is. Habár a szteroid metabolitok vizsgálatának elvégzése rutinszerűen nem indokolt, ígéretes módszer lehet a virilizáló, illetve mellékvesekéreg karcinóma gyanújával kivizsgálás alatt álló betegek esetén [55].

1.3. A nem kódoló RNS-ek

A nem kódoló RNS-ek a DNS-ről való átíródás után nem kódolnak aminosavszekvenciát, funkcióikat tehát nem a fehérjék kódolásában látják el. A korábban biológiai funkció nélkülinek gondolt molekulákról ma már tudjuk, hogy a humán transzkriptom megközelítőleg 98%-át teszik ki [56]. A rövid nem kódoló RNS-ek közé tartozik például a mikroRNS (miR, miRNS), short interfering RNS (siRNS) és a PIWI-interacting RNS (piRNS), míg a hosszú nem kódoló RNS-ek (200 nt <) közé a hosszú nem kódoló RNS-ek (long non-coding RNS, lncRNS) és cirkuláris RNS-ek (circRNS) tartoznak [57–60]. Olybá tűnik, hogy ezen RNS-ek, olyan mindezidáig teljességében fel nem derített rejtett genetikai jeleket tartalmaznak, amelyek a génexpresszió különböző szintjeit szabályozzák az élettani folyamatokban és a fejlődésben, beleértve a kromatin architektúrát, epigenetikai memóriát, a transzkripciót, az RNS-splicinget, RNS-szerkesztést, RNS-transzlációt és RNS-lebomlást – mindezt a DNS bázissorendjének megváltoztatása nélkül [59]. A bázissorend megváltoztatása nélküli genetikai folyamatokat epigenetikának nevezik. Az epigenetikai RNS szabályozó mechanizmusok meghatározzák komplex tulajdonságaink többségét, jelentős szerepet játszanak a betegségekben, és mind a fajon belüli, mind a fajok közötti genetikai változatosság feltáratlan világát nyitják meg előttünk.

1.3.1 A mikroRNS-ek

A mikroRNS-ek rövid, 19–25 nukleotid hosszúságú, evolúciósan konzervált, érett formáikban egyszálú molekulák, amelyek a humán gének 30–60%-át modulálják poszttranszkripcionális szinten, az epigenetikai – DNS-szekvencia megváltoztatásával nem járó – szabályozás révén [61]. A mikroRNS-ek az RNS interferencia endogén mediátorai. A miRNS-ek a citoplazmában a messenger RNS-hez (mRNS) kötődve járulnak hozzá azok degradációjához vagy csendesítéséhez a transzláció gátlásán keresztül [62]. A mikroRNS-ek sejtmagban betöltött funkciói közt leírták a hisztonfehérjék és géntanszkripció modifikálását is [63]. A mikroRNS expresszió diszregulációját a tumorigenezis egy korai lépésének tartják [64]. A mikroRNS-ek

onkogénként (oncomiR) és tumorszuppresszorként is működhetnek [65]. A humán genom hozzávetőleg 2600 érett mikroRNS-t kódol a miRBase v.22 adatai szerint [66,67].

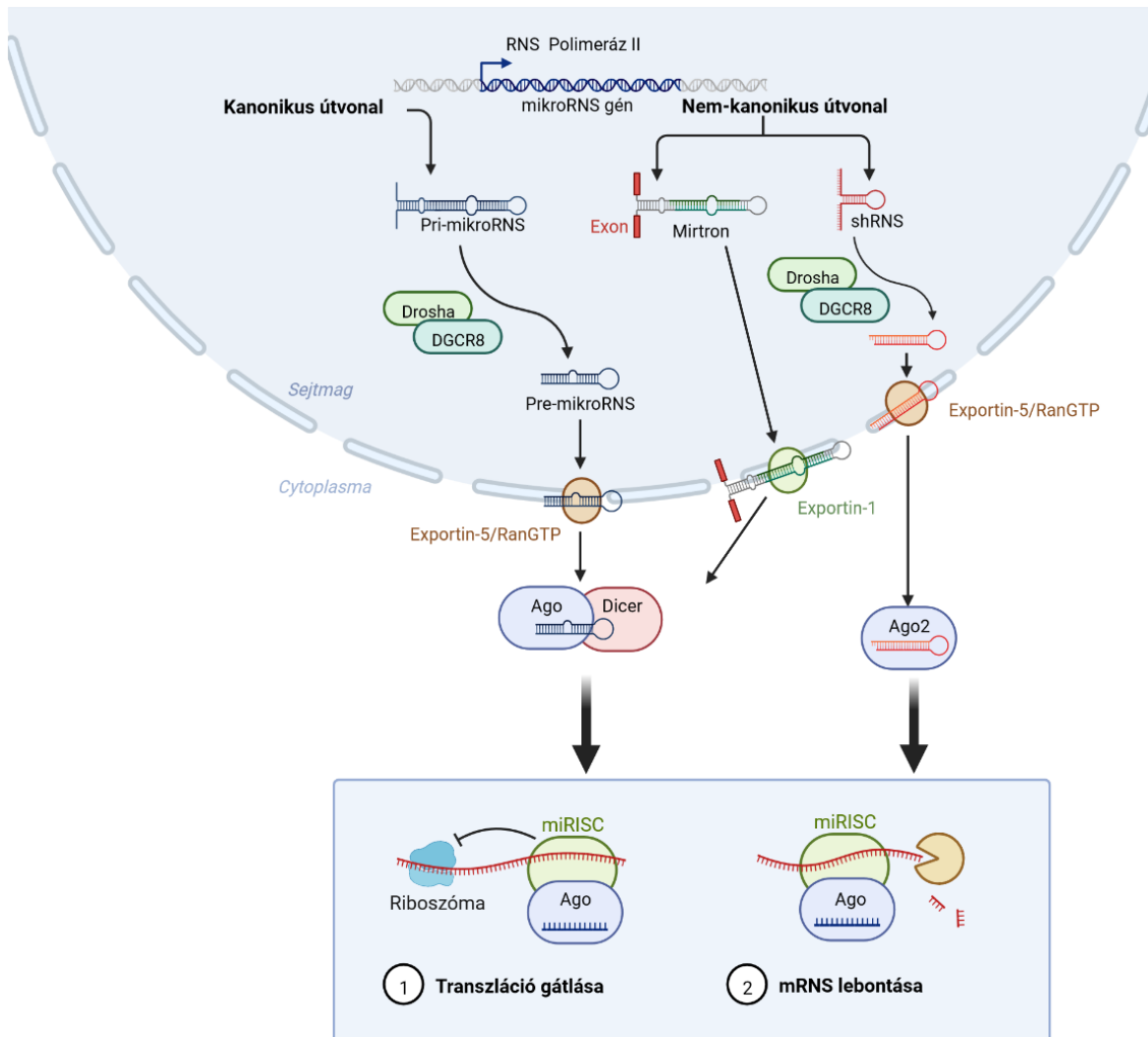
1.3.1.1. A mikroRNS-ek képződése

A mikroRNS-ek körülbelül fele külön mikroRNS-gének által kódolt intragénikus régiókban helyezkednek el – amelyeket leginkább intronok és csak elvétve exonok alkotnak – míg fennmaradó hányaduk a génektől távol az ún. intergénikus régiókban helyezkedik el [68–70]. A sejtmagban az elsődleges transzkriptumok (pri-mikroRNS) átírását az RNS-polimeráz-II és III végzi, attól függően, hogy intra- vagy intergénikus elhelyezkedésű mikroRNS-ről van szó [71]. Néha a mikroRNS-ek egy hosszú „cluster”-ként íródnak át, amelyek magi régiói hasonlíthatnak egymáshoz, így ezeket a mikroRNS-eket egy „családba” tartozónak gondolják [72]. Képződésük egyaránt követhet kanonikus vagy nem-kanonikus útvonalat is, amelyek egymástól leginkább a mikroRNS érésében résztvevő hasító enzimkomplexekben térnek el.

A kanonikus útvonal során az átíródott pri-mikroRNS egy mikroprocesszor komplex által pre-mikroRNS-sé érik a DiGeorge Syndrome Critical Region 8 (DGCR8) és a ribonukleáz III enzim a Drosha segítségével a sejtmagban. A DGCR8 felismeri és megköti, mindeközben a Drosha elhasítja a hajtú alakú pri-mikroRNS-t annak alapján [73]. A sejtmagból való kijuttatását az exportin 5 (XPO5)/RanGTP komplex végzi, amely után az RNáz III endonukleáz típusú Dicer hasítja tovább a hajtú alakú pre-mikroRNS-ből ezáltal két teljesen érett mikroRNS-t hozva létre a citoplazmában [74,75] (**1. ábra**). A mikroRNS szálak 5' és 3' végekhez viszonyított elhelyezkedése szabja meg, hogy 5p- vagy 3p végződést kap az érett mikroRNS [68].

A nem-kanonikus útvonalak közül már többet is leírtak [76–79]. Közös tulajdonságuk, hogy a kanonikus útvonaltól eltérő fehérjék vesznek részt a mikroRNS-ek érésében. Ezen útvonalak csoportosíthatók Drosha/DGCR8-független és Dicer-független mechanizmus szerint. Az érés első lépcsőjét mellőző Drosha/DGCR8-független útvonal során a sejtmagban termelt pre-miRNS-ek képződésük után – és az exportin 1-en való átjutásuk után – máris a citoplazmatikus Dicer szubsztrátjaivá válnak, amely képes megkötni és hasítani azokat. Ilyenek például a mirtronok, amelyek az mRNS érés során kivágódott

intronokból keletkeznek [78,79]. Ezzel szemben, a Dicer-független mikroRNS-eket a Drosha dolgozza fel az úgynevezett „rövid hajtű” RNS (short hairpin RNA, shRNA) transzkriptumokból a sejtmagban és az exportin 5 transzporterrel való átjutásuk után az Argonaute2 (AGO2) fehérje által válnak éretté a citoplazmában (**1. ábra**) [77].



1. ábra: A mikroRNS képződés kanonikus és nem kanonikus útvonala (saját ábra). A kanonikus útvonalon a pri-mikroRNS-t a Drosha/DGCR8 hasítja pre-mikroRNS-sé, amely az exportin-5/RanGTP-vel kijutva kerül a citoplazmába. Az Ago/Dicer tovább hasítja, hogy végleges formát érjen el. A nem-kanonikus útvonalon megkülönböztetünk Drosha/DGCR8 függő- és független útvonalat, amelyek végén szintén érett mikroRNS képződik. MikroRNS-ek fő funkciói: transzláció gátlása, mRNS lebontása .

Érés útvonaltól függetlenül az érett mikroRNS mellett képződő komplementer szál általában lebomlik, ritkán további folyamatokban vehet részt. Valamennyi útvonal vezető, azaz le nem bomló szála az AGO fehérjecsald egyik tagjához kötődik és a mikroRNS indukálta csendesítő komplexben végződik (miRNA-induced silencing

complex, RISC), amely a cél mRNS-hez kötődve képes gátolni annak translációját és ritkábban képes magát az mRNS molekulát is lebontani [80].

1.3.1.2. A mikroRNS-ek funkciói

A mikroRNS-ek az epigenetikai szabályozómechanizmusok egyik fő regulátorai, amelyek posztranszkripcionálisan modulálják a génkifejeződést. A génkifejeződést általában a miRISC komplex részeként csendesítik, hozzákötődve az mRNS 3' le nem fordítódó régiójához (untranslated region, UTR), ezzel annak gátlásához vezetve [81]. A báziskomplementaritásnak meghatározó szerepe van a miRISC által kifejtett gátló hatásban, hiszen amennyiben teljes komplementaritás áll fenn a mikroRNS és mRNS között, az mRNS elbontásra kerül, míg részleges komplementaritás esetén csupán a transláció gátlódik [82]. Az mRNS-en található komplementer szekvenciákat mikroRNS rezponzív elemeknek nevezik (MRE). Ezeknek a szakaszoknak meghatározó szerepük van a mikroRNS-ek közvetlen- vagy közvetett módon történő géncsökkentésében [82].

Ezen felül a mikroRNS-ek redundanciát is mutatnak, ami azt jelenti, hogy egy mRNS akár több száz mikroRNS célpontjaként is szolgálhat egy időben, továbbá egyazon mikroRNS több genomi régióból is kifejeződhet, ami a redundancia egy másik formája [83]. A mikroRNS-ek komplexitását tovább növeli a már említett „cluster”-ként való átíródásuk és a paralóg mikroRNS-ek „családokba” rendeződése. Másik jellemző tulajdonságuk a pleiotrópia, amely szerint egy mikroRNS akár több száz mRNS-sel is kapcsolatba léphet [84]. A mikroRNS-ekre sejt-, szövet- fejlődés- és betegség-specifikusság is jellemző [85]. Mindezen komplexitás eredménye, hogy a család több tagjának deléciója esetében várhatunk általában fenotípusos következményt, amely jelentősen nehezíti a mikroRNS-ek terápiás célú felhasználhatóságát, de egyúttal a mikroRNS alapú diagnosztikát is kihívások elé állítja, amely utóbbi problémára PhD kutatásaim során is megoldást kerestünk a mikroRNS kombinációk alkalmazásával.

A mikroRNS-ek szerteágazó hatásaira példa a sejtciklus, -differenciálódás, sejtproliferáció, hormontermelés és apoptózis szabályozása, továbbá szerepet játszanak a vérképzésben és az egyedfejlődésben, illetve megváltozott expressziójuk révén hozzájárulnak daganatok, autoimmun- és érrendszeri betegségek kialakulásához [86]. A

mikroRNS-ek fentebb már említett szövetspecifikus kifejeződésnek eredményeképpen a különböző szövetekben eltérő mikroRNS-profil jön létre az emberi szervezetben. Patogenetikai jelentőségüket alátámasztja az a tény, hogy míg egy mikroRNS egy adott sejtben betölthet aktiváló vagy épp csendesítő funkciót, lehetséges, hogy egy másik sejtben épp az előbbivel ellentétes vagy eltérő irányú hatást fejt ki [62]. Ennek okán tumorbiológiai szempontból ugyanaz a mikroRNS az egyik szövetben tumor szuppresszor, addig a másik szövetben onkogén funkciókat is betölthet. Az onkogén mikroRNS-ek (oncomiR) segítik a daganat progresszióját az érújdonképződésen-, proliferáción keresztül vagy csökkentik a tumor szuppresszorok hatását. A tumorszuppresszor mikroRNS-ek a sejt differenciációhoz és apoptosishoz járulnak hozzá. Például, míg a *hsa-miR-24* kolorektális daganatokban csökkent kifejeződést mutat, addig hepatocellularis karcinómában felülexpresszió figyelhető meg [87,88]. Daganatokban az onkogének legtöbbször felülexpresszáltak, míg a tumorszuppresszorok alulexpresszáltak.

A szöveti mikroRNS-ek a kódoló RNS-eknél mutatott hosszabb felezési idejük és stabilitásuk révén kiválóan vizsgálhatóak formalinnal fixált, paraffinba ágyazott szövetmintákon is (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE), amely lehetővé teszi az egyébként ritka mellékvesekéreg karcinóma minél nagyobb számú archivált szövetmintáin történő méréseit is [89,90].

1.3.1.3 A mikroRNS-ek mellékvesekéreg daganatokban betöltött szerepe

A mellékvesekéreg daganataiban, azon belül is a mellékvesekéreg karcinóma patogenezisében történt előrelépések ellenére, még mindig messze vagyunk attól, hogy tiszta képünk legyen az ACC kifejlődésében szerepet játszó mechanizmusokról. Számos molekuláris mechanizmus eseményeit hozták már összefüggésbe az ACC tumorigenezisével [91]. Például a *TP53* (tumor protein p53) gén csírsejtes és szomatikus mutációi [92,93], a Wnt/ β -catenin aktiválódása a szomatikus *CTNGB1* (catenin béta 1) mutáción keresztül [94], *IGF-2* [95,96] és SF1 (szteroidogénikus faktor-1) gének felülexpressziója [97], valamint mutációk az mismatch javító génekben mind az ACC kialakulásához kapcsolódnak [31]. A korábban felsoroltakból csak az *IGF-2* hozható összefüggésbe az ACC kialakulásában szerepet játszó mikroRNS szabályozással. Ismert,

hogy az *IGF-2* gén ACC-ben felülexpresszálódik és a képződött fehérje kötődik az inzulinszerű növekedési faktor receptor 1-hez (*IGF-1R*), amely útvonal aktivációját egy kulcstényezőnek tartják az ACC kialakulásában [98]. A *hsa-miR-483-5p* és *hsa-miR-483-3p* génje a *IGF-2* intron régióján belül helyezkedik és már számos tanulmány kimutatta felülexpresszióját ACC-ben adenomákhoz képest az *IGF-2* felülexpressziójával egyetemben [99–104] Másrészt, az ACC-ben leginkább alulexpressziót mutató *hsa-miR-99a* és *hsa-miR-100* képesek kötődni az *IGF-1R* és *mTOR* (mammalian target of rapamycin) mRNS-hez, ezáltal szabályozva ezen fehérjék kifejeződését, habár a *hsa-miR-100* alulexpresszióját nem tudták összefüggésbe hozni *IGF-1R* expressziójával ACC-ben [105,106].

Számos cink ujj doménnel rendelkező fehérjét írtak már le az általános tumorprogresszió kapcsán [107]. A cink ujj fehérje 367 (*ZNF367*) hatással van a sejtadhézióra, invázióra, migrációra, adhézióra és kimutatták felülexpresszálódását ACC-ben az ACA-hoz képest, illetve negatív korrelációt sikerült igazolni a *ZNF367* fehérje és *hsa-miR-195* között [108]. A *LIN28A* jelentős felülexpresszióját figyelték meg ACC-ben a mellékvesekéreg adenomához képest, illetve érdekes módon agresszív ACC-ben a nem agresszív formához képest a *LIN28* fehérje expressziója alacsonynak bizonyult, míg ennek a fehérjének egy negatív szabályozója, a *hsa-miR-9* felülexpresszálódott [109]. A *hsa-miR-9* erős korrelációt mutatott az ACC-s betegek túlélésével, illetve felülexpresszióját is kimutatták ACC-ben ACA-hoz képest [109].

A *DICER1* szabályozási zavara, amely a mikroRNS érés egyik fő enzime, szintén megfigyelhető számos különféle daganatos megbetegedésben [110,111]. A *hsa-miR-103/miR-107* családról kimutatták, hogy szabályozza a *DICER1* kifejeződését [112]. A *DICER1* szignifikánsan túltermelődik ACC-ben az ACA-hoz képest, ezen felül a *DICER1* alacsony expressziója rossz túléléssel jár, illetve prognosztikai tényezőként szolgálhat lokális recidíva vagy metasztázisok esetében, míg a *hsa-miR-107* felülexpresszióját mutatták ki ACC-ben ACA-hoz képest [113].

Kutatócsoportunk első mikroRNS expresszióval foglalkozó vizsgálataiban szignifikánsan eltérően expresszálódott mikroRNS-eket találtunk ACC-ben az ACA-hoz és a normál mellékveséhez képest, beleértve a felülexpresszált *hsa-miR-503*-at, a *hsa-miR-184*-et, a *hsa-miR-210*-et, a *hsa-miR-214*-et, a *hsa-miR-375*-öt és a *hsa-miR-511*-et.

Ezen mikroRNS-ek komplex útvonal analízise sejtciklus károsodást mutatott ki a G2/M ellenőrzőponton ACC-ben [114,115].

ACC és ACA között szignifikánsan eltérő kifejeződést mutattak ki a *hsa-miR-139*, *hsa-miR-335* és *hsa-miR-675* esetében, amelyek útvonalelemzése alapján kiderült célpontjaik között cink ujj fehérjék szerepelnek [116]. A *hsa-miR-205* alulexpresszióját is leírták ACC-ben az ACA-val összehasonlítva [117]. A *hsa-miR-205* funkciói között szerepel az apoptózis indukciója, proliferáció gátlása sejtenyészetben (SW-13 mellékvesekéreg karcinóma sejtvonal) és az *in vivo* tumornövekedést is gátolja, ami e mikroRNS tumorszuppresszor szerepére utal [117]. A célpont predikciós vizsgálatok a *Bcl-2*-t (B-sejtes limfóma 2) tárta fel a *hsa-miR-205* potenciális célpontjaként, az SW-13 sejtekben, pedig negatív korreláció volt megfigyelhető a mikroRNS és a *Bcl-2* expressziója között [117]. A *hsa-miR-205* ezért potenciálisan képes gátolni a tumor progresszióját ACC-ben a *Bcl-2* gátlásán keresztül.

1.3.2. A cirkuláris RNS-ek

Egy másik, általunk vizsgált és az epigenetikai szabályozásban részt vevő – szintén főként posztranszkripcionális szinten – nem-kódoló RNS-ek közé tartozó molekula a cirkuláris RNS (circRNS). Nevüket a kovalens kötéssel bezárt, „cirkularizált” alakjuknak köszönhetik. Nem lineáris szerkezetük miatt sokáig „összekeveredett exonoknak” („scrambled exons”), érdemi biológiai hatás nélküli melléktermékeknek tekintették őket [118,119]. Kimutatásuk a lineáris RNS-ekhez képest összetettebb, speciális laboratóriumi- és bioinformatikai feldolgozást tesz szükségessé.

1.3.2.1. A cirkuláris RNS-ek képződése

Az aktív gének mintegy 5-20%-a képes circRNS expresszióra [120]. Az RNS-ek cirkularizálódása a leggyakrabban a spliceosomán keresztül megy végbe (RNS és fehérjék szupramolekuláris komplexe) a pre-mRNS-ből az RNS-polimeráz-II (RNAPII) és a hordozó gének segítségével [121]. A circRNS-ek a még nem teljesen érett, intronokat is tartalmazó pre-mRNS-ből képződnek egy „backsplicing”-nak nevezett

cirkularizálódási mechanizmussal, melynek során a 3'-vég és az 5'-vég között kovalens kötés jön létre [122]. A circRNS szintézise különböző endogén és exogén hatásokra némi latenciával (napok, hetek) képes fokozott vagy csökkent kifejeződést mutatni és expressziójának mértéke eltér az azonos lókuszon kódolt lineáris RNS-étől [122]. Ez azzal magyarázható, hogy a circRNS-ek képződése nem a társ mRNS (azonos génről átíródó, rokon mRNS) kifejeződésének mértékével áll összefüggésben, hanem alapvetően az intron szerkezete határozza meg (reverz, repetitív komplementer szekvenciák) a backsplicing gyakoriságát, emellett nem csupán donor és akceptor véletlenszerű fúziójáról, hanem különböző szabályozó mechanizmusok összjátékáról van szó [123]. A circRNS-eknek nincs poly(A)-farkuk, 5'-sapkájuk és szabad végződésük, s ezen tulajdonságok és az RNáz R-rel (3'-5' exonukleáz) szembeni rezisztencia miatt a felezési idejük 2–10-szer hosszabb (48 óra <) lineáris mRNS társaikénál, illetve kimutatásuk ezért az RNáz R előkezelésre épül [123,124]. Azonban a transzkripció végtermékek csupán egy kis része circRNS a lineáris társaikhoz képest [125]. Egy példával megvilágítva e komplex folyamatot, ismert, hogy a vérlemezkékben az exonukleázokra rezisztens circRNS-ek relatív többsége jön létre, azáltal, hogy a vérlemezkék érésük során sejtmagjukat, ezzel együtt további transzkripció potenciáljukat elvesztik, ami a rövidebb életű mRNS-ek relatív hiányához vezet [126]. A vérlemezkéken kívül még a neuronokban is egészen magas circRNS szintet figyeltek meg, aminek oka jelenleg még nem teljesen tisztázott [125,126]. Emellett a circRNS-ek 90%-a sejtenként csak 1–10 molekulapéldányból áll (az mRNS-ek mediánja 17 molekula/sejt), mindazonáltal sejtenként átlagosan 25 000 izoforma mennyiséget ér el [127]. Méretüket tekintve átlagosan 547 nukleotidból állnak, s ez megfelel a ténynek, miszerint átlagosan 1–5 exont tartalmaznak, amelyek körülbelül 20–200 nukleotid hosszúak [127–131].

1.3.2.2. A cirkuláris RNS-ek funkciója

A splicing mechanizmustól függően összességében három osztályát különböztetjük meg a circRNS-eknek, amelyek különböző lokalizációkban fejtik ki hatásaikat. A nukleáris lokalizációjú 2'-5' circRNS-t, amely csak intronokat tartalmaz (ciRNS); a szintén nukleáris lokalizációjú, 3'-5' exon-intron szekvenciákat tartalmazó EIciRNS-t és a leggyakoribb citoplazmatikus lokalizációjú 3'-5' exonális circRNS-t [132]. A circRNS-

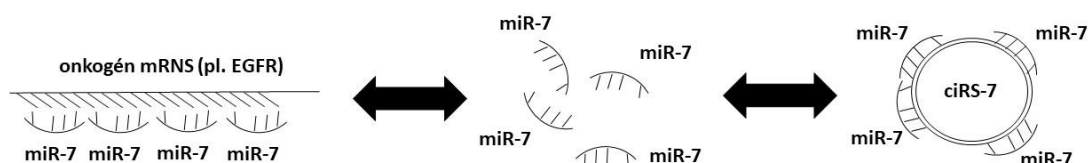
eket szövet-, fejlődés- és tumorspecifikus expresszió jellemzi [128]. A colorectalis rák, hepatocellularis rák, tüdőrák, glioma, osteosarcoma, valamint hematológiai és egyéb tumorok kialakulásában írták le szerepét [133]. Részt vesznek a normális idegi működés szabályozásban, a veleszületett immunitásban és a sejtproliferációban [128]. Hatásukat kétféleképpen fejtik ki. A circRNS-ek kialakulása már önmagában, a transzkripció enzimekért való kompetíció révén is módosítja a társ mRNS-ek expresszióját, hiszen egyazon lókusztól fejeződnek ki, másrészt a kialakult termékek transzregulációs képességgel bírnak. A circRNS-ek transzregulációs hatásait emberben négyféleképpen fejtik ki: I) a mikroRNS-ek „szivacs-ként” való megkötésével a kódoló RNS-eket felszabadítják a lebomlástól, utat engednek transzlációjuknak; II) fehérjékhez kötődve gátolják a riboszóma bioszintézissel és -transzlációval kapcsolatos reakciókat; III) stimulálni tudják a gének RNAPII általi iniciációját, elongációját IV) végül a circRNS-ek képesek vázként szolgálni két vagy több fehérje enzimátikus reakciójához, illetve képesek megfelelő lókuszhoz asszociálva transzkripció faktorokat is kötni [133]. Egy friss tanulmány alapján sokkal gyakoribb a circRNS-ek transzlációja, mint azt előtte feltételezték, azonban ennek jelentősége még tisztázásra vár [134]. Más circRNS-ek pedig pszeudogének (olyan nukleotidszekvenciák, amelyek csak látszólag kódolnak egy génterméket, de az vagy funkcióképtelen, vagy ki sem fejeződik) forrásai lehetnek [135].

1.3.2.3. A cirkuláris RNS-ek daganatokban betöltött szerepe

A cirkuláris RNS-ek tumorbiológiai jelentősége kettős. Egyrészt, a circRNS-ek potenciálisan egy új, szöveti vagy akár a vérben keringő biomarkerként szolgálhatnak az egyéb biomolekulákhoz, mint például a lineáris RNS-ekhez vagy peptidekhez viszonyított nagyfokú stabilitása folytán – mindez pedig egy különösen releváns paraméternek tűnik. Másrészt, számtalan circRNS vesz részt a különböző tumorképző folyamatokban, például a *circHIPK* a tumorigenezisben jelentős szerepet játszó mikroRNS-ek [136], szivacs-ként való megkötése révén colorectalis-, hepatocellularis-, vese-, húgyhólyag-, prosztata-, mell- és gyomorrákban játszik szerepet, míg a *hsa_circ_0004277* ígéretes diagnosztikai marker és terápiás célpont az akut myeloid leukaemiában [137–139].

A circRNS-ek „szivacsként” képesek megkötni a miRNS-eket, ezzel az epigenetikai módosítással egyfajta endogén RNS-kompetíciót hoznak létre [133]. Eddig csak néhány, mikroRNS-hez több kötőhellyel is rendelkező circRNS-t fedeztek fel, és a legtöbb circRNS valószínűleg egyéb funkciókat is ellát, mint a mikroRNS-ek szabályozása [131]. Sok circRNS tartalmaz egyetlen, vagy csak néhány mikroRNS-kötő helyet, néhány pedig több mikroRNS-t, vagy akár teljes mikroRNS-családot is szabályoz. Kimutatták például, hogy a *CCDC66* génből származó circRNS sokkal több kötőhelyet tartalmaz az onkogéneket célzó mikroRNS-ek részére, mint maguk a tumor szuppresszor gének, a *circFoxo3* pedig több mikroRNS kötőhelyet is tartalmaz a lineáris *Foxo3* transzkriptumot megcélzó mikroRNS-ek számára, így felszabadítja azt a mikroRNS-függő degradációtól [140,141]. Az RNS kompetíció egyik legszéleskörűbben tanulmányozott tagja a *ciRS-7*, amely relatíve magas kifejeződési rátával és stabilitással bír, és képes szupprimálni a *hsa-miR-7*-et, ezáltal növelve a *hsa-miR-7* célgének expresszióját. Tekintettel arra, hogy a *hsa-miR-7* közvetlenül onkogének (például EGFR, PIK3CD, IRS1 és 2, Raf1, Pak1, Ack1) expresszióját gátolja, az előbbi folyamat hatásaként hozzájárul a tumorprogresszióhoz (**2. ábra**) [142]. A *circPVT1* egy olyan circRNS, amely számos tumorszuppresszor mikroRNS-t, köztük a *let-7b*-t is képes megkötni, amely mikroRNS-család differenciált expresszióját már több tanulmány is kimutatta mellékvesekéreg tumorokban, köztük a kutatócsoportunk is [143–145]. Azt is meg kell említeni, hogy egy mikroRNS circRNS-hez való kötődése nem mindig eredményezi a mikroRNS gátlását. A *ciRS-7* esetében például a *hsa-miR-671*-hez kötődve AGO2-függő módon hasad, ezáltal felszabadítva a megkötött *hsa-miR-7*-et [146]. Így elképzelhető, hogy a mikroRNS-kötő helyekkel rendelkező circRNS-ek mikroRNS-ek rezervoárjaként működnek, vagy épp elősegítik a mikroRNS szállítását.

A cirkuláris RNS-ek mikroRNS „szivacs” funkciója



A miR-7 onkogének kifejeződését gátolja

A ciRS-7 gátolja a miR-7-et

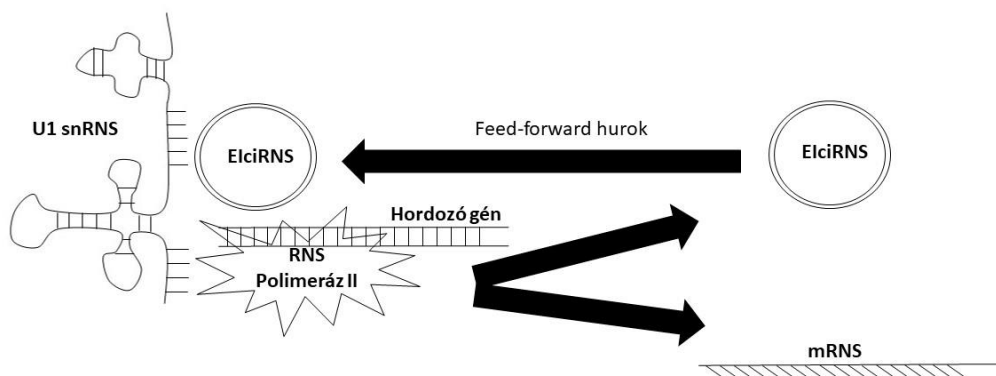
2. ábra: A *ciRS-7* jelenlétében a *miR-7* nem képes gátolni pl. az onkogének kifejeződését, ezáltal fejtve ki onkogén hatását [147]. Nyíl: a miR-7 egyensúlyi állapotának eltolódása aktív (balra), illetve passzív (jobbra) irányba.

A circRNS-ek egy csoportja képes RNS-kötő fehérjékhez is asszociálni. Közülük a legalaposabban tanulmányozott az ún. MBL fehérje (mannóz-kötő fehérje), amely az *mbl* lókusztól származik és a circRNS-hez történő kötődés hatására nem képes egyéb targetekhez kötődni [122]. Az MBL fehérje kötődni tud a cirkuláris exont körülvevő intronokhoz és elősegíti annak biogenezisét, ezért része lehet egy autoregulációs körnek: ha a fehérje feleslegben van, a circRNS biogenezis elősegítésével csökkentheti saját mRNA termelését. Egy másik, tumorigenezisben is feltételezhetően szerepet játszó circRNS a *PABPN1* génről kifejeződő *circPABPN1* HuR RNS-kötő fehérjéhez való kötődése [148]. A HuR a *PABPN1* mRNA-hez kötődik és fokozza annak transzlációját, így a *circPABPN1* kiterjedt kötődése HuR-hoz megakadályozza a HuR kötődését a *PABPN1* mRNA-hez, és csökkenti annak transzlációját. Egyelőre még nem bizonyított, csak feltételezhető, hogy a *circPABPN1* szerepet játszik a tumorigenezisben, mivel a HuR számos tumorszuppresszor és tumorigenezissel is kapcsolatos génből származó mRNA-t is megcéloz, mint például a *TP53*, *VHL*, *MYC*, *HIF1A* és *BCL2* [148]. Ezenkívül a HuR mikroRNS szabályozó funkcióit is leírták már, beleértve a kutatócsoportunk által is vizsgált általános tumorszuppresszor mikroRNS-t, a *hsa-miR-7*-et [149,150].

Az enzimek és szubsztrátjaik kötőhelyeit tartalmazó circRNS-ek valószínűleg egyfajta vázként is működnek, elősegítve a két vagy több fehérje közötti interakciót. A legjobban tanulmányozott példa a *circFoxo3*, amely kötőhelyekkel rendelkezik az egér double-minute 2 (MDM2) és a p53 számára [151]. Ezen kötőhelyek mutációja vagy a circRNS kiütése a p53 MDM2 antitesttel való kisebb mértékű lehúzását eredményezte, és *vice versa*, alátámasztva azt az elképzelést, hogy a *circFoxo3* fehérjevázként működhet [151]. Továbbá kimutatták, hogy a *circFoxo3* elősegítette a p53 MDM2 közvetítette ubikvitinációját, amely ennek következtében a proteaszóma által lebomlik [151]. A circRNS-ek már említett hosszú féléletideje elősegíti a fehérjevázként betöltött szerepüket és a jövőben valószínűsítik több ilyen circRNS felfedezését [133].

Ugyan a legtöbb circRNS – a mikroRNS-ekhez hasonlóan – a citoplazmában fejt ki hatásait néhány circRNS azonban bennmarad a sejtmagban, ahol szabályozhatják a transzkripciót vagy elősegíthetik az alternatív splicinget. Kimutatták, hogy az exon-intron circRNS-ek az RNS polimeráz II-höz kapcsolódnak, és elősegítik a saját génjeik transzkripcióját az U1 snRNP-vel való kölcsönhatás révén (**3. ábra**) [152]. A cirkuláris és lineáris splicing közötti egyensúly megzavarása elősegítheti az onkogének és a tumor szuppresszor gének aberráns expresszióját, jelenleg azonban nem ismert, hogy az exon-intron circRNS-ek deregulálódnak-e a tumoros folyamatokban.

Az ElciRNS-ek transzkripcióra kifejtett hatásai



3. ábra: Az ElciRNS-ek a saját kifejeződésüket növelve feed-forward hurkot (hosszú nyíl) hoznak létre, illetve növelik a hordozó gén mRNS kifejeződését is [147]. Rövid nyíl: transzkripció folyamata.

Bár a circRNS-ek általában nem kódolnak fehérjét, azonban a specifikus circRNS-ek, beleértve a *circ-ZNF609*-et és a *circMbl*-t, belső riboszóma belépési helyeket (internal ribosome entry site, IRES) tartalmaznak és transzláción mehetnek keresztül [153,154]. A circRNS-ek olyan nagyobb fehérjéket is kódolhatnak, amelyek funkcionális jelentőséggel bírnak a rák esetében, erre példa a *circARHGAP35*-ből és a *circMAPK1*-ből előállított onkogén fehérjék [155,156]. Számos circRNS, köztük az E-cadherin génből (*CDH1*) származó, *circ-E-Cad* is egyedi peptideket kódol, amelyek potenciálisan funkcionális jelentőséggel bírnak daganatos elváltozásban [157].

2. Célkitűzések

A mellékvesekéreg adenoma és karcinóma szövettani differenciáldiagnózisa nehéz és nagy szakértelmet igényel, ezért a mellékvese daganatok megkülönböztetésére tett intézkedések kiemelkedő jelentőséggel bírnak. Számos szerv jó- és rosszindulatú daganatainak differenciáldiagnózisában hasznosnak bizonyult mikroRNS-ek mellett, az egyre inkább a tumorkutatás figyelmébe kerülő cirkuláris RNS-ek is potenciálisan és jelentősen hozzájárulhatnak a mellékvesekéreg tumorok pre- és posztoperatív diagnózisának felállításához. Tanulmányok egész sora már leírta a mikroRNS-ek mellékvesekéreg daganatok differenciáldiagnosztikájában való alkalmazásának lehetőségét. A circRNS-eket számos szerv jó- és rosszindulatú daganatainak differenciáldiagnózisának potenciálisan hasznos kiegészítőjeként tartják számon, de kifejeződésüket mellékvesekéreg daganatokban eddig még nem vizsgálták.

Kiterjedt szakirodalmi elemzés alapján több mikroRNS is alkalmas lehet potenciálisan az ACC és az ACA elkülönítő kórisméjében magas szenzitivitási és specificitási értékei alapján. A különböző kutatócsoportok eredményei között azonban több különbség is van, és a mikroRNS-ek kombinációja, ill. mesterséges intelligencia használata segíthet klinikailag alkalmazható biomarkerek azonosításában.

A mikroRNS-ek mellett a nem kódoló RNS-ek közé tartozó cirkuláris RNS-ek vizsgálata képezte kutatásom másik fő irányát.

Doktori kutatásaim során célunk volt a mellékvesekéreg jó- és rosszindulatú daganatainak szöveti elkülönítésének segítése céljából:

1. Mesterséges intelligencia segítségével a már szakirodalomban leírt, RT-qPCR-rel kvantifikált mikroRNS-ek olyan új kombinációinak azonosítása, amelyek segítségével a mellékvesekéreg-daganatok szövetmintáinak jó- vagy rosszindulatúsága elkülönítésére alkalmas biomarkerek alapjául szolgálhatnak.
2. Cirkuláris RNS-ek kifejeződésének vizsgálata újgenerációs szekvenálással mellékvesekéreg daganatokból, majd a jó- és rosszindulatú daganatok között eltérő kifejeződést mutató cirkuláris RNS-ek azonosítása. Tudomásunk szerint a cirkuláris RNS-ek expressziós profilját mellékvesekéreg daganatokban eddig nem vizsgálták.

3. Módszerek

3.1 Minták, betegadatok

Kutatásom során összesen 73 formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintát vizsgáltam, ebből a mikroRNS kísérletekhez 31 ACC, 32 ACA és 10 normális mellékveseszövet (normal adrenal cortex, NAC) eloszlásban, míg 50 FFPE mintát 18 ACC, 16 ACA és 16 NAC eloszlásban a circRNS méréseim során. Míg a mikroRNS vizsgálatba összesen 52 nőtől és 21 férfitől került minta feldolgozásra, addig a circRNS vizsgálatokba 35 nő és 15 férfi mintáját vontunk be. A NAC minták teljes veseeltávolításon átesett páciensekből származtak (mikroRNS vizsgálatok: nő: 5; férfi: 5; átlagéletkor: 36,2 és 55,8 ebben a sorrendben és circRNS vizsgálatok: nő: 9; férfi: 7; átlagéletkor: 40,3 és 51,1 ebben a sorrendben). A NAC minták a kiválasztott mikroRNS-ek expressziójának a normális-, jóindulatú- és rosszindulatú mellékvesekéreg szövetekben kvantifikált különbségek megállapításának, illetve az ép mellékvesekéregre is kiterjedő circRNS profilozás céljából kerültek be a vizsgálatba. A szövettani minták a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetéből, illetve a Patológiai, Igazságügyi és Biztosítási Orvostani Intézetből származtak. Minden FFPE mintát mellékvese szakértő patológus ellenőrzött. Valamennyi eset szövettani diagnózisa a legfrissebb protokollok szerint történt. Az FFPE blokkok csak az érdeklődési területnek (region of interest, ROI) megfelelő részei kerültek izolálásra.

1. táblázat: A vizsgálataimba bevont ACC és ACA mintákhoz tartozó betegadatok és tumorjellemzők [149]. ACC: adrenocorticalis carcinoma, ACA: adrenocorticalis adenoma, N: nő, F: férfi, ENS@T: European Network for the Study of Adrenal Tumors, NF: nem funkcionáló, NA: nincs adat, DOC: deoxikortikoszteron, DHEAS: dehidroepiandroszteron-szulfát és életkor a tumor eltávolításakor.

	Tumor típus	Nem	Életkor	Tumor méret (mm)	Ki-67 (%)	ENSAT stádium	Hormonaktivitás
1	ACA	N	32	36	-	-	Kortizol
2	ACA	N	40	43	-	-	Kortizol
3	ACA	N	62	50	-	-	Kortizol
4	ACA	N	74	20	-	-	NF
5	ACA	N	51	25	-	-	Kortizol

6	ACA	N	71	15	-	-	NF
7	ACA	N	30	25	-	-	Kortizol
8	ACA	N	43	45	-	-	Kortizol
9	ACA	N	38	35	-	-	Kortizol
10	ACA	N	34	45	-	-	NF
11	ACC	N	39	65	NA	II	Kortizol
12	ACC	F	40	100	1-15	II	NF
13	ACC	N	19	150	10	III	DOC
14	ACC	F	48	200	2-5	III	NF
15	ACC	N	37	60	2-5	III	DOC, Kortizol, ösztradiol
16	ACC	F	58	75	30	III	Kortizol
17	ACC	N	73	65	30-40	II	NF
18	ACC	F	39	85	5-10	II	NF
19	ACC	N	53	62	5	II	NF
20	ACC	N	46	100	NA	III	Kortizol
21	ACA	N	63	25	-	-	NF
22	ACA	N	46	25	-	-	Kortizol
23	ACA	N	45	30	-	-	Kortizol
24	ACA	F	68	50	-	-	NF
25	ACA	N	64	38	-	-	Kortizol
26	ACA	N	39	25	-	-	Kortizol
27	ACA	N	32	35	-	-	Kortizol
28	ACA	F	72	40	-	-	NF
29	ACA	N	31	25	-	-	Kortizol
30	ACA	N	72	43	-	-	NF
31	ACA	N	78	45	-	-	DHEAS
32	ACA	N	45	30	-	-	Kortizol
33	ACA	N	39	35	-	-	NF
34	ACA	N	50	52	-	-	Kortizol
35	ACA	N	60	32	-	-	NF
36	ACA	N	49	25	-	-	Kortizol
37	ACA	N	34	25	-	-	NF
38	ACA	F	46	57	-	-	NF
39	ACA	F	50	30	-	-	NF
40	ACA	N	62	57	-	-	Kortizol
41	ACA	N	69	30	-	-	NF
42	ACA	F	71	18	-	-	Kortizol
43	ACC	N	47	140	20-25	II	NF
44	ACC	N	53	80	40-50	IV	Kortizol, androgén
45	ACC	N	70	120	20	III	NF
46	ACC	N	75	75	40-50	IV	Kortizol
47	ACC	N	71	100	25	IV	NF
48	ACC	N	46	200	43	IV	NF
49	ACC	F	33	190	NA	II	Kortizol, DHEAS

50	ACC	F	43	120	NA	IV	NF
51	ACC	F	56	65	20-40	II	NF
52	ACC	N	72	95	20-30	III	Kortizol
53	ACC	N	62	160	8	III	Kortizol
54	ACC	F	17	110	20-25	II	NF
55	ACC	N	49	40	NA	I	NF
56	ACC	N	61	80	20-30	III	Kortizol
57	ACC	N	61	100	NA	IV	NF
58	ACC	F	79	120	10	III	Kortizol, DHEAS
59	ACC	N	55	75	20-25	IV	Kortizol
60	ACC	F	48	61	130	I/IV	Kortizol
61	ACC	N	62	60	40-50	IV	Kortizol
62	ACC	N	55	55	25	IV	NF
63	ACC	F	48	NA	NA	IV	NF

Valamennyi kísérletet a vonatkozó irányelveknek és előírásoknak megfelelően végeztük, és az érintett betegek tájékozott beleegyezését is megkaptuk. A vizsgálatokat a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT-TUKEB) jóváhagyta (engedélyek száma: 24441-2/2016/EKU és 56720-2/2018/EKU).

3.2. mikroRNS kombinációk vizsgálata mesterséges intelligencia segítségével mellékvesekéreg adenomában és carcinomában

3.2.1. A jó- és rosszindulatú mellékvesetumorokban szignifikánsan eltérő expressziójú mikroRNS-ek szakirodalmi kutatása

Irodalomkutatást a PubMed adatbázisában (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) végeztem a következő keresőszavak használatával: adrenocortical karcinóma; adrenocortical cancer; adrenal cancer; adrenal tumor; and microRNA. Kizárólag eredeti cikkek kerültek beválogatásra. A legtöbb vizsgált mikroRNS szignifikánsan differenciált expressziót mutatott több tanulmányban is. 16 szignifikánsan differenciált expressziót mutató mikroRNS került beválasztásra (**2. táblázat**).

2. táblázat: A szakirodalmi adatok alapján kiválasztott, felül- és alulexpresszált mikroRNS-ek [149].

Expresszió ACC-ben	mikroRNS	Referencia
Felülexpresszált	<i>hsa-miR-7, hsa-miR-9, hsa-miR-21, hsa-miR-210, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-508</i>	[22,109,149,158–172]
Alulexpresszált	<i>hsa-miR-195, hsa-miR-205, hsa-miR-214, hsa-miR-335, hsa-miR-375, hsa-miR-431, hsa-miR-497, hsa-miR-511</i>	[22,116,117,149,158–161,163,165,173–178]

3.2.2. Mintafeldolgozás és mikroRNS izolálás szövetből

A teljes RNS izoláláshoz a RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (katalógusszám: AM1975, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kitet alkalmaztam a gyártó protokollja szerint. 1 μL 0,002 fmol/ μL koncentrációjú *syn-cel-miR-39-3p*-t alkalmaztam, mint az izolálás minőségének ellenőrzésére szolgáló „spike-in” kontroll a miRCURY LNA RNA Spike-in Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Németország, katalógusszám: 339390) protokollja szerint, a nukleinsav izolálás lépése előtt hozzáadva. A kiindulási FFPE metszetek vastagsága 4x20 μm volt. A deparaffinálshoz a gyártó protokollja szerint xilolt használtunk. Az elúciós végvolumen 60 μL volt. A végkoncentrációt tekintve összesen 10 nanogramm teljes RNS-re volt szükség 15 mikroliterben a reverz transzkripció elvégzéséhez. A teljes RNS koncentrációmérések NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és Qubit 4 Fluorometer with Qubit™ hsRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével az izolálás után lettek végrehajtvva. További felhasználásig a teljes RNS-t -80°C -on tároltam.

3.2.3. Szöveti mikroRNS mérés RT-qPCR módszerrel

A mikroRNS-ek szöveti expressziójának méréséhez kétlépcsős Real Time kvantitatív Polimeráz Láncreakciót (RT-qPCR) használtam. Valamennyi mintát külön-külön reakcióban mértem le az egyes mikroRNS célpontokra nézve. Tíz nanogrammm teljes RNS izolátumot használtam fel az egyedi reverz transzkripció (RT) reakciókhoz.

Elsőként, a TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit a hozzá tartozó egyedi TaqMan MiRNA Assay primer mixekkel (katalógusszám: 4427975, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kerültek alkalmazásra az RT reakció végrehajtásához a teljes RNS izolátumon. Lemértem a *hsa-miR-7* (ID: 000386), *hsa-miR-9* (ID:000583), *hsa-miR-21* (ID: 000397), *hsa-miR-195* (ID: 000494), *hsa-miR-205* (ID: 000509), *hsa-miR-210* (ID: 000512), *hsa-miR-214* (ID: 002306), *hsa-miR-335* (ID: 000546), *hsa-miR-375* (ID:000564), *hsa-miR-431* (ID: 001979), *hsa-miR-483-3p* (ID: 002339), *hsa-miR-483-5p* (ID: 002338), *hsa-miR-497* (ID: 001043), *hsa-miR-503* (ID: 001048), *hsa-miR-508* (ID: 001052), és *hsa-miR-511* (ID: 001111) mikroRNS-ek szöveti expresszióját az intrinsic *RNU48* (ID: 001006) és az extrinsic *syn-cel-miR-39* (ID: 000200) kontroll segítségével.

A mennyiségi meghatározáshoz TaqMan Fast Advanced Master Mix-et használtam (catalog number: 4444963, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) az egyedi mikroRNS-eknek megfelelő próba mixek segítségével a gyártó protokollja szerint a Quantstudio 7 Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) gépen. A negatív kontroll reakciókat cDNS templát nélkül állítottam, illetve az összes reakciót három technikai párhuzamossal állítottam össze. A mérésekhez 0,67 μ L hígítatlan cDNS-t használtam.

A mikroRNS panel expressziójának felfedező kohorszon való elemzése után a legjobban teljesítő kombinációkat elemeztem szintén RT-qPCR segítségével egy független validációs kohorszon. Legjobban teljesítő kombinációknak tekintettük a 90% feletti osztályozóképeségű mikroRNS kombinációkat. A 90%-os osztályozóképeségű mikroRNS kombinációkba azon modellek kerültek, amelyek az 1000 iteráció során legalább 50%-ban helyesnek értékelték a minta biológiai viselkedését. A legjobban teljesítő mikroRNS-ek tovább szelektált validációs csoportja a következőképpen alakult:

hsa-miR-9 (ID: 000583), *hsa-miR-195* (ID: 000494), *hsa-miR-210* (ID: 000512), *hsa-miR-375* (ID: 000564), *hsa-miR-483-3p* (ID: 002339), *hsa-miR-483-5p* (ID:002338), *hsa-miR-497* (ID: 001043), *hsa-miR-503* (ID: 001048), and *hsa-miR-508* (ID: 001052).

3.2.4. Biostatistikai elemzés

3.2.4.1. A mikroRNS panelek létrehozása

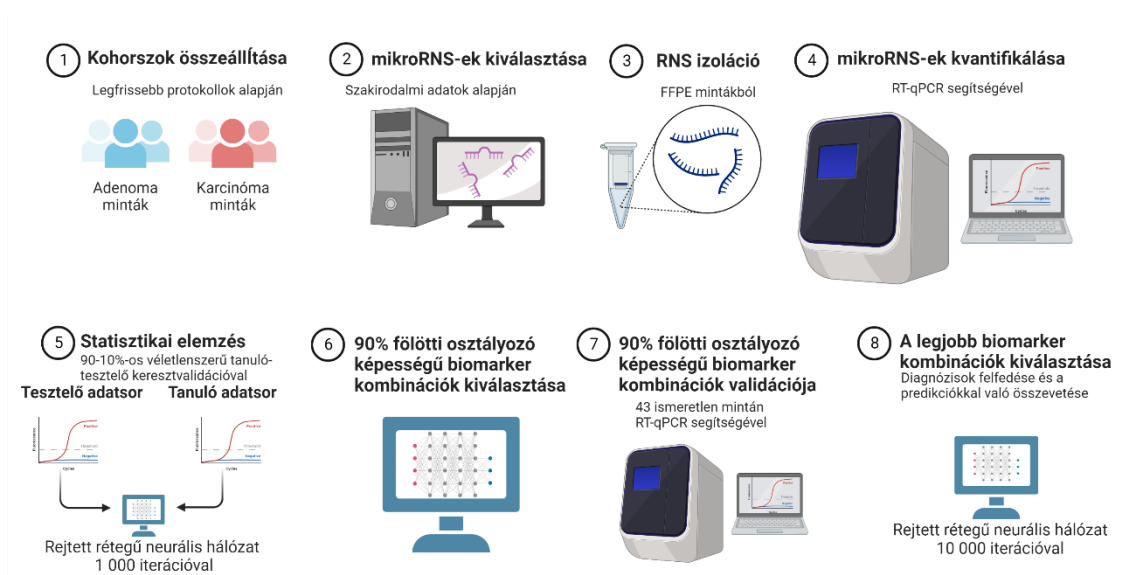
A statisztikai analízist a 4.1.1 verziójú R for Windows (R Foundation for Statistical Computing, 2021, Bécs, Ausztria) programmal végeztük. A mikroRNS-ek normalizálása $\Delta\Delta\text{Ct}$ módszerrel történt, mely folyamat során az intrinsic „háztartási gén” (*RNU48*) és az extrinsic *syn-cel-miR-39* geometriai átlaga szolgált kontrollként (R csomag NormqPCR). A Ct értéket 40 ciklus alatt nem mutató, alulexpresszált mikroRNS-eket kizártuk. Az ACC vs. ACA csoportbesorolásban kiemelkedő szerepet játszó mikroRNS-ek sorrendje a random forest módszerrel határoztuk meg az „átlagos pontosságcsökkenés” (R csomag randomForest) fontossági mérőszámmal, amelyet a szakirodalomban már leírt összefüggések megerősítésére használtunk [179]. A minták automatikus ACC vagy ACA csoportokba sorolásának lehetőségét gépi tanuláson alapuló módszerekkel teszteltük (R packages nnet and caret) [180,181]. A lehetséges mikroRNS-kombinációk osztályozási hatékonyságát neurális hálózat alapú, 90-10%-os véletlenszerű tanuló-tesztelő keresztvalidációval vizsgáltuk, amely 10-10-10 ismert ACC, ACA és NAC mintából állt. Rejtett rétegű neurális hálózaton alapuló statisztikai modellt készítettünk, amely véletlenszerűen kiválasztott 9-9-9 mintát csoportonként a 10-10-10 szövettani mintából (tanuló adatsor). A modell osztályozási hatékonyságát a fennmaradó 1-1-1 mintán teszteltük (tesztelő adatsor). Ennek a lépésnek 1000 alkalommal történő megismétlésével meg tudtuk határozni azokat a mikroRNS kombinációkat, amelyek kiemelkedően magas specificitás és szenzitivitás értékekkel rendelkeztek a csoportbesorolást illetően. Az elemzést is elvégeztük a 30 mintán mindhárom csoportból, illetve a 20 jó- és rosszindulatú mellékvese daganat mintán önmagában is. A huszonnégy modell közül a legalább 90%-os osztályozási képességgel rendelkező kombinációkat választottuk ki a gépi tanuláson alapuló osztályozás validálására (**3. táblázat**).

3. táblázat: A validációs kohorszban használt 24 mikroRNS kombinációs modellek összetétele [149].

Kombinációs modell száma	mikroRNS kombináció
1	<i>hsa-miR-9 + hsa-miR-375</i>
2	<i>hsa-miR-9 + hsa-miR-503</i>
3	<i>hsa-miR-375 + hsa-miR-503</i>
4	<i>hsa-miR-210 + hsa-miR-503</i>
5	<i>hsa-miR-375 + hsa-miR-497</i>
6	<i>hsa-miR-483-3p + hsa-miR-503</i>
7	<i>hsa-miR-503 + hsa-miR-508</i>
8	<i>hsa-miR-195 + hsa-miR-503 + hsa-miR-508</i>
9	<i>hsa-miR-195 + hsa-miR-210 + hsa-miR-503</i>
10	<i>hsa-miR-9 + hsa-miR-195 + hsa-miR-503</i>
11	<i>hsa-miR-9 + hsa-miR-210 + hsa-miR-503</i>
12	<i>hsa-miR-9 + hsa-miR-375 + hsa-miR-503</i>
13	<i>hsa-miR-9 + hsa-miR-483-3p + hsa-miR-503</i>
14	<i>hsa-miR-9 + hsa-miR-497 + hsa-miR-503</i>
15	<i>hsa-miR-195 + hsa-miR-375 + hsa-miR-497</i>
16	<i>hsa-miR-210 + hsa-miR-375 + hsa-miR-503</i>
17	<i>hsa-miR-210 + hsa-miR-483-5p + hsa-miR-503</i>
18	<i>hsa-miR-375 + hsa-miR-503 + hsa-miR-508</i>
19	<i>hsa-miR-375 + hsa-miR-483-3p + hsa-miR-503</i>
20	<i>hsa-miR-9 + hsa-miR-195 + hsa-miR-375 + hsa-miR-503</i>
21	<i>hsa-miR-9 + hsa-miR-210 + hsa-miR-483-5p + hsa-miR-503</i>
22	<i>hsa-miR-210 + hsa-miR-375 + hsa-miR-503 + hsa-miR-508</i>
23	<i>hsa-miR-375 + hsa-miR-483-5p + hsa-miR-503 + hsa-miR-508</i>
24	<i>hsa-miR-375 + hsa-miR-497 + hsa-miR-503 + hsa-miR-508</i>

3.2.4.2. A mikroRNS panelek validációja

A validálás során egy független, ACA és ACC mintákat tartalmazó kohorszot használtuk és a 43 ismeretlen mintát külön-külön osztályoztuk, egyenként 10 000 iterációval. A kombinációk végső becsült csoportbesorolását a leggyakoribb (>50%) értékek kiválasztásával határoztuk meg a 10 000 becslésből valamennyi mintán (**4. ábra**).



4. ábra: Áttekintő folyamatábra a mikroRNS kutatáshoz (saját ábra). A 10-10-10 adenoma, karcinóma és normál mintákon RT-qPCR módszerrel kvantifikált, szakirodalmi adatok alapján kiválasztott mikroRNS-eket rejtett rétegű neurális hálózat segítségével kombinációkba rendeztük. A 90% fölötti osztályozóképességgel rendelkező kombinációkat ismét RT-qPCR-rel kvantifikáltuk, ezúttal 43 ismeretlen mintán és rejtett rétegű neurális hálózat segítségével elvégeztük predikcióinkat. A legjobban teljesítő kombinációkat a predikciók és a diagnózisok felfedése után kaptuk meg.

Az egyes modellek érzékenységét, specificitását, pozitív prediktív értékét és negatív prediktív értékét – a minták jó- vagy rosszindulatú biológiai viselkedésének felfedése után – a modellek becsléseiből származó és a tényleges szövettani diagnózisból származó adatok összehasonlításával határoztuk meg. Technikai lépésként az ACA csoportot jelöltük ki, mint „kontroll” és az ACC csoportot, mint „beteg” csoport. A két osztályozás közötti különbségek alapján meghatároztuk a helyes eredmények számát (valódi pozitívok és negatívok), hamis pozitív (valójában jóindulatú tumor a becslült rosszindulatú tumor helyett) és hamis negatív (valójában rosszindulatú tumor a becslült jóindulatú tumor helyett) eredményeket.

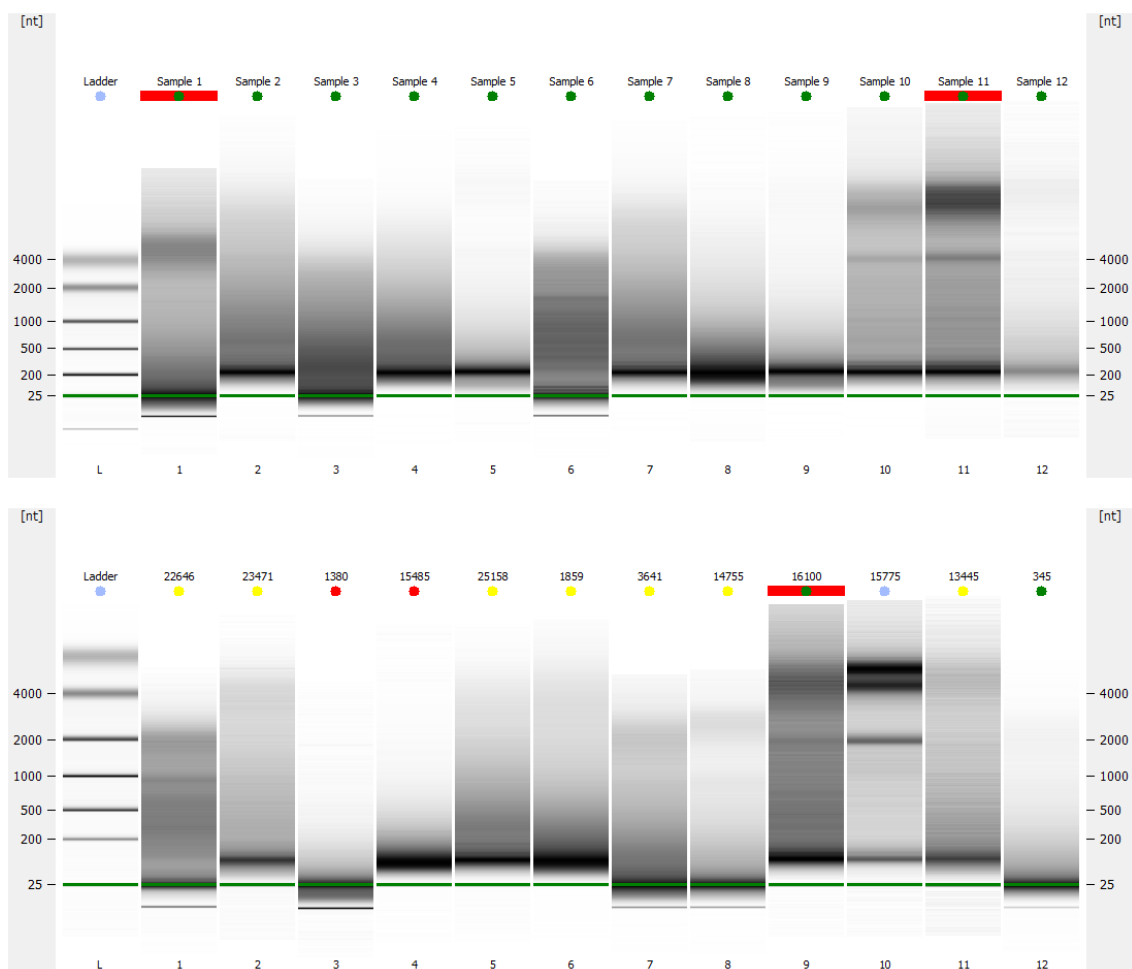
Az ACA csoportba történő helyes besorolások százalékos arányát és a helyes besorolást ROC analízissel hasonlítottuk össze és ábrázoltuk (R csomag pROC) [182]. További, epidemiológiai mérőszámokat (pl. görbe alatti terület) a valódi csoportbesorolások és a becslült csoportbesorolások százalékos arányaiból határoztuk meg ROC elemzés segítségével.

3.3. Cirkuláris RNS profilozás mellékvesekéreg adenomában, carcinomában és ép mellékveseszövetben

3.3.1. Mintafeldolgozás és cirkuláris RNS dúsítás szövetből

3.3.1.1. RNS izolálás és mintafeldolgozás

A teljes RNS izolálásához ezúttal is a RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (katalógusszám: AM1975, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kitet alkalmaztam a gyártó protokollja szerint. A kiindulási FFPE metszetek vastagsága 4x20 μ m volt. A deparaffinálshoz a gyártó protokollja szerint xilolt használtunk. Az izolálás minőségének ellenőrzésére 1 μ L 0,002 fmol/ μ L koncentrációjú *syn-cel-miR-39-3p* „spike-in” kontrollt a miRCURY LNA RNA Spike-in Kitből (Qiagen GmbH, Hilden, Németország, katalógusszám: 339390) alkalmaztam a gyártó protokollja szerint, amit a nukleinsav izolálás lépése előtt adtam hozzá. Az elúciós végvolumen 60 μ L volt. Az izoláció utáni teljes RNS koncentrációmérések NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) és Qubit 4 Fluorometer with QubitTM hsRNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével hajtottam végre. A circRNS vizsgálatokhoz az útmutatás szerint összesen legalább 2 μ g teljes RNS-re volt szükség, ami a maximálisan 15 mikroliteres reakcióvolumen tekintve 133 ng/ μ l végkoncentráció elérését tette szükségessé valamennyi izolátum esetében. A teljes RNS -80° C-on került tárolásra. Az RNS minőség meghatározására Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) műszert használtam az RNA 6000 Nano és Pico kitek segítségével az újgenerációs szekvenálás (NGS) előtt **5. ábra**.



5. ábra: A cirkuláris RNS-ek Agilent 2100 Bioanalyzer készülékkel készült reprezentatív mikrokapilláris elektroforézis képei (saját ábra). Bal oldalon a fragmentumok elkülönítését segítő létra található mellette jobbra a 12-12 NGS könyvtárhoz felhasznált minta. nt: nukleotid, L: ladder (létra).

3.3.1.2. A cirkuláris RNS laboratóriumi dúsítása

Az izolációs lépés után a teljes RNS-t tartalmazó oldat a cirkuláris RNS-eken kívül további lineáris RNS molekulákat is tartalmazott (pl. rRNS, mRNS, tRNS, mikroRNS). A lineáris RNS-ek szelektív degradációját 1 μ l RNase R (20 U/ μ l; Lucigen, Epicentre) enzim segítségével végeztük 2 μ g RNS-t tartalmazó 20 μ l oldatból 2 μ l 10X RNase R reaction buffer, 1 μ l RiboLock (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) hozzáadásával 30 perces inkubálással, 37 °C-on. A lineáris RNS emésztés után az oldat

tisztítása következett a miRNeasy Kit (QIAGEN) segítségével a gyártó protokollja szerint, 40 µl nukleáz mentes vízben eluálva a purifikált terméket.

Az RNáz R a cirkuláris RNS-ek mellett nem képes emészteni például a nem poliadenilált vagy RNáz R rezisztens 3' véggel rendelkező RNS-eket (pl. snoRNS). A nem-cirkuláris RNS-ek depléciójához Poly(A) Tailing Kit-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtam a további cirkuláris RNS dúsítás végett. A 40 µL poliadenilációs mix 20 µL RNase R kezelt RNS-en kívül még 4-4-4 µL 10X poly(A) polimeráz puffert, 25 mM MnCl₂- és 10 mM ATP oldatot, illetve 1-1 µL E-PAP poly(A) polimerázt és RiboLock RNáz inhibitorot tartalmazott. Az inkubációt ezúttal is 30 percig 37°C-on végeztem.

A poliadenilációs reakció ideje alatt 10 µL szuszpendált oligo-dT mágneses gyöngyöt mértem össze 100 µL 1X pufferrel, majd inkubáltam mágneses állványon 1 percig a gyártó reagensivel és utasításai szerint. A felülúszó eltávolítása után megismételtem kétszer e folyamatot a gyöngyök teljes aktivációjának érdekében. Ezután, az aktivált gyöngyökhöz hozzáadtam a 40 µL 2X puffert és a 40 µL poliadenilációs elegyet. Az elegyet 5 percig 75°C-on, majd 20 percig 25°C-on inkubáltam annak érdekében, hogy létrejöhessenek az oligo-dT gyöngyök és a poli-(A)-farokkal rendelkező nem-cirkuláris RNS-ek közötti báziskomplementaritás elvén alapuló hidrogén-híd kötések. Ezt követően 1 percig a mágneses állványra helyeztem, majd a felülúszót összegyűjtöttem. Ezúttal is az oldat tisztítása következett a miRNeasy Kit (QIAGEN) segítségével 40 µl nukleáz mentes vízben eluálva a purifikált terméket.

3.3.2. Szöveti cirkuláris RNS expressziós profilozás újgenerációs szekvenálással

3.3.2.1. Újgenerációs szekvenálás

A cDNS könyvtárat a tisztított cirkuláris RNS oldatokból készítettem el a NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit for Illumina E7770 (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) segítségével a gyártói utasítások szerint. A könyvtár kvantifikációját a NebNext Library Quantification Kit for Illumina kittel végeztem el. A fragmentációmérést High Sensitivity dsDNA chippel végeztem az Agilent 2100 Bionalyzer készüléken (Agilent Technologies,

Santa Clara, CA, USA). Az újgenerációs szekvenálást a MiSeq Reagent v3 600 kittel hajtottuk végre Illumina MiSeq készüléken (Illumina, San Diego, CA).

3.3.2.2. A cirkuláris RNS-ek bioinformatikai elemzése

Az adapter és a minőségi vágás ($Q > 30$) után a leolvasott értékeket a hg38 referenciagenomra illesztettük a Burrow-Wheeler Aligner (BWA-MEM) segítségével [183]. Három különböző cirkuláris RNS detektáló programot teszteltünk: Autocirc, CIRI2 és CircExplorer2 [184–186]. A teljesítmény alapján (detektált cirkuláris RNS-ek száma, ismert cirRNS-ek száma, fúziós leolvasások újraillesztése) CircExplorer2 eredményeit választottuk a további elemzésekhez. Az annotáláshoz és a cirkuláris RNS-ek teljes szekvenciájának feltérképezéséhez a CircRNAprofiler programot használtuk [187]. A differenciált expressziót mutató cirkuláris RNS-ek a limma-trend algoritmus szerint TNM normalizációs módszerrel lettek végrehajtva. A P-érték korrekciót Benjamini-Hochberg FDR módszerrel számítottuk ki. A különböző programok és biológiai csoportok értékeinek közös metszeteinek megjelenítéséhez a VennDiagramm R csomagot használtuk [188].

3.3.3. A szignifikánsan eltérő expressziójú cirkuláris RNS-ek validálása RT-qPCR módszerrel

Az NGS-eredmények RT-qPCR validációját egy különálló mintasorozaton végeztem el. Első lépésben a lineáris RNS-ek 1 μ L RNase R-rel (20 U/ μ L; Lucigen, Epicentre) való szelektív degradációját hajtottam végre 2 μ g RNS-t tartalmazó 20 μ L végtérfogatban 2 μ L 10X RNase R puffert alkalmazva, 1 μ L RiboLock (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) RNáz inhibitorral 37°C-on 30 percig. Ismét az oldat tisztítása követte a folyamatot a miRNeasy Kit (QIAGEN) segítségével 40 μ L nukleáz mentes vízben eluálva az emésztésen átesett terméket.

Ezután a maradék RNS reverz transzkripcióját végeztem el a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-tel (Catalog Number: K1652 Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, USA) a gyártó utasításai szerint random primereket alkalmazva (Roche, Basel, CH).

TaqMan miRNA divergens primer assay-eket alkalmaztunk (Catalog Number: 230744765) a top 5 szignifikánsan differenciált expressziót mutató cirkuláris RNS (PHC3:-: chr3: 170145422:170149244; FCGBP:-:chr19: 39877662:39893527; TIMMDC1:+:chr3: 119503531: 119504021; KDM4C:+:chr9: 6880011:6893232; MAN1A2:+:chr1: 117402185:117420649) RT-qPCR validációjához.

Az izolálás kontrolljaként. extrinsic *syn-cel-miR-39* (ID: 000200) spike-in kontrollt alkalmaztunk A kvantitatív valós idejű PCR-t a TaqMan Fast Advanced Master Mix (Catalog Number: 4444557; Thermo Fisher Scientific) használatával végeztem Quantstudio 7 Flex Real-Time PCR készülékkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a gyártó utasításai szerint. A mintákat minden esetben három technikai párhuzamosban mértem össze. A negatív kontroll reakciók nem tartalmaztak cDNS templátot. A pozitív kontroll reakciók genomiális DNS-t és 100x hígított NGS könyvtár cDNS-t tartalmazott.

3.3.4. Biostatistikai elemzés

Az adatok kiértékeléséhez a ΔCt módszert használtam (a delta Ct érték egyenlő a cél RNS Ct-jével mínusz az extrinsic kontroll RNS Ct-je) a Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA) segítségével. A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 7 segítségével végeztem.

3.3.5. A *circPHC3* lehetséges mikroRNS interakcióinak vizsgálata

A clipSearch segítségével mikroRNS célpontokat kerestünk a PHC3 circRNS szekvencia alapján[189]. A *mature_high_conf_v22_1*.fa mikroRNS szekvenciákat használtuk célpontként. Az eredményeket szöveges fájlként összesítettük. Az eredmények további értékeléséhez és szűréséhez kinyertük a céllista táblázatot a kapcsolódó paraméterekkel.

Három lehetséges mikroRNS-t választottunk ki, amelyekről irodalmi adatok alapján már leírták a mellékvesekéreg daganatokkal kapcsolatos relevanciájukat. Kimutatták, hogy a

hsa-let-7c, valamint a *hsa-miR-214* és a *hsa-miR-195* szignifikánsan alulexpresszált az ACC-kben az ACA-khoz képest.

3.3.5.1. A kiválasztott potenciális cél mikroRNS-ek validációja RT-qPCR módszerrel

Ugyanazt a validációs kohorszt használtuk a mikroRNS expressziós mérésekhez, mint a cirkuláris RNS validációjához.

Ugyancsak a kétlépcsős RT-qPCR módszert alkalmaztam. Valamennyi minta külön reakcióban került feldolgozásra. 10 nanogramm teljes RNS-t használtam az egyéni RT reakciókhoz.

Elsőként, a TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit a hozzá tartozó egyedi TaqMan MiRNA Assay primer mixekkel (katalógusszám: 4427975, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) kerültek alkalmazásra az RT reakció végrehajtásához a teljes RNS izolátumon. Lemértem a *hsa-miR-195* (ID: 000494), *hsa-let-7c-3p* (ID: 002479), *hsa-miR-214* (ID: 002306) expresszióját az extrinsic *syn-cel-miR-39* (ID: 000200) kontroll segítségével.

A RT-qPCR méréseket a TaqMan Fast Advanced Master Mix (Catalog Number: 4444557; Thermo Fisher Scientific) használatával végeztem Quantstudio 7 Flex Real-Time PCR készülékkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a gyártó utasításai szerint. A mintákat valamennyi esetben három technikai párhuzamosban mértem össze. A negatív kontroll nem tartalmazott cDNS templátot. 0,67 μ L hígítatlan cDNS szolgált templátként. Az adatok kiértékeléséhez Δ Ct módszert alkalmaztam. A statisztikai analízist GraphPad Prism 7-tel végeztem.

4. Eredmények

4.1. mikroRNS kombinációk vizsgálata mesterséges intelligencia segítségével mellékvesekéreg adenomában és carcinomában

4.1.1. Szöveti mikroRNS mérés RT-qPCR módszerrel

4.1.1.1. A legjobban teljesítő mikroRNS panelek összeállítása

RT-qPCR méréseket végeztem a felfedező kohorsz 10-10-10 ACA-ACC-NAC FFPE mintáin. A legjobban teljesítő mikroRNS kombinációkat (statisztikai modelleket) neurális hálózat alapú, 90-10%-os véletlenszerű tanuló-tesztelő keresztvalidáció módszerével választottuk ki (**2. táblázat**). Huszonnégy (**3. táblázat**), legalább 90% osztályozó képességgel rendelkező statisztikai modellt választottunk ki további validációra. A huszonnégy modell a következő mikroRNS-eket tartalmazta: *hsa-miR-9*, *hsa-miR-195*, *hsa-miR-210*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-483-3p*, *hsa-miR-483-5p*, *hsa-miR-497*, *hsa-miR-503* és *hsa-miR-508*. A *hsa-miR-503*, *hsa-miR-483_3p*, *hsa-miR-195*, *hsa-miR-375* és *hsa-miR-483_5p* volt a legjobb 5 mikroRNS, amely a leghelyesebben csoportosította a 30 mintát a megfelelő csoportokba a random forest algoritmus segítségével.

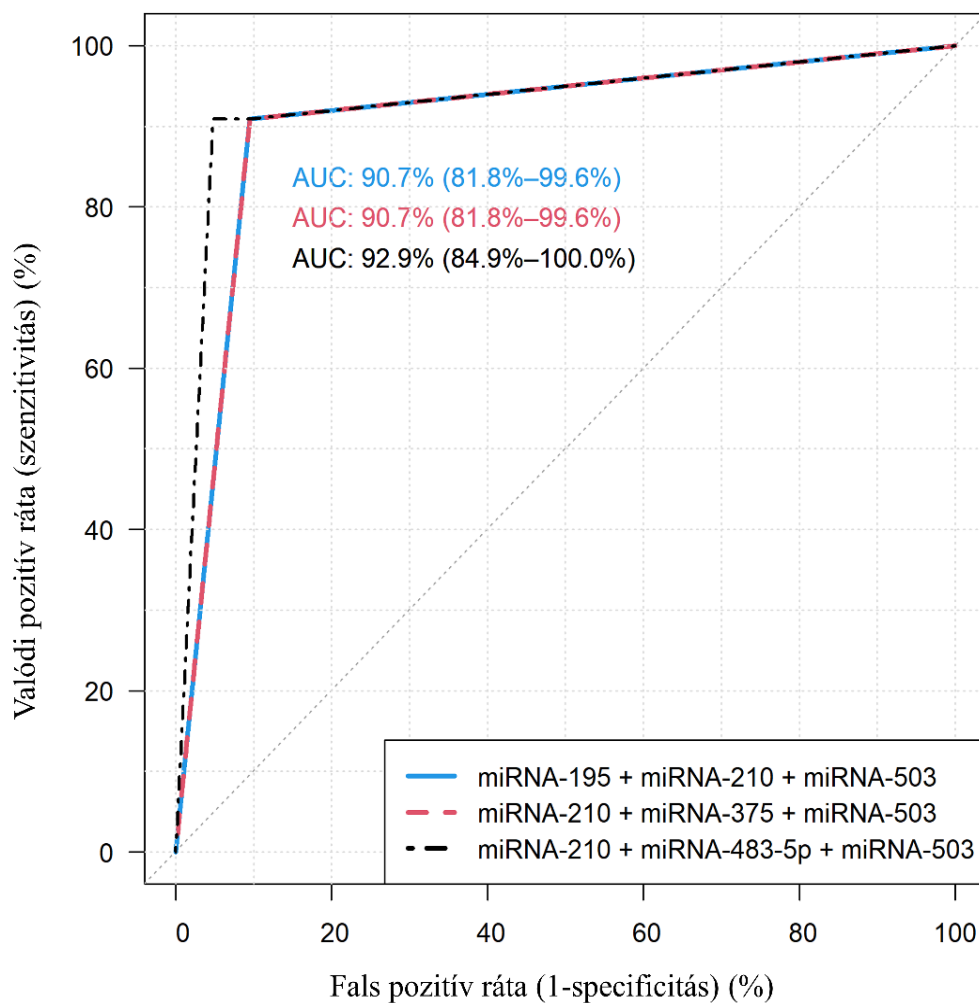
4.1.1.2. A mikroRNS panelek validációja

A felfedező kohorsztól független 43 FFPE mintát (21 ACA és 22 ACC) mértem le a validációs kohorszban RT-qPCR segítségével, hogy megállapíthassuk a kiválasztott mikroRNS kombinációk hatékonyságát. A **4. táblázat** bemutatja a 24 modell szenzitivitási, specificitási, AUC, pozitív- és negatív prediktív értékeit. E modellek között 3 mutatott 90% fölötti szenzitivitási és specificitási értékeket. A *hsa-miR-195 + hsa-miR-210 + hsa-miR-503*, a *hsa-miR-210 + hsa-miR-375 + hsa-miR-503* és a *hsa-miR-210 + hsa-miR-483-5p + hsa-miR-503* kombinációs modell (**6. ábra**). Az egyedi mikroRNS-ek esetében mért értékek az **5. táblázatban** szereplnek. A kombináción alapuló előrejelzések diagnosztikus teljesítménye egyértelműen felülmúlja az egyedi mikroRNS-ek diagnosztikus teljesítményét.

4. táblázat: A validációs kohorszban használt 24 kombinációs modell szenzitivitási-, specificitási-, görbe alatti terület-, pozitív prediktív és negatív prediktív értékei [149].

Félkövérrrel: a 3 legjobban teljesítő modell, AUC: area under curve, görbe alatti terület.

Modell száma	Szenzitivitás	Specificitás	Area Under Curve (AUC)	Pozitív prediktív érték	Negatív prediktív érték
1	72,73%	42,86%	56,49%	57,14%	60,00%
2	72,73%	85,71%	81,17%	84,21%	75,00%
3	90,91%	85,71%	90,04%	86,96%	90,00%
4	86,36%	90,48%	88,42%	90,48%	86,36%
5	86,36%	66,67%	76,52%	73,08%	82,35%
6	72,73%	95,24%	86,15%	94,12%	76,92%
7	81,82%	90,48%	85,93%	90,00%	82,61%
8	86,36%	85,71%	87,34%	86,36%	85,71%
9	90,91%	90,48%	90,69%	90,91%	90,48%
10	68,18%	85,71%	78,90%	83,33%	72,00%
11	86,36%	85,71%	88,10%	86,36%	85,71%
12	86,36%	80,95%	83,66%	82,61%	85,00%
13	68,18%	90,48%	82,47%	88,24%	73,08%
14	77,27%	85,71%	80,84%	85,00%	78,26%
15	86,36%	66,67%	76,52%	73,08%	82,35%
16	90,91%	90,48%	90,69%	90,91%	90,48%
17	90,91%	95,24%	92,86%	95,24%	90,91%
18	90,91%	85,71%	90,04%	86,96%	90,00%
19	77,27%	90,48%	85,61%	89,47%	79,17%
20	86,36%	80,95%	85,50%	82,61%	85,00%
21	86,36%	80,95%	85,71%	82,61%	85,00%
22	90,91%	85,71%	90,04%	86,96%	90,00%
23	90,91%	85,71%	88,31%	86,96%	90,00%
24	90,91%	85,71%	89,39%	86,96%	90,00%



6. ábra: A három legjobban teljesítő mikroRNS-kombináció ROC görbéi AUC (area under curve, görbe alatti terület) értékekkel [149].

5. táblázat: A 24 miRNS kombinációs modellben szereplő mikroRNS-ek egyéni diagnosztikai teljesítménye (szenzitivitási-, specificitási-, görbe alatti terület-, pozitív prediktív és negatív prediktív értékei) [149].

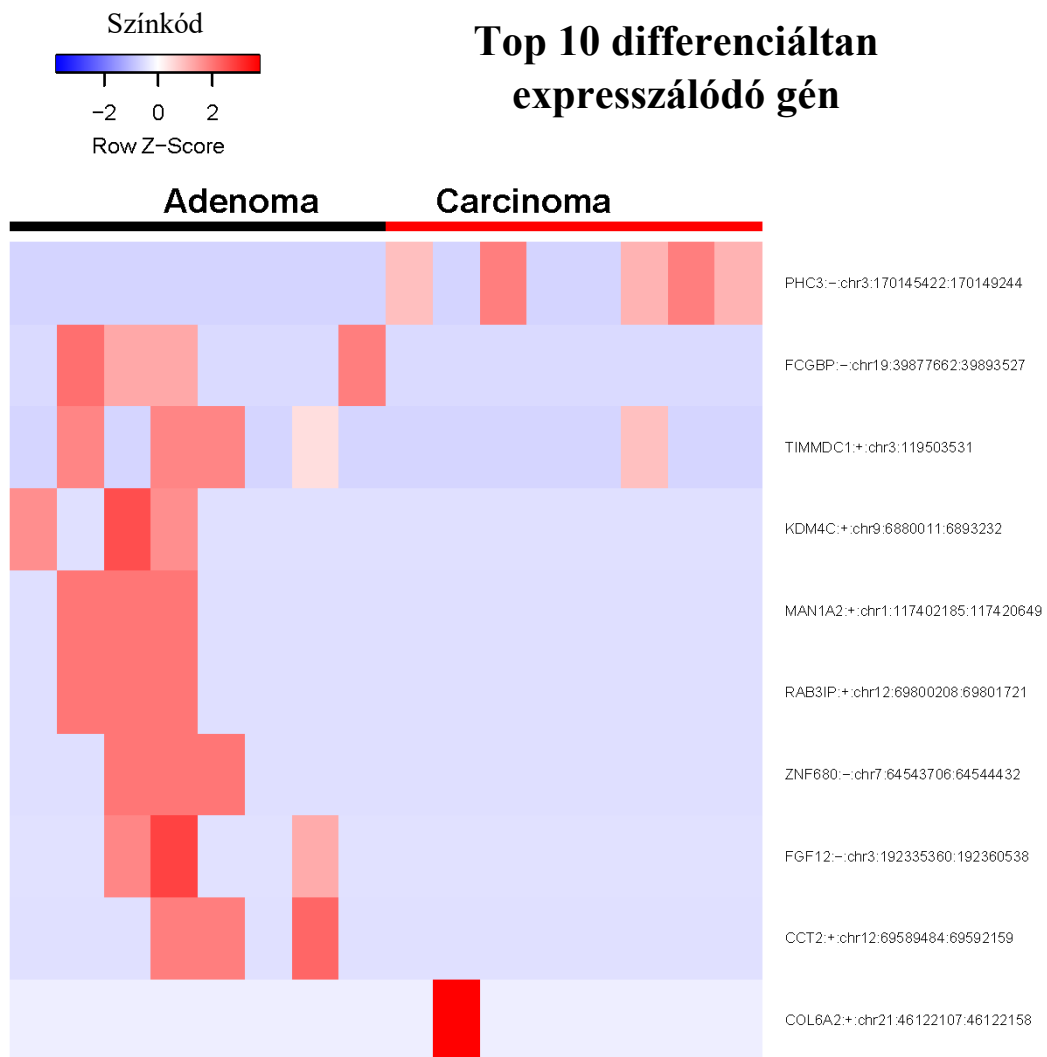
mikroRNS	Szenzitivitás	Specificitás	Area Under Curve (AUC)	Pozitív prediktív érték	Negatív prediktív érték
<i>hsa-miR-9</i>	54,55%	61,90%	59,52%	60,00%	56,52%
<i>hsa-miR-195</i>	86,36%	71,43%	78,90%	76,00%	83,33%
<i>hsa-miR-210</i>	68,18%	80,95%	76,41%	78,95%	70,83%
<i>hsa-miR-375</i>	81,82%	23,81%	53,68%	52,94%	55,56%
<i>hsa-miR-483-3p</i>	54,55%	90,48%	74,57%	85,71%	65,52%
<i>hsa-miR-483-5p</i>	81,82%	90,48%	86,15%	90,00%	82,61%

<i>hsa-miR-497</i>	86,36%	80,95%	83,66%	82,61%	85,00%
<i>hsa-miR-503</i>	81,82%	90,48%	86,15%	90,00%	82,61%
<i>hsa-miR-508</i>	59,09%	52,38%	58,33%	56,52%	55,00%

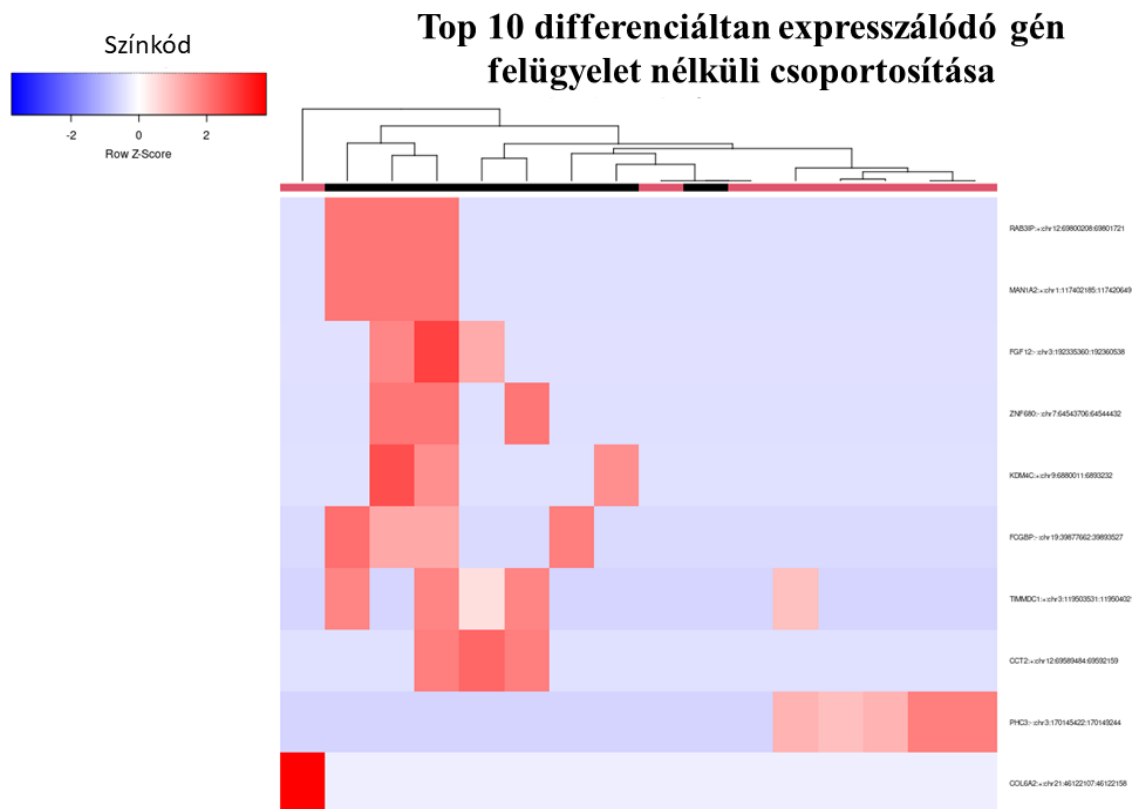
4.2. Cirkuláris RNS profilozás mellékvesekéreg adenomában, carcinomában és ép mellékveseszövetben

4.2.1. Szöveti cirkuláris RNS expressziós profilozás újgenerációs szekvenálással

A 8 ACC, 8 ACA és 8 NAC mintából álló felfedező kohorszban NGS platformot használtunk a differenciáltan expresszált cirkuláris RNS-ek azonosítására. Összesen 6532 már ismert és *de novo* cirkuláris RNS-t találtunk a három használt kimutatási eszközzel, és ezek közül 445 circRNS-t találtunk konzisztensen mindhárom eszközzel. 3912 a CircAtlas szerint már katalogizált cirkuláris RNS-t találtunk. A **7. ábra** és **8. ábra** egy-egy hőterkép (heatmap) mutat be, amelyek a cirkuláris RNS-ek expressziós szintjeinek különbségét mutatják be az ACC vs. ACA minták között. A Polihomeotikus-szerű protein 3 (polyhomeotic-like protein 3, PHC3) cirkuláris RNS-t 1,0-nél nagyobb Log2 Fold Change jellemezte.



7. ábra: Hőtérkép, amely a circRNS expressziós szintek különbségét mutatja az ACC vs. ACA minták között (saját ábra). Piros színárnyalattal jeleztük a felülexpressziót. Fentről lefele az ordinátatengelyen található a legdifferenciáltabban expresszáló circRNS gének. A legfelső 5 gén terméke került kiválasztásra validációhoz.

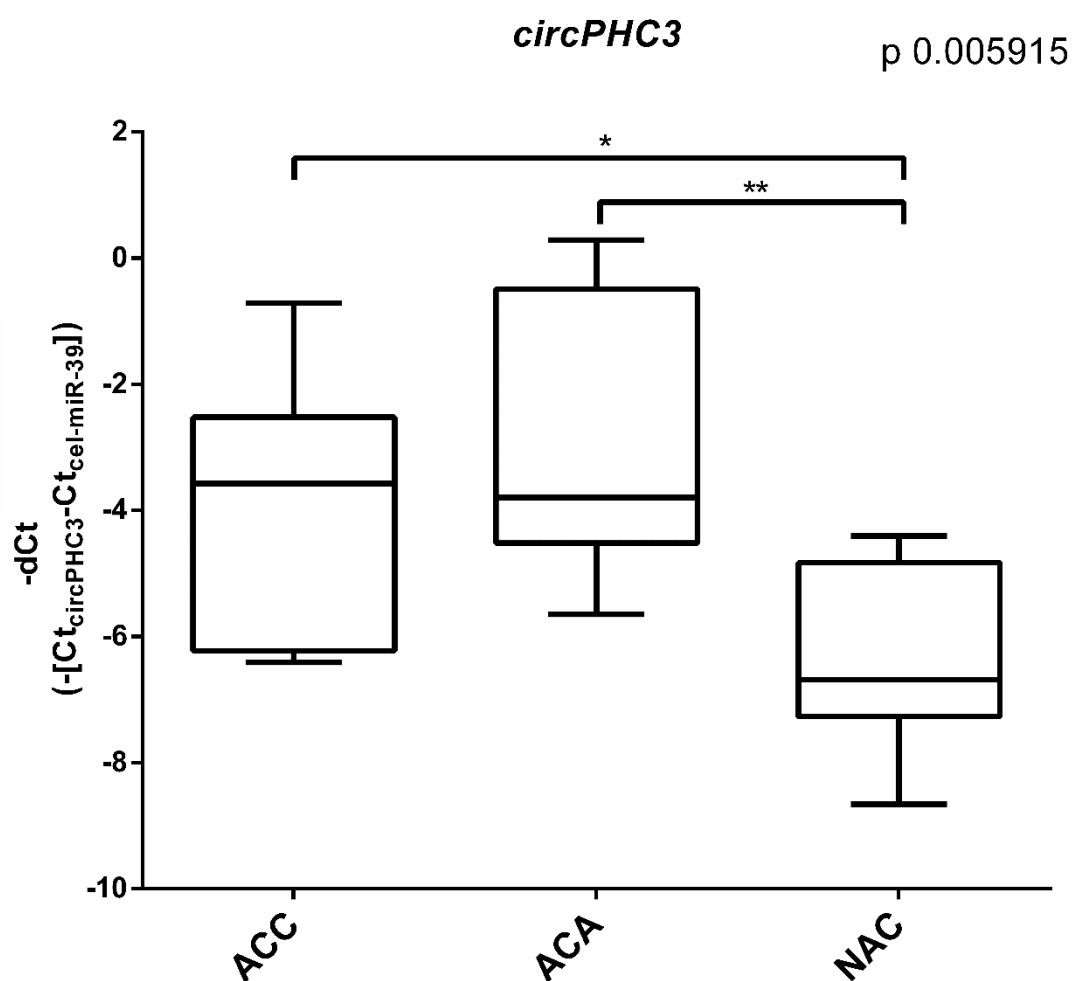


8. ábra: Hőtérkép, amely a circRNS expressziós szintek különbségét mutatja az ACC vs. ACA minták között felügyelet nélküli csoportosítással (saját ábra). Piros színárnyalattal jeleztük a felülexpressziót. Az ordinátengelyen található a legdifferenciáltabban expresszáldó circRNS gének, valamint azok genomi helyzetére vonatkozó információ.

4.2.2. A szekvenálás során szignifikánsan eltérő expressziójú cirkuláris RNS-ek validációja

Tekintettel az alulexpresszáld cirkuláris RNS-ek nagyon alacsony szintjére és nehéz kimutathatóságára, csak az adenocarcinómában felülexpresszáld cirkuláris RNS-ekre koncentráltunk. A hőtérkép alapján az 5 leginkább differenciáltan expresszáld cirkuláris RNS-t választottuk ki (PHC3:-: chr3: 170145422:170149244; FCGBP:-:chr19: 39877662:39893527; TIMMDC1:+:chr3: 11950351: 119504021; KDM4C:+:chr9: 6880011:6893232; MAN1A2:+:chr1: 117402185:117420649). A differenciáltan expresszáldó cirkuláris RNS-ek sorrendje fontossági sorrendben az adj.Pvalue után

Pvalue után logFC értékek figyelembevétele alapján állapítottuk meg. Ennek az 5 cirkuláris RNS-nek az RNS szekvenálási eredményeinek ellenőrzésére RT-qPCR-t hajtottunk végre különböző, a backsplice junction-t (BSJ) lefedő primerekkel egy teljesen független validációs kohorszban (10 ACC, 8 ACA and 8 NAC). A **9. ábrán** látható módon a *circPHC3* (CircAtlas ID: *hsa-PHC3_0006*; CircPedia ID: *HSA_CIRCpedia_44334*) szignifikánsan felülexpresszálnak adódott ACC és ACA betegekben a NAC betegekhez képest, ami összhangban volt korábbi szekvenálási eredményeinkkel. A másik 4 cirkuláris RNS esetében nem kaptunk szignifikánsan eltérő eredményt.

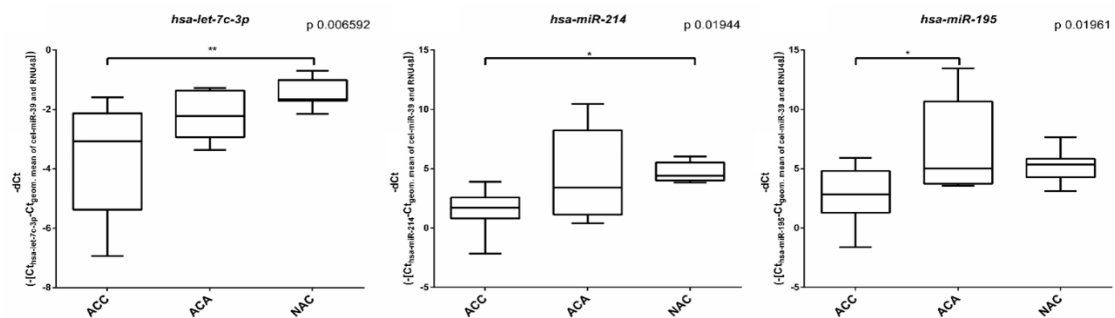


9. ábra: Box plot diagram, amely a *circPHC3* expresszióját mutatja be ACC, ACA és NAC mintákban [190]. A *circPHC3* szignifikánsan felülexpresszálnak adódott ACC és ACA betegekben a NAC betegekhez képest (p 0,005915). ACC: adrenocorticalis carcinoma, ACA: adrenocorticalis adenoma, NAC: normal adrenal cortex, *:p=0,05>, **:p=0,01>. Egyutas ANOVA és Tukey tesztek alkalmaztunk.

4.2.3. A *circPHC3* lehetséges mikroRNS interakcióinak vizsgálata

A *circPHC3* által a potenciálisan kötődő mikroRNS-eket a clipSearch program segítségével határoztuk meg *in silico* módon.

Az *in silico* előrejelzés alapján meghatározott differenciáltan expresszálódó *circPHC3*-hoz potenciálisan kötődő mikroRNS-et RT-qPCR módszerrel határoztuk meg. Három potenciálisan kötődő mikroRNS-t választottunk ki a szakirodalomban is leírt relevanciájuk alapján. *Hsa-let-7c-3p* és a *hsa-miR-214* szignifikánsan alulexpressziót mutatott ACC vs. NAC, míg a *hsa-miR-195* szignifikáns alulexpressziót mutatott ACC vs. ACA FFPE minták között (**10. ábra**).



10. ábra: Box plot diagramok, amelyek a *hsa-let-7c-3p* (p 0,006592), *hsa-miR-214* (p 0,01944) és *hsa-miR-195* (p 0,01961) mikroRNS-ek expresszióját mutatják be a *cel-miR-39* és *RNU48* geometriai átlagához viszonyítva ACA, ACC és NAC mintákban [190]. *Hsa-let-7c-3p* és a *hsa-miR-214* szignifikánsan alulexpressziót mutatott ACC vs. NAC, míg a *hsa-miR-195* szignifikáns alulexpressziót mutatott ACC vs. ACA minták között. ACC: adrenocorticalis carcinoma, ACA: adrenocorticalis adenoma, NAC: normal adrenal cortex. * p=0,05>, ** p=0,01>. Egyutas ANOVA és Tukey tesztek alkalmaztunk.

5. Megbeszélés

Vizsgálataimban a mellékvesekéreg-daganatok szövetmintáiban vizsgáltam a nem kódoló RNS-ek kifejeződését azzal a céllal, hogy a szövettani vizsgálatot segítő, a jó és rosszindulatú daganatok biztos elkülönítését lehetővé tevő molekuláris markereket tudjunk azonosítani. A rövid nem kódoló RNS-ek közé tartozó mikroRNS-ekről már sok adat áll rendelkezésre, de munkámban ismereteink szerint elsőként mesterséges intelligencia segítségével vizsgáltuk kombinációit és új, nagy érzékenységgű és fajlagosságú markereket találtunk. A hosszú nem kódoló RNS-ek közé tartozó cirkuláris RNS-ek mellékvesekéreg daganatokban betöltött szerepéről alig van adat, itt is az elsők között végeztünk cirkuláris RNS profil meghatározást.

5.1. mikroRNS kombinációk vizsgálata mesterséges intelligencia segítségével mellékvesekéreg adenomában és carcinomában

Kutatásunkkal a mellékvesekéreg tumorok kihívást jelentő differenciáldiagnosztikájához kívántunk hozzájárulni. E tanulmányban megvizsgáltuk a mesterséges intelligencián (gépi tanulás és neurális hálózat) alapuló mikroRNS kombinációk hatékonyságát a rosszindulatú mellékvesetumorok elkülönítésében.

Szakirodalmi adatok alapján tizenhat, mellékvesetumorokban már leírt mikroRNS-t vontunk be, azonban közülük csak öt (*hsa-miR-195*, *hsa-miR-210*, *hsa-miR-375*, *hsa-miR-483-5p* és *hsa-miR-503*) került be a legjobban teljesítő kombinációk közé. Nem meglepő módon e mikroRNS-eket a legtöbb mellékvesekéreg daganatokat célzó vizsgálatban szignifikánsan differenciált expresszióval jellemezték a jó- és rosszindulatú daganatok között.

A legtöbb tanulmány szerint a *hsa-miR-195* alulexpresszált ACC-ban az ACA-hoz képest [159–161,163,165,177]. Ezenkívül, összefüggésbe hozható a *hsa-miR-195* alulexpresszált szintje a kedvezőtlen kimenetellel, és alacsonyabb szintje a keringésben általában korrelált a nagyobb daganatmérettel [160,161,165]. Másrészt, a felülexpresszált *hsa-miR-195* csökkentette a sejtproliferációt NCI-H295R ACC sejtekben [163]. A *hsa-*

miR-195 génje a 17p13 genomi régióon belül helyezkedik el, amelyről bebizonyosodott, hogy gyakran elveszik mellékvesekéreg tumorokban [165].

A *hsa-miR-210* egy úgynevezett általános hipoxamiR, hiszen hipoxia esetén fokozódik kifejeződése és a *hsa-miR-210* túlzott expressziója gyakori eseménynek tűnik különböző daganatok patogenezisében [191]. A *hsa-miR-210*-et a hipoxia indukálta 1 α faktor (HIF1 α) szabályozza, amely fontos tényező a daganatellenes terápiás rezisztencia kialakulásában [192–194]. Túlzott expresszióját már több tanulmányban is kimutatták ACC vs. ACA, ill. NAC mintákon [158,159,163,172], valamint a távoli metasztázisokban is szignifikánsan differenciált expressziót írtak le ACC-ben [160]. A *hsa-miR-210* expressziós szintje szintén összefüggésbe hozható a kedvezőtlen kimenetellel [171].

A *hsa-miR-375* szignifikánsan alulexpresszálódik ACC-ban és ACA-ban a NAC mintákhoz képest előző tanulmányaink tanúsága szerint. Targetjei között szerepelnek olyan onkogének is, mint például *AEG-1/MTDH*, *PDK1*, *YWHAZ/14-3-3z*, *YAP* és *JAK2*, amelyek különböző onkológiai folyamatokban vesznek részt [158]. A *hsa-miR-375* és a Wnt- β -catenin útvonal közötti reciprok hatásmechanizmust is felvetették már [195]. A Wnt- β -catenin útvonal egy fontos tényező az ACC patogenezisében [21,196]. Meglepő eredmény volt, hogy a *hsa-miR-375*-öt a mesterséges intelligencia bevonta a jól teljesítő modellek közé, sőt az egyik legjobban teljesítő kombinációban is helyet kapott.

A *hsa-miR-483-5p* felülexpressziója tekinthető a mellékvesekéreg karcinóma legjobb markerének [161,162,164,165,169,170,176,177,197] A *hsa-miR-483-5p* ugyanazon lókusztól a 11p15.5 kromoszómáról ko-expresszálódik az insulin-like growth faktor 2-vel (*IGF2*) [177]. Az ACC kialakulásának egyik fő jellegzetessége az *IGF2* túltermelés [198,199]. N-myc downstream-regulált géncsaládjának 2-es és 4-es tagjait (*NDRG2* és *NDRG4*) azonosították, mint a *hsa-miR-483-5p* célpontjait és expressziójuk ellentétes irányt mutat a *hsa-miR-483-5p*-vel [200]. A *hsa-miR-483-5p* egy érdekes példája a mikroRNS körében leírt szövet- és tumor-specificitás jelenségének, minthogy a Wilms-tumorokban és gliomasejteknél éppen az alulexpresszióját mutatták ki, ami arra utal, hogy a tumor szuppresszor aktivitást fejt ki ezekben a daganatokban és szövetekben [201,202].

A *hsa-miR-503* is már számos mellékvesekéreg-daganattal foglalkozó cikkben leírásra került [94,108,158,160,161,163,172]. Patogenetikai szerepét egyéb tumorokban is

felvetették már [203,204]. Korrelációt írtak le a nagyobb tumorméret és a *hsa-miR-503* magasabb expressziója, a Weiss-kritériumok, klinikai kimenetel és a betegek túlélése között. A *hsa-miR-503*-at korábban, mint közvetlen sejtciklus- és differenciálódás szabályozóként írták le különböző sejtvonalakban [205,206].

A három legjobban teljesítő mikroRNS kombináció egyértelműen jobb szenzitivitási és specificitási mutatókkal rendelkezett a kombinációkban szereplő egyedi mikroRNS-eknél és az egyes mikroRNS-ekre vonatkozó korábbi irodalmi adatoknál is (pl. szenzitivitás-specificitás: 68,7–93,7; 73,7–100 a *hsa-miR-195* és a *hsa-miR-483-5p* esetében [164]). Egyes irodalmi adatok azonban összehasonlítható, vagy akár még jobb diagnosztikai teljesítményt is mutattak, mint a mi kombinációink. Például korábbi vizsgálatunkban a *hsa-miR-511* és a *hsa-miR-503* kombinációja 100%-os szenzitivitási és 97%-os specificitási eredményeket produkált, és Feinmesser tanulmányában a *hsa-miR-497* és a *hsa-miR-34a* kombinációja 100%-os érzékenységi és 96%-os specificitási mutatókkal szolgált [158,160,164]. A legtöbb korábbi tanulmányban azonban kisebb kohorszokat alkalmaztak (pl. csak 7 és 17 ACC minta szerepelt a két fent említett vizsgálatban [158,160]). Különböző kohorsz összetételek, platformok és statisztikai módszerek közötti különbségekkel is szintén számolni kell.

Természetesen a mi tanulmányunknak is vannak korlátai. Ezek közé tartozik a vizsgált mikroRNS-ek korlátozott száma és azoknak a kohorszoknak a mérete, amelyek ugyan nagyobbak, mint a legtöbb korábbi tanulmányban, de még mindig tovább kellene növelni számukat az azonosított markerek klinikai hasznosságának megítélhetősége érdekében. Továbbá, FFPE mintákon retrospektív elrendezésben végeztük méréseinket, ezért ezen mikroRNS kombinációk klinikai hasznosságának megítélésére további vizsgálatokat kell végezni frissen fagyasztott mintákon és prospektív módon.

Kis mintaméreték használata a gépi tanulási technikákban torzított gépi tanuláson alapuló becslési teljesítményhez vezethet. Az ilyen típusú torzítás elkerülése végett ajánlott egy eltérő, új adatkészlet a validációhoz. Vizsgálatunkban mind a felfedező, mind a validációs kohorsz különböző betegekből áll, ezért eredményeink nem szenvedtek el ilyen típusú torzítást.

Egy másik fajta torzítással kell számolnunk bizonyos típusú keresztvalidációk alkalmazásakor. Korábban beszámoltak arról, hogy a beágyazott típusú

keresztellenőrzések (nested types of cross-validation) robusztus és torzításmentes eredmény elérését teszik lehetővé [207]. A tanulmányunkban használt 90–10%-os véletlenszerű tanuló-tesztelő keresztvalidáció a beágyazott típusú keresztellenőrzések családjába tartozik.

A három legjobban teljesítő biomarker kombináció szenzitivitási és specificitási értékei igencsak ígéretesnek tűnnek a klinikai bevezetés szempontjából. Amellett, hogy hasznos kiegészítője lehet a műtéti úton eltávolított daganatminták szövettani vizsgálatának, a mellékvese biopsziás mintákon való mikroRNS-panelek vizsgálata is szintén megfontolandó. A mellékvese biopszia jelenleg nem javasolt a mellékvesedaganatok rutin kivizsgálásának részeként főként a szövettani elemzés nehézségei miatt, de szintén számolnunk kell a beavatkozás lehetséges, ám ritka komplikációival is. Ha a rosszindulatú daganat diagnózisa megbízhatóan megállapítható lenne a kis biopsziás mintákból származó mikroRNS panelek használatával, akkor ez akár kiszélesíthetné a mellékvese biopszia alkalmazását a műtét előtti diagnózisban és a jelenlegi ajánlásokat is újra kellene gondolni. Feltételezésünk szerint a mikroRNS kombinációk még inkább alkalmasabbak lehetnek a preoperatív diagnózis megállapítására, akár újra beillesztve a kivizsgálási algoritmusba a mellékvese biopsziát, illetve a módszer molekuláris biológiai természetéből fakadóan a nehezen értékelhető szövettani mintákból is érdemi információ kinyerésére lenne lehetőség és a posztoperatív diagnózisalkotást is segíthetné.

Azonban különbséget kell tenni a betegség szűrővizsgálat-szerű detektálása és klinikai diagnózisa között. A szenzitivitás és specificitás azt mondja el, hogy a teszt milyen hatékonysággal ismeri fel azt, aki beteg, illetve egészséges. A pozitív- és negatív prediktív érték pedig azt, hogy pozitív vagy negatív teszteredmény esetén az az egyén valójában beteg, illetve egészséges-e. További különbség, hogy a szenzitivitás és specificitás vizsgálatok mesterségesen létrehozott prevalenciájú kohorszokon (ahol ismert a diagnózis) is megbízható közelítést adnak a teszt hatékonyságára nézve, addig a prediktív értékek a valós prevalenciájú populációkon végzett mérésekből adják a legmegbízhatóbb közelítést. Ha a vizsgált populációban a betegség ritkán fordul elő (pl. ACC), akkor számolni kell a fals pozitív leletek arányának emelkedésével, míg a szenzitivitást, specificitást ez nem változtatja. A diagnosztikában a mikroRNS kombinációk PPV és az NPV értékének figyelembevételével válna lehetőség a mikroRNS kombinációk napi

rutinba való elhelyezésére, amelyhez azonban további klinikai vizsgálatok szükségesek pontosan azon a populáción, amelyre alkalmazni kívánjuk az új eljárást.

5.2. Cirkuláris RNS profilozás mellékvesekéreg adenomában, carcinomában és ép mellékveseszövetben

A mellékvesekéreg daganatok nehéz és nagy szakértelmet igénylő szövettani differenciáldiagnosztikájának lehetséges megoldásait kutattuk e tanulmányunkkal is.

A cirkuláris RNS-ek még stabilabbak, mint a mikroRNS-ek körkörösén zárt szerkezetük és RNÁ-zal szembeni rezisztenciájuk miatt, de mennyiségük általában sokkal alacsonyabb a sejtekben. Számos tanulmány számolt be a cirkuláris RNS-ek eltérő expressziójáról különböző daganatokban, és javasolta molekuláris markerként való alkalmazásukat is, pl. prosztatákban, tüdőrákban, mellrákban [208–215]. A cirkuláris RNS-eket még nem vizsgálták a mellékvesekéreg rosszindulatú daganatának markereként, és legjobb tudásunk szerint első alkalommal mi végeztünk nagy léptékű, NGS alapú cirkuláris RNS profilozást mellékvesekéreg daganatokban. Eddig egyetlen *in vitro* vizsgálatot találtunk a cirkuláris RNS-ről ACC-ben, egyetlen cirkuláris RNS vizsgálatával [216]. Annak ellenére, hogy nagyszámú potenciálisan eltérően expresszálódó cirkuláris RNS-t találtunk az NGS segítségével, és az öt legjobban teljesítő cirkuláris RNS-t választottuk ki validálásra, csak egy cirkuláris RNS-t tudtunk eltérően expresszálódóként validálni: a *circPHC3* mind jóindulatú, mind rosszindulatú mellékvesekéreg daganatokban fokozottan expresszálódott a normális mellékvesekéreghez képest. Feltételezhető tehát, hogy a *circPHC3* összefüggésbe hozható a mellékvesekéreg daganat kialakulásával, függetlenül annak jóindulatú vagy rosszindulatú viselkedésétől, és megváltozott expressziója általános jelenség lehet mind a jóindulatú, mind a rosszindulatú mellékvesekéreg daganatokban. Epidemiológiai megfigyelések alapján azonban a mellékvesekéregben a jóindulatú daganat rosszindulatúvá válása nagyon ritka esemény lehet, és nem valószínű, hogy ez okozza az ACC esetek túlnyomó részét, így megfigyelésünk biológiai jelentősége nem világos [217–220].

A *circPHC3* (CircAtlas ID: *hsa-PHC3_0006*; CircPedia ID: *HSA_CIRCpedia_44334*) a PHC3 lókusztól íródik át, amely a polihomeotikus-szerű protein 3-at kódolja, és sok gén transzkripciósan represszált állapotának fenntartásához szükséges, például a Hox gének esetében a fejlődés során [221]. A PHC3 a humán polycomb komplex tagja, és az osteosarcoma tumorszuppresszoraként is leírták már szerepét [222]. Vizsgálatunkban a *circPHC3* a daganatos szövetekben (mind jóindulatú, mind rosszindulatú) a normális mellékvesekéreg szövetekhez képest tapasztalt túlzott expressziója alapján onkogén tulajdonságokkal rendelkezik. A megfigyelt ellentétes biológiai funkciók lehetséges magyarázata a cirkuláris RNS-ek szövet- és tumor specificitásában rejlik, hasonlóan a mikroRNS-ekhez [223].

A cirkuláris RNS-ek különféle módokon hatnak és egyik hatásmechanizmusuk a komplementer szekvenciák mikroRNS-ek szivacsoként való megkötésével (sponging) kapcsolatos. Egy *in silico* előrejelzés alapján három olyan mikroRNS-t választottunk ki, amelyeket a *circPHC3* potenciálisan megköthet, és a *circPHC3* túlzott expressziója miatt ezeknek a mikroRNS-eknek a normális mellékvesekéreghez viszonyított alulexpressziójára lehetne számítani mind a jóindulatú, mind a rosszindulatú daganatszövetekben. A *hsa-let-7c-3p*, a *let-7* tumorszuppresszor mikroRNS család egy tagjáról már leírták, hogy az ACC-ben alulexpresszált az ACA-val szemben [224]. Ezenkívül a *let-7* családot LIN28 szabályozó mikroRNS-eként is azonosították [225], és a LIN28 fehérje expressziója összefüggésbe hozható az ACC kiújulásával [226]. Korábban kimutatták, hogy a *hsa-miR-214* alulexpresszált az ACC vs. ACA szövetekben [227]. HeLa sejtekben a *hsa-miR-214* gátlása csökkent apoptózist eredményezett [228]. Mind a *hsa-let-7c-3p*, mind a *hsa-miR-214* alacsonyabb expressziót mutatott ACC-ben a NAC-hoz képest, ami megfelelhet a sponging hipotézisnek, de az ACA-ban az alulexpresszió bizonyos tendenciája ellenére nem lehetett szignifikáns különbséget kimutatni az ACA és a NAC között. A *hsa-miR-195* szignifikánsan alulexpresszáldott az ACC mintákban az ACA mintákhoz képest, ami megfelel a korábbi vizsgálatokban leírt tumor szuppresszor szerepének [100,101,224,229–231]. Ebből arra következtethetünk, hogy a mikroRNS expressziójában mért eredmények nem teljesen kompatibilisek ezen mikroRNS-ek *in silico* előrejelzett *circPHC3* általi potenciális sponging mechanizmusával.

Tanulmányunk korlátai közé tartozik a kis mintaméret és az FFPE minták használata. A frissen fagyasztott minták alkalmasabbnak tűnnek cirkuláris RNS-analízisre a magasabb RNS tartalmuk miatt [232], és további cirkuláris RNS profilozási vizsgálatok javasolhatók a mellékvesekéreg daganatokra frissen fagyasztott minták felhasználásával.

6. Következtetések

Doktori kutatásaim során célunk volt a mellékvesekéreg jó- és rosszindulatú daganatai közti differenciáldiagnosztikai különbségtétel segítése a munkacsoportunk több, mint egy évtizedre visszanyúló nem kódoló RNS-ek területén szerzett tapasztalatainak felhasználásával. Elsőként vizsgáltuk meg a mellékvesetumorok kutatásaiban már kellőképpen alátámasztott mikroRNS-ek leghatékonyabb lehetséges kombinációit mesterséges intelligencia segítségével, *in vitro* kísérleteken keresztül. Ezen kívül, először végeztünk újgenerációs szekvenáláson alapuló cirkuláris RNS profilozást és a kapott eredmények RT-qPCR validációját jó- és rosszindulatú, illetve egészséges mellékvesekéreg szöveti mintáin. A következtetéseinket az alábbiakban foglaltuk össze:

1. Kifejlesztettünk új, RT-qPCR módszeren alapuló mikroRNS biomarker kombinációkat, amelyek magas szenzitivitási és specificitási értékekkel képesek elkülöníteni egymástól a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg szöveti mintáit gépi tanuláson és neurális hálón alapuló mesterséges intelligencia módszerek segítségével, amelyek képesek lehetnek segítséget nyújtani a mellékvese daganatok differenciáldiagnosztikájában. A legjobban teljesítő 3 kombinációs modell: a *hsa-miR-195 + hsa-miR-210 + hsa-miR-503*, a *hsa-miR-210 + hsa-miR-375 + hsa-miR-503* és a *hsa-miR-210 + hsa-miR-483-5p + hsa-miR-503* 90% feletti szenzitivitási és specificitási értékeket mutatott.
 - a. A három modell differenciáldiagnosztikai képessége egyértelműen felülmúlja a magukat a mikroRNS kombinációkat tartalmazó egyedi mikroRNS-ekkel elért elkülönítő képességet, mind a szakirodalmi eredményekkel, mind a saját méréseink eredményével összehasonlítva.
 - b. Az eredményeink további, még nagyobb elemszámú kohorszokon való validációja és mellékvese-biopsziában történő potenciális felhasználásának kiértékelése a jövő feladata. Szintén, friss fagyasztott mellékvesekéreg mintákon történő prospektív vizsgálatokkal tovább növelhető eredményeink bizonyossági foka. Tekintettel a mikroRNS kombinációk igen magas szenzitivitási és specificitási értékeire, eredményeinket benyújtottuk a Szellemi Tulajdon Nemzeti Hivatalába szabadalmi eljárás céljából (P2200007).

2. Elsőként mutattuk ki a mellékvesekéreg-daganatok differenciált cirkuláris RNS expresszióját nagy áteresztőképességű RNS szekvenálással szöveti mintákon. Kimutattuk a *circPHC3* differenciált expresszióját a jó- és rosszindulatú mellékvesetumorok és normális mellékvesekéreg szövetei között RT-qPCR módszer segítségével alátámasztva.
 - c. A *circPHC3* mellékvesében és mellékvese daganataiban betöltött biológiai viselkedésének felderítésére további vizsgálatok szükségesek a jövőben. A mellékvesekéreg daganatainak cirkuláris RNS vizsgálatai tovább bővíthetik a mellékvesedaganatok elkülönítésében tapasztalt kihívások hajtotta biomarker kutatást.

7. Összefoglalás

A jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg daganatok elkülönítése még szövettani vizsgálattal is nehéz. PhD munkámban a jó- és rosszindulatú daganatok között eltérő módon kifejeződő nem kódoló RNS-eket vizsgáltam biomarkerek azonosítása céljából. A rövid nem kódoló RNS-ek közé tartozó mikroRNS-ek kombinációit mesterséges intelligencia módszereivel vizsgáltam és elsőként tanulmányoztuk a cirkuláris RNS-ek expressziós mintázatát.

Módszerek: Mesterséges intelligencia és RT-qPCR módszerek segítségével tanulmányoztunk különböző mikroRNS kombinációkat diagnosztikai hatékonyságuk feltárása érdekében, illetve a circRNS expressziós mintázatát ACA-ban, ACC-ben és normál mellékvesekéregben (NAC) RT-qPCR módszerrel vizsgálva. A mikroRNS-ek vizsgálatához 31 ACC, 32 ACA és 10 NAC formalinnal fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) mintát, míg 18 ACC, 16 ACA és 16 NAC FFPE mintát vizsgáltunk a circRNS mérések során. A mikroRNS-ek RT-qPCR validációjához és az azt követő mesterséges intelligencia alapú osztályozáshoz csak a 90%-nál nagyobb osztályozási képességgel rendelkező modelleket választottuk ki. A circRNS-ek detektálásához három különböző programot (CIRI2, CircExplorer2, AutoCirc) használtunk. A leginkább differenciáltan expresszálódó circRNS-eket RT-qPCR-rel mértük egy független kohorsz segítségével, valamint lehetséges *in silico* jóslott mikroRNS interakciót is vizsgáltunk.

Eredmények: A legjobban teljesítő statisztikai mikroRNS-modellek a következők lettek: *hsa-miR-210 + hsa-miR-483-5p + hsa-miR-503*, *hsa-miR-210 + hsa-miR-375 + hsa-miR-503* és *hsa-miR-195 + hsa-miR-210 + hsa-miR-503* több mint 90%-os érzékenységgel és specificitással. E három modell diagnosztikai teljesítménye kétségtelenül jobb volt, mint az egyedi mikroRNS-eké. A *circPHC3* cirkuláris RNS szignifikáns felülexpresszióját tudtuk validálni ACC és ACA vs. NAC mintákban RT-qPCR segítségével. Nem tudtunk megfigyelni a mikroRNS interakciós hipotézisünknek teljes mértékben megfelelő expressziós változásokat.

Konklúziók: Három kivételes diagnosztikai teljesítményű mikroRNS-kombinációt hoztunk létre mesterséges intelligencia alapú módszerekkel. Továbbá, kimutattuk a

mellékvesekéreg-daganatok és ép mellékvesekéreg differenciált cirkuláris RNS expresszióját nagy áteresztőképességű RNS szekvenálással szöveti mintákon.

8. Summary

Distinguishing between benign and malignant adrenal cortex tumors is difficult even with histological examination. In my PhD work, I investigated differently expressed non-coding RNAs between benign and malignant tumors to identify biomarkers. I investigated the combinations of microRNAs belonging to short non-coding RNAs using artificial intelligence methods and we were the first to study the expression pattern of circular RNAs.

Methods: Using artificial intelligence and RT-qPCR methods, we studied different microRNA combinations to reveal their diagnostic efficiency, and the expression pattern of circRNA in ACA, ACC and normal adrenal cortex (NAC) was examined by RT-qPCR method. For the analysis of microRNAs, 31 ACC, 32 ACA and 10 NAC formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples were examined, while 18 ACC, 16 ACA and 16 NAC FFPE samples were examined during the circRNA measurements. For the RT-qPCR validation of microRNAs and the subsequent artificial intelligence-based classification, only models with a classification ability greater than 90% were selected. Three different programs (CIRI2, CircExplorer2, AutoCirc) were used to detect circRNAs. The most differentially expressed circRNAs were measured by RT-qPCR using an independent cohort, and possible *in silico* predicted microRNA interaction was also investigated.

Results: The best performing statistical microRNA models were: *hsa-miR-210 + hsa-miR-483-5p + hsa-miR-503*, *hsa-miR-210 + hsa-miR-375 + hsa-miR-503* and *hsa-miR-195 + hsa-miR-210 + hsa-miR-503* with more than 90% sensitivity and specificity. The diagnostic performance of these three models was undoubtedly superior than that of individual microRNAs. We were able to validate the significant overexpression of *circPHC3* circular RNA in ACC and ACA vs. in NAC samples by RT-qPCR. We were unable to observe expression changes fully consistent with our microRNA interaction hypothesis.

Conclusions: We created three microRNA combinations with exceptional diagnostic performance using artificial intelligence-based methods. Furthermore, we demonstrated the differential expression of circular RNAs in adrenocortical tumors and intact adrenal cortex by high-throughput RNA sequencing on tissue samples.

9. Irodalomjegyzék

1. Bovio, S.; Cataldi, A.; Reimondo, G.; Sperone, P.; Novello, S.; Berruti, A.; Borasio, P.; Fava, C.; Dogliotti, L.; Scagliotti, G. V.; Prevalence of Adrenal Incidentaloma in a Contemporary Computerized Tomography Series. *J Endocrinol Invest* **2006**, *29*, 298–302, doi:10.1007/BF03344099.
2. Mantero, F.; Terzolo, M.; Arnaldi, G.; Osella, G.; Masini, A.M.; Ali`, A.A.; Giovagnetti, M.; Opocher, G.; Angeli, A. A Survey on Adrenal Incidentaloma in Italy. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**, *85*, 637–644, doi:10.1210/JCEM.85.2.6372.
3. Mansmann, G.; Lau, J.; Balk, E.; Rothberg, M.; Miyachi, Y.; Bornstein, S.R. The Clinically Inapparent Adrenal Mass: Update in Diagnosis and Management. *Endocr Rev* **2004**, *25*, 309–340, doi:10.1210/ER.2002-0031.
4. Allolio, B.; Fassnacht, M. Clinical Review: Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update. *J Clin Endocrinol Metab* **2006**, *91*, 2027–2037, doi:10.1210/JC.2005-2639.
5. Lattin, G.E.; Sturgill, E.D.; Tujo, C.A.; Marko, J.; Sanchez-Maldonado, K.W.; Craig, W.D.; Lack, E.E. From the Radiologic Pathology Archives: Adrenal Tumors and Tumor-like Conditions in the Adult: Radiologic-Pathologic Correlation. *Radiographics* **2014**, *34*, 805–829, doi:10.1148/RG.343130127.
6. Erickson, L.A.; Erickson, L.A. Challenges in Surgical Pathology of Adrenocortical Tumours. *Histopathology* **2018**, *72*, 82–96, doi:10.1111/HIS.13255.
7. Fassnacht, M.; Dekkers, O.M.; Else, T.; Baudin, E.; Berruti, A.; De Krijger, R.R.; Haak, H.R.; Mihai, R.; Assie, G.; Terzolo, M. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the Management of Adrenocortical Carcinoma in Adults, in Collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol* **2018**, *179*, G1–G46, doi:10.1530/EJE-18-0608.
8. Adrenal Cortical Carcinoma. Epidemiology and Treatment with Mitotane and a Review of the Literature - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8242539/>

(accessed on 5 August 2022).

9. Libé, R.; Borget, I.; Ronchi, C.L.; Zaggia, B.; Kroiss, M.; Kerkhofs, T.; Bertherat, J.; Volante, M.; Quinkler, M.; Chabre, O.; Prognostic Factors in Stage III–IV Adrenocortical Carcinomas (ACC): An European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) Study. *Ann Oncol* **2015**, *26*, 2119–2125, doi:10.1093/ANNONC/MDV329.
10. Torti, J.F.; Correa, R. Adrenal Cancer. **2022**.
11. Rodgers, S.E.; Evans, D.B.; Lee, J.E.; Perrier, N.D. Adrenocortical Carcinoma. *Surg Oncol Clin N Am* **2006**, *15*, 535–553, doi:10.1016/J.SOC.2006.05.005.
12. Bornstein, S.R.; Stratakis, C.A.; Chrousos, G.P. Adrenocortical Tumors: Recent Advances in Basic Concepts and Clinical Management. *Ann Intern Med* **1999**, *130*, 759–771, doi:10.7326/0003-4819-130-9-199905040-00017.
13. Sidhu, S.; Sywak, M.; Robinson, B.; Delbridge, L. Adrenocortical Cancer: Recent Clinical and Molecular Advances. *Curr Opin Oncol* **2004**, *16*, 13–18, doi:10.1097/00001622-200401000-00004.
14. Macedo, G.S.; Vieira, I.A.; Vianna, F.S.L.; Alemar, B.; Giacomazzi, J.; Brandalize, A.P.C.; Caleffi, M.; Volc, S.M.; de Campos Reis Galvão, H.; Palmero, E.I.; P53 Signaling Pathway Polymorphisms, Cancer Risk and Tumor Phenotype in TP53 R337H Mutation Carriers. *Fam Cancer* **2018**, *17*, 269–274, doi:10.1007/S10689-017-0028-4.
15. Espiard, S.; Bertherat, J. The Genetics of Adrenocortical Tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* **2015**, *44*, 311–334, doi:10.1016/J.ECL.2015.02.004.
16. Juhlin, C.C.; Goh, G.; Healy, J.M.; Fonseca, A.L.; Scholl, U.I.; Stenman, A.; Kunstman, J.W.; Brown, T.C.; Overton, J.D.; Mane, S.M.; Whole-Exome Sequencing Characterizes the Landscape of Somatic Mutations and Copy Number Alterations in Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **2015**, *100*, E493–E502, doi:10.1210/JC.2014-3282/SUPPL_FILE/JC-14-3282.PDF.
17. Koshland, D.E. Molecule of the Year. *Science (80-)* **1993**, *262*, 1953, doi:10.1126/SCIENCE.8266084/ASSET/2F74C793-B316-4A68-800C-4C9CACD53BD7/ASSETS/SCIENCE.8266084.FP.PNG.
18. Hsu, Y.H.; Liao, L.J.; Yu, C.H.; Chiang, C.P.; Jhan, J.R.; Chang, L.C.; Chen, Y.J.; Lou, P.J.; Lin, J.J. Overexpression of the Pituitary Tumor Transforming Gene Induces P53-

- Dependent Senescence through Activating DNA Damage Response Pathway in Normal Human Fibroblasts. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 22630, doi:10.1074/JBC.M109.096255.
19. Ragazzon, B.; Libé, R.; Assié, G.; Tissier, F.; Barreau, O.; Houdayer, C.; Perlemoine, K.; Audebourg, A.; Clauser, E.; René-Corail, F.; Mass-Array Screening of Frequent Mutations in Cancers Reveals RB1 Alterations in Aggressive Adrenocortical Carcinomas. *Eur J Endocrinol* **2014**, *170*, 385–391, doi:10.1530/EJE-13-0778.
 20. Assie, G.; Giordano, T.J.; Bertherat, J. Gene Expression Profiling in Adrenocortical Neoplasia. *Mol Cell Endocrinol* **2012**, *351*, 111–117, doi:10.1016/J.MCE.2011.09.044.
 21. Tissier, F.; Cavard, C.; Groussin, L.; Perlemoine, K.; Fumey, G.; Hagneré, A.M.; René-Corail, F.; Jullian, E.; Gicquel, C.; Bertagna, X.; 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* **2005**, *65*, 7622–7627, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0593.
 22. Assié, G.; Letouzé, E.; Fassnacht, M.; Jouinot, A.; Luscap, W.; Barreau, O.; Omeiri, H.; Rodriguez, S.; Perlemoine, K.; René-Corail, F.; Integrated Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Nat Genet* **2014**, *46*, 607–612, doi:10.1038/NG.2953.
 23. Zheng, S.; Cherniack, A.D.; Dewal, N.; Moffitt, R.A.; Danilova, L.; Murray, B.A.; Lerario, A.M.; Else, T.; Knijnenburg, T.A.; Ciriello, G.; Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 363, doi:10.1016/J.CCELL.2016.07.013.
 24. Weksberg, R.; Smith, A.C.; Squire, J.; Sadowski, P. Beckwith–Wiedemann Syndrome Demonstrates a Role for Epigenetic Control of Normal Development. *Hum Mol Genet* **2003**, *12*, R61–R68, doi:10.1093/HMG/DDG067.
 25. Nakamura, Y.; Yamazaki, Y.; Felizola, S.J.; Ise, K.; Morimoto, R.; Satoh, F.; Arai, Y.; Sasano, H. Adrenocortical Carcinoma: Review of the Pathologic Features, Production of Adrenal Steroids, and Molecular Pathogenesis. *Endocrinol Metab Clin North Am* **2015**, *44*, 399–410, doi:10.1016/J.ECL.2015.02.007.
 26. Rechache, N.S.; Wang, Y.; Stevenson, H.S.; Killian, J.K.; Edelman, D.C.; Merino, M.; Zhang, L.; Nilubol, N.; Stratakis, C.A.; Meltzer, P.S.; DNA Methylation Profiling Identifies Global Methylation Differences and Markers of Adrenocortical Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **2012**, *97*, doi:10.1210/JC.2011-3298.

27. Fonseca, A.L.; Kugelberg, J.; Starker, L.F.; Scholl, U.; Choi, M.; Hellman, P.; Åkerström, G.; Westin, G.; Lifton, R.P.; Björklund, P.; Comprehensive DNA Methylation Analysis of Benign and Malignant Adrenocortical Tumors. *Genes Chromosomes Cancer* **2012**, *51*, 949–960, doi:10.1002/GCC.21978.
28. Barreau, O.; Assié, G.; Wilmot-Roussel, H.; Ragazzon, B.; Baudry, C.; Perlemonoine, K.; René-Corail, F.; Bertagna, X.; Dousset, B.; Hamzaoui, N.; Identification of a CpG Island Methylator Phenotype in Adrenocortical Carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **2013**, *98*, doi:10.1210/JC.2012-2993.
29. Analysis of Germline CDKN1C (P57KIP2) Mutations in Familial and Sporadic Beckwith-Wiedemann Syndrome (BWS) Provides a Novel Genotype-Phenotype Correlation - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10424811/> (accessed on 5 August 2022).
30. Else, T.; Kim, A.C.; Sabolch, A.; Raymond, V.M.; Kandathil, A.; Caoili, E.M.; Jolly, S.; Miller, B.S.; Giordano, T.J.; Hammer, G.D. Adrenocortical Carcinoma. *Endocr Rev* **2014**, *35*, 282–326, doi:10.1210/ER.2013-1029.
31. Raymond, V.M.; Everett, J.N.; Furtado, L. V.; Gustafson, S.L.; Jungbluth, C.R.; Gruber, S.B.; Hammer, G.D.; Stoffel, E.M.; Greenson, J.K.; Giordano, T.J.; Adrenocortical Carcinoma Is a Lynch Syndrome-Associated Cancer. **2013**, *31*, 3012–3018, doi:10.1200/JCO.2012.48.0988.
32. Ribeiro, R.C.; Neto, R.S.; Schell, M.J.; Lacerda, L.; Sambaio, G.A.; Cat, I. Adrenocortical Carcinoma in Children: A Study of 40 Cases. *J Clin Oncol* **1990**, *8*, 67–74, doi:10.1200/JCO.1990.8.1.67.
33. Practical Clinical Endocrinology. *Pract Clin Endocrinol* **2021**, doi:10.1007/978-3-030-62011-0.
34. Weiss, L.M. Comparative Histologic Study of 43 Metastasizing and Nonmetastasizing Adrenocortical Tumors. *Am J Surg Pathol* **1984**, *8*, 163–169, doi:10.1097/00000478-198403000-00001.
35. Aubert, S.; Wacrenier, A.; Leroy, X.; Devos, P.; Carnaille, B.; Proye, C.; Wemeau, J.L.; Lecomte-Houcke, M.; Leteurtre, E. Weiss System Revisited: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 49 Adrenocortical Tumors. *Am J Surg Pathol* **2002**, *26*, 1612–1619, doi:10.1097/00000478-200212000-00009.

36. Fassnacht, M.; Dekkers, O.M.; Else, T.; Baudin, E.; Berruti, A.; De Krijger, R.R.; Terzolo, M. European Journal of Endocrinology European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the Management of Adrenocortical Carcinoma in Adults, in Collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Guillaume Assie* **2018**, *10*, 19, doi:10.1530/EJE-18-0608.
37. Mahmood, E.; Anastasopoulou, C. Adrenal Adenoma. *StatPearls* **2022**.
38. Ebbehøj, A.; Li, D.; Kaur, R.J.; Zhang, C.; Singh, S.; Li, T.; Atkinson, E.; Achenbach, S.; Khosla, S.; Arlt, W.; Epidemiology of Adrenal Tumours in Olmsted County, Minnesota, USA: A Population-Based Cohort Study. *Lancet Diabetes Endocrinol* **2020**, *8*, 894–902, doi:10.1016/S2213-8587(20)30314-4.
39. Park, J.; De Luca, A.; Dutton, H.; Malcolm, J.C.; Doyle, M.A. Cardiovascular Outcomes in Autonomous Cortisol Secretion and Nonfunctioning Adrenal Adenoma: A Systematic Review. *J Endocr Soc* **2019**, *3*, 996–1008, doi:10.1210/JS.2019-00090.
40. Sato, Y.; Maekawa, S.; Ishii, R.; Sanada, M.; Morikawa, T.; Shiraishi, Y.; Yoshida, K.; Nagata, Y.; Sato-Otsubo, A.; Yoshizato, T.; Recurrent Somatic Mutations Underlie Corticotropin-Independent Cushing's Syndrome. *Science* **2014**, *344*, 917–920, doi:10.1126/SCIENCE.1252328.
41. Ronchi, C.L.; Di Dalmazi, G.; Faillot, S.; Sbiera, S.; Assié, G.; Weigand, I.; Calebiro, D.; Schwarzmayr, T.; Appenzeller, S.; Rubin, B.; Genetic Landscape of Sporadic Unilateral Adrenocortical Adenomas Without PRKACA p.Leu206Arg Mutation. *J Clin Endocrinol Metab* **2016**, *101*, 3526–3538, doi:10.1210/JC.2016-1586.
42. Lodish, M.; Stratakis, C.A. A Genetic and Molecular Update on Adrenocortical Causes of Cushing Syndrome. *Nat Rev Endocrinol* **2016**, *12*, 255–262, doi:10.1038/NRENDO.2016.24.
43. Williams, T.A.; Monticone, S.; Schack, V.R.; Stindl, J.; Burrello, J.; Buffolo, F.; Annaratone, L.; Castellano, I.; Beuschlein, F.; Reincke, M.; Somatic ATP1A1, ATP2B3, and KCNJ5 Mutations in Aldosterone-Producing Adenomas. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* **2014**, *63*, 188–195, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01733.
44. Åkerström, T.; Crona, J.; Delgado Verdugo, A.; Starker, L.F.; Cupisti, K.; Willenberg, H.S.; Knoefel, W.T.; Saeger, W.; Feller, A.; Ip, J.; Comprehensive Re-Sequencing of Adrenal Aldosterone Producing Lesions Reveal Three Somatic Mutations near the KCNJ5 Potassium Channel Selectivity Filter. *PLoS One* **2012**, *7*,

doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0041926.

45. Fassnacht, M.; Arlt, W.; Bancos, I.; Dralle, H.; Newell-Price, J.; Sahdev, A.; Tabarin, A.; Terzolo, M.; Tsagarakis, S.; Dekkers, O.M. Management of Adrenal Incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in Collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol* **2016**, *175*, G1–G34, doi:10.1530/EJE-16-0467.
46. Libè, R.; Dall'Asta, C.; Barbetta, L.; Baccarelli, A.; Beck-Peccoz, P.; Ambrosi, B. Long-Term Follow-up Study of Patients with Adrenal Incidentalomas. *Eur J Endocrinol* **2002**, *147*, 489–494, doi:10.1530/EJE.0.1470489.
47. Zhang, C.D.; Delivanis, D.A.; Eiken, P.W.; Atwell, T.D.; Bancos, I. Adrenal Biopsy: Performance and Use. *Minerva Endocrinol* **2019**, *44*, 288–300, doi:10.23736/S0391-1977.19.02969-9.
48. Bancos, I.; Tamhane, S.; Shah, M.; Delivanis, D.A.; Alahdab, F.; Arlt, W.; Fassnacht, M.; Murad, M.H. DIAGNOSIS OF ENDOCRINE DISEASE: The Diagnostic Performance of Adrenal Biopsy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Eur J Endocrinol* **2016**, *175*, R65–R80, doi:10.1530/EJE-16-0297.
49. Pennanen, M.; Heiskanen, I.; Sane, T.; Remes, S.; Mustonen, H.; Haglund, C.; Arola, J. Helsinki Score—a Novel Model for Prediction of Metastases in Adrenocortical Carcinomas. *Hum Pathol* **2015**, *46*, 404–410, doi:10.1016/J.HUMPATH.2014.11.015.
50. Duregon, E.; Fassina, A.; Volante, M.; Nesi, G.; Santi, R.; Gatti, G.; Cappellesso, R.; Ciaramella, P.D.; Ventura, L.; Gambacorta, M.; The Reticulin Algorithm for Adrenocortical Tumor Diagnosis: A Multicentric Validation Study on 245 Unpublished Cases. *Am J Surg Pathol* **2013**, *37*, 1433–1440, doi:10.1097/PAS.0B013E31828D387B.
51. Slooten, H.; Schaberg, A.; Smeenk, D.; Moolenaar, A.J. Morphologic Characteristics of Benign and Malignant Adrenocortical Tumors., doi:10.1002/1097-0142.
52. Bisceglia, M.; Ludovico, O.; Di Mattia, A.; Ben-Dor, D.; Sandbank, J.; Pasquinelli, G.; Lau, S.K.; Weiss, L.M. Adrenocortical Oncocytic Tumors: Report of 10 Cases and Review of the Literature. *Int J Surg Pathol* **2004**, *12*, 231–243, doi:10.1177/106689690401200304.
53. Wong, D.D.; Spagnolo, D. V.; Bisceglia, M.; Havlat, M.; McCallum, D.; Platten, M.A. Oncocytic Adrenocortical Neoplasms--a Clinicopathologic Study of 13 New Cases

- Emphasizing the Importance of Their Recognition. *Hum Pathol* **2011**, *42*, 489–499, doi:10.1016/J.HUMPATH.2010.08.010.
54. Duregon, E.; Volante, M.; Cappia, S.; Cuccurullo, A.; Bisceglia, M.; Wong, D.D.; Spagnolo, D. V.; Szpak-Ulczo, S.; Bollito, E.; Daffara, F.; Oncocytic Adrenocortical Tumors: Diagnostic Algorithm and Mitochondrial DNA Profile in 27 Cases. *Am J Surg Pathol* **2011**, *35*, 1882–1893, doi:10.1097/PAS.0B013E31822DA401.
55. Bancos, I.; Taylor, A.E.; Chortis, V.; Sitch, A.J.; Jenkinson, C.; Davidge-Pitts, C.J.; Lang, K.; Tsagarakis, S.; Macech, M.; Riestler, A.; Urine Steroid Metabolomics for the Differential Diagnosis of Adrenal Incidentalomas in the EURINE-ACT Study: A Prospective Test Validation Study. *lancet Diabetes Endocrinol* **2020**, *8*, 773–781, doi:10.1016/S2213-8587(20)30218-7.
56. Mattick, J.S. Non-Coding RNAs: The Architects of Eukaryotic Complexity. *EMBO Rep* **2001**, *2*, 986, doi:10.1093/EMBO-REPORTS/KVE230.
57. Eddy, S.R. Non-Coding RNA Genes and the Modern RNA World. *Nat Rev Genet* **2001**, *2*, 919–929, doi:10.1038/35103511.
58. Statello, L.; Guo, C.J.; Chen, L.L.; Huarte, M. Gene Regulation by Long Non-Coding RNAs and Its Biological Functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *22*, 96–118, doi:10.1038/s41580-020-00315-9.
59. Mattick, J.S.; Makunin, I. V. Non-Coding RNA. *Hum Mol Genet* **2006**, *15*, R17–R29, doi:10.1093/HMG/DDL046.
60. Palazzo, A.F.; Lee, E.S. Non-Coding RNA: What Is Functional and What Is Junk? *Front Genet* **2015**, *5*, 2, doi:10.3389/FGENE.2015.00002/BIBTEX.
61. Krol, J.; Loedige, I.; Filipowicz, W. The Widespread Regulation of MicroRNA Biogenesis, Function and Decay. *Nat Rev Genet* **2010**, *11*, 597–610, doi:10.1038/NRG2843.
62. Guo, Z.; Maki, M.; Ding, R.; Yang, Y.; Zhang, B.; Xiong, L. Genome-Wide Survey of Tissue-Specific MicroRNA and Transcription Factor Regulatory Networks in 12 Tissues. *Sci Reports* **2014**, *4*, 1–9, doi:10.1038/srep05150.
63. Liu, H.; Lei, C.; He, Q.; Pan, Z.; Xiao, D.; Tao, Y. Nuclear Functions of Mammalian MicroRNAs in Gene Regulation, Immunity and Cancer. *Mol Cancer* **2018**, *17*, 1–14, doi:10.1186/S12943-018-0765-5.

64. Peng, Y.; Croce, C.M. The Role of MicroRNAs in Human Cancer. *Signal Transduct Target Ther 2016 11* **2016**, *1*, 1–9, doi:10.1038/sigtrans.2015.4.
65. Svoronos, A.A.; Engelman, D.M.; Slack, F.J. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. *Cancer Res* **2016**, *76*, 3666, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0359.
66. Griffiths-Jones, S.; Grocock, R.J.; van Dongen, S.; Bateman, A.; Enright, A.J. MiRBase: MicroRNA Sequences, Targets and Gene Nomenclature. *Nucleic Acids Res* **2006**, *34*, D140, doi:10.1093/NAR/GKJ112.
67. Plotnikova, O.; Baranova, A.; Skoblov, M. Comprehensive Analysis of Human MicroRNA–MRNA Interactome. *Front Genet* **2019**, *10*, 933, doi:10.3389/FGENE.2019.00933/BIBTEX.
68. O’Brien, J.; Hayder, H.; Zayed, Y.; Peng, C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2018**, *9*, 402, doi:10.3389/FENDO.2018.00402/BIBTEX.
69. Kim, Y.K.; Kim, V.N. Processing of Intronic MicroRNAs. *EMBO J* **2007**, *26*, 775–783, doi:10.1038/SJ.EMBOJ.7601512.
70. De Rie, D.; Abugessaisa, I.; Alam, T.; Arner, E.; Arner, P.; Ashoor, H.; Åström, G.; Babina, M.; Bertin, N.; Burroughs, A.M.; An Integrated Expression Atlas of MiRNAs and Their Promoters in Human and Mouse. *Nat Biotechnol 2017 359* **2017**, *35*, 872–878, doi:10.1038/nbt.3947.
71. Ha, M.; Kim, V.N. Regulation of MicroRNA Biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol 2014 158* **2014**, *15*, 509–524, doi:10.1038/nrm3838.
72. Tanzer, A.; Stadler, P.F. Molecular Evolution of a MicroRNA Cluster. *J Mol Biol* **2004**, *339*, 327–335, doi:10.1016/J.JMB.2004.03.065.
73. Han, J.; Lee, Y.; Yeom, K.H.; Kim, Y.K.; Jin, H.; Kim, V.N. The Drosha-DGCR8 Complex in Primary MicroRNA Processing. *Genes Dev* **2004**, *18*, 3016–3027, doi:10.1101/GAD.1262504.
74. Okada, C.; Yamashita, E.; Lee, S.J.; Shibata, S.; Katahira, J.; Nakagawa, A.; Yoneda, Y.; Tsukihara, T. A High-Resolution Structure of the Pre-MicroRNA Nuclear Export Machinery. *Science* **2009**, *326*, 1275–1279, doi:10.1126/SCIENCE.1178705.
75. Denli, A.M.; Tops, B.B.J.; Plasterk, R.H.A.; Ketting, R.F.; Hannon, G.J. Processing of

- Primary MicroRNAs by the Microprocessor Complex. *Nature* **2004**, *432*, 231–235, doi:10.1038/NATURE03049.
76. Cheloufi, S.; Dos Santos, C.O.; Chong, M.M.W.; Hannon, G.J. A Dicer-Independent MiRNA Biogenesis Pathway That Requires Ago Catalysis. *Nature* **2010**, *465*, 584, doi:10.1038/NATURE09092.
77. Yang, S.; Maurin, T.; Robine, N.; Rasmussen, K.D.; Jeffrey, K.L.; Chandwani, R.; Papapetrou, E.P.; Sadelain, M.; O'Carroll, D.; Lai, E.C. Conserved Vertebrate Mir-451 Provides a Platform for Dicer-Independent, Ago2-Mediated MicroRNA Biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 15163–15168, doi:10.1073/PNAS.1006432107/SUPPL_FILE/SD03.XLS.
78. Babiarz, J.E.; Ruby, J.G.; Wang, Y.; Bartel, D.P.; Blelloch, R. Mouse ES Cells Express Endogenous ShRNAs, siRNAs, and Other Microprocessor-Independent, Dicer-Dependent Small RNAs. **2008**, *22*, 2773–2785, doi:10.1101/GAD.1705308.
79. Ruby, J.G.; Jan, C.H.; Bartel, D.P. Intronic MicroRNA Precursors That Bypass Drosha Processing. **2007**, *448*, 83–86.
80. Kawamata, T.; Tomari, Y. Making RISC. *Trends Biochem Sci* **2010**, *35*, 368–376, doi:10.1016/J.TIBS.2010.03.009.
81. Huntzinger, E.; Izaurralde, E. Gene Silencing by MicroRNAs: Contributions of Translational Repression and mRNA Decay. *Nat Rev Genet* **2011**, *12*, 99–110, doi:10.1038/NRG2936.
82. Jo, M.H.; Shin, S.; Jung, S.R.; Kim, E.; Song, J.J.; Hohng, S. Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. *Mol Cell* **2015**, *59*, 117–124, doi:10.1016/J.MOLCEL.2015.04.027.
83. Palanichamy, J.K.; Rao, D.S. MiRNA Dysregulation in Cancer: Towards a Mechanistic Understanding. *Front Genet* **2014**, *5*, 54, doi:10.3389/FGENE.2014.00054/BIBTEX.
84. Vidigal, J.A.; Ventura, A. The Biological Functions of MiRNAs: Lessons from in Vivo Studies. *Trends Cell Biol* **2015**, *25*, 137, doi:10.1016/J.TCB.2014.11.004.
85. Ludwig, N.; Leidinger, P.; Becker, K.; Backes, C.; Fehlmann, T.; Pallasch, C.; Rheinheimer, S.; Meder, B.; Stähler, C.; Meese, E.; Distribution of MiRNA Expression across Human Tissues. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, 3865–3877, doi:10.1093/NAR/GKW116.

86. Bartel, D.P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **2004**, *116*, 281–297, doi:10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
87. Ma, Y.; She, X. guo; Ming, Y. zi; Wan, Q. quan MiR-24 Promotes the Proliferation and Invasion of HCC Cells by Targeting SOX7. *Tumour Biol* **2014**, *35*, 10731–10736, doi:10.1007/S13277-014-2018-6.
88. Gao, Y.; Liu, Y.; Du, L.; Li, J.; Qu, A.; Zhang, X.; Wang, L.; Wang, C. Down-Regulation of MiR-24-3p in Colorectal Cancer Is Associated with Malignant Behavior. *Med Oncol* **2015**, *32*, 1–8, doi:10.1007/S12032-014-0362-4/FIGURES/4.
89. Hall, J.S.; Taylor, J.; Valentine, H.R.; Irlam, J.J.; Eustace, A.; Hoskin, P.J.; Miller, C.J.; West, C.M.L. Enhanced Stability of MicroRNA Expression Facilitates Classification of FFPE Tumour Samples Exhibiting near Total mRNA Degradation. *Br J Cancer* **2012**, *107*, 684–694, doi:10.1038/bjc.2012.294.
90. Klopfeisch, R.; Weiss, A.T.A.; Gruber, A.D. Excavation of a Buried Treasure - DNA, MRNA, MiRNA and Protein Analysis in Formalin Fixed, Paraffin Embedded Tissues. *Histol Histopathol* **2011**, *26*, 797–810, doi:10.14670/HH-26.797.
91. Fassnacht, M.; Kroiss, M.; Allolio, B. Update in Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **2013**, *98*, 4551–4564, doi:10.1210/JC.2013-3020.
92. Herrmann, L.J.M.; Heinze, B.; Fassnacht, M.; Willenberg, H.S.; Quinkler, M.; Reisch, N.; Zink, M.; Allolio, B.; Hahner, S. TP53 Germline Mutations in Adult Patients with Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **2012**, *97*, E476–E485, doi:10.1210/JC.2011-1982.
93. Raymond, V.M.; Else, T.; Everett, J.N.; Long, J.M.; Gruber, S.B.; Hammer, G.D. Prevalence of Germline TP53 Mutations in a Prospective Series of Unselected Patients with Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **2013**, *98*, E119–E125, doi:10.1210/JC.2012-2198.
94. Gaujoux, S.; Grabar, S.; Fassnacht, M.; Ragazzon, B.; Launay, P.; Libé, R.; Chokri, I.; Audebourg, A.; Royer, B.; Sbiera, S.; β -Catenin Activation Is Associated with Specific Clinical and Pathologic Characteristics and a Poor Outcome in Adrenocortical Carcinoma. *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 328–336, doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2006.
95. Gicquel, C.; Bertagna, X.; Schneid, H.; Francillard-Leblond, M.; Luton, J.P.; Girard, F.; Le Bouc, Y. Rearrangements at the 11p15 Locus and Overexpression of Insulin-like

- Growth Factor-II Gene in Sporadic Adrenocortical Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **1994**, 78, 1444–1453, doi:10.1210/JCEM.78.6.7911125.
96. Wilkin, F.; Gagné, N.; Paquette, J.; Oligny, L.L.; Deal, C. Pediatric Adrenocortical Tumors: Molecular Events Leading to Insulin-Like Growth Factor II Gene Overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**, 85, 2048–2056, doi:10.1210/JCEM.85.5.6589.
 97. Sbiera, S.; Schull, S.; Assie, G.; Voelker, H.U.; Kraus, L.; Beyer, M.; Ragazzon, B.; Beuschlein, F.; Willenberg, H.S.; Hahner, S.; High Diagnostic and Prognostic Value of Steroidogenic Factor-1 Expression in Adrenal Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **2010**, 95, E161–E171, doi:10.1210/JC.2010-0653.
 98. Almeida, M.Q.; Fragoso, M.C.B.V.; Lotfi, C.F.P.; Santos, M.G.; Nishi, M.Y.; Costa, M.H.S.; Lerario, A.M.; Maciel, C.C.; Mattos, G.E.; Jorge, A.A.L.; Expression of Insulin-Like Growth Factor-II and Its Receptor in Pediatric and Adult Adrenocortical Tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **2008**, 93, 3524–3531, doi:10.1210/JC.2008-0065.
 99. Patterson, E.E.; Holloway, A.K.; Weng, J.; Fojo, T.; Kebebew, E. MicroRNA Profiling of Adrenocortical Tumors Reveals MiR-483 as a Marker of Malignancy. *Cancer* **2011**, 117, 1630–1639, doi:10.1002/cncr.25724.
 100. Özata, D.M.; Caramuta, S.; Velázquez-Fernández, D.; Akçakaya, P.; Xie, H.; Höög, A.; Zedenius, J.; Bäckdahl, M.; Larsson, C.; Lui, W.O. The Role of MicroRNA Deregulation in the Pathogenesis of Adrenocortical Carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **2011**, 18, 643–655, doi:10.1530/ERC-11-0082.
 101. Duregon, E.; Rapa, I.; Votta, A.; Giorcelli, J.; Daffara, F.; Terzolo, M.; Scagliotti, G. V.; Volante, M.; Papotti, M. MicroRNA Expression Patterns in Adrenocortical Carcinoma Variants and Clinical Pathologic Correlations. *Hum Pathol* **2014**, 45, 1555–1562, doi:10.1016/J.HUMPATH.2014.04.005.
 102. Chabre, O.; Libé, R.; Assie, G.; Barreau, O.; Bertherat, J.; Bertagna, X.; Feige, J.J.; Cherradi, N. Serum MiR-483-5p and MiR-195 Are Predictive of Recurrence Risk in Adrenocortical Cancer Patients. *Endocr Relat Cancer* **2013**, 20, 579–594, doi:10.1530/ERC-13-0051.
 103. Assié, G.; Letouzé, E.; Fassnacht, M.; Jouinot, A.; Luscap, W.; Barreau, O.; Omeiri, H.; Rodriguez, S.; Perlemoine, K.; René-Corail, F.; Integrated Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Nat Genet* **2014**, 46, 607–612, doi:10.1038/ng.2953.

104. Wang, C.; Sun, Y.; Wu, H.; Zhao, D.; Chen, J. Distinguishing Adrenal Cortical Carcinomas and Adenomas: A Study of Clinicopathological Features and Biomarkers. *Histopathology* **2014**, *64*, 567–576, doi:10.1111/his.12283.
105. Doghman, M.; El Wakil, A.; Cardinaud, B.; Thomas, E.; Wang, J.; Zhao, W.; Peralta-Del Valle, M.H.C.; Figueiredo, B.C.; Zambetti, G.P.; Lalli, E. Regulation of Insulin-like Growth Factor-Mammalian Target of Rapamycin Signaling by MicroRNA in Childhood Adrenocortical Tumors. *Cancer Res* **2010**, *70*, 4666–4675, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3970.
106. Ribeiro, T.C.; Jorge, A.A.; Almeida, M.Q.; Mariani, B.M.D.P.; Nishi, M.Y.; Mendonca, B.B.; Fragoso, M.C.B.V.; Latronico, A.C. Amplification of the Insulin-like Growth Factor 1 Receptor Gene Is a Rare Event in Adrenocortical Adenocarcinomas: Searching for Potential Mechanisms of Overexpression. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, doi:10.1155/2014/936031.
107. Jen, J.; Wang, Y.C. Zinc Finger Proteins in Cancer Progression. *J Biomed Sci* **2016**, *23*, doi:10.1186/S12929-016-0269-9.
108. Jain, M.; Zhang, L.; Boufraquech, M.; Liu-Chittenden, Y.; Bussey, K.; Demeure, M.J.; Wu, X.; Su, L.; Pacak, K.; Stratakis, C.A.; ZNF367 Inhibits Cancer Progression and Is Targeted by MiR-195. *PLoS One* **2014**, *9*, e101423, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0101423.
109. Faria, A.M.; Sbiera, S.; Ribeiro, T.C.; Soares, I.C.; Mariani, B.M.P.; Freire, D.S.; De Sousa, G.R.V.; Lerario, A.M.; Ronchi, C.L.; Deutschbein, T.; Expression of LIN28 and Its Regulatory MicroRNAs in Adult Adrenocortical Cancer. **2015**, *82*, 481–488, doi:10.1111/CEN.12607.
110. Merritt, W.M.; Lin, Y.G.; Han, L.Y.; Kamat, A.A.; Spannuth, W.A.; Schmandt, R.; Urbauer, D.; Pennacchio, L.A.; Cheng, J.F.; Nick, A.M.; Dicer, Drosha, and Outcomes in Patients with Ovarian Cancer. *N Engl J Med* **2008**, *359*, 2641–2650, doi:10.1056/NEJMoa0803785.
111. Bahubeshi, A.; Tischkowitz, M.; Foulkes, W.D. MiRNA Processing and Human Cancer: DICER1 Cuts the Mustard. *Sci Transl Med* **2011**, *3*.
112. Martello, G.; Rosato, A.; Ferrari, F.; Manfrin, A.; Cordenonsi, M.; Dupont, S.; Enzo, E.; Guzzardo, V.; Rondina, M.; Spruce, T.; A MicroRNA Targeting Dicer for Metastasis Control. *Cell* **2010**, *141*, 1195–1207, doi:10.1016/J.CELL.2010.05.017.

113. de Sousa, G.R.V.; Ribeiro, T.C.; Faria, A.M.; Mariani, B.M.P.; Lerario, A.M.; Zerbini, M.C.N.; Soares, I.C.; Wakamatsu, A.; Alves, V.A.F.; Mendonca, B.B.; Low DICER1 Expression Is Associated with Poor Clinical Outcome in Adrenocortical Carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 22724–22733, doi:10.18632/ONCOTARGET.4261.
114. Molinari, M. Cell Cycle Checkpoints and Their Inactivation in Human Cancer. *Cell Prolif* **2000**, *33*, 261–274, doi:10.1046/J.1365-2184.2000.00191.X.
115. Tömböl, Z.; Szabó, P.M.; Molnár, V.; Wiener, Z.; Tölgyesi, G.; Horányi, J.; Riesz, P.; Reismann, P.; Patócs, A.; Likó, I.; Integrative Molecular Bioinformatics Study of Human Adrenocortical Tumors: MicroRNA, Tissue-Specific Target Prediction, and Pathway Analysis. *Endocr Relat Cancer* **2009**, *16*, 895–906, doi:10.1677/ERC-09-0096.
116. Schmitz, K.J.; Helwig, J.; Bertram, S.; Sheu, S.Y.; Suttorp, A.C.; Seggewiß, J.; Willscher, E.; Walz, M.K.; Worm, K.; Schmid, K.W. Differential Expression of MicroRNA-675, MicroRNA-139-3p and MicroRNA-335 in Benign and Malignant Adrenocortical Tumours. **2011**, *64*, doi:10.1136/JCP.2010.085621.
117. Wu, Y.; Wang, W.; Hu, W.; Xu, W.; Xiao, G.; Nie, Q.; Ouyang, K.; Chen, S. MicroRNA-205 Suppresses the Growth of Adrenocortical Carcinoma SW-13 Cells via Targeting Bcl-2. *Oncol Rep* **2015**, *34*, 3104–3110, doi:10.3892/OR.2015.4295.
118. Lasda, E.; Parker, R. Circular RNAs: Diversity of Form and Function. *RNA* **2014**, *20*, 1829, doi:10.1261/RNA.047126.114.
119. Nigro, J.M.; Cho, K.R.; Fearon, E.R.; Kern, S.E.; Ruppert, J.M.; Oliner, J.D.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. Scrambled Exons. *Cell* **1991**, *64*, 607–613, doi:10.1016/0092-8674(91)90244-S.
120. Ebbesen, K.K.; Hansen, T.B.; Kjems, J. Insights into Circular RNA Biology. *RNA Biol* **2017**, *14*, 1035–1045, doi:10.1080/15476286.2016.1271524.
121. Kristensen, L.S.; Andersen, M.S.; Stagsted, L.V.W.; Ebbesen, K.K.; Hansen, T.B.; Kjems, J. The Biogenesis, Biology and Characterization of Circular RNAs. *Nat Rev Genet* **2019**, *20*, 675–691, doi:10.1038/s41576-019-0158-7.
122. Ashwal-Fluss, R.; Meyer, M.; Pamudurti, N.R.; Ivanov, A.; Bartok, O.; Hanan, M.; Evantal, N.; Memczak, S.; Rajewsky, N.; Kadener, S. CircRNA Biogenesis Competes with Pre-mRNA Splicing. *Mol Cell* **2014**, *56*, 55–66, doi:10.1016/J.MOLCEL.2014.08.019.

123. Jeck, W.R.; Sorrentino, J.A.; Wang, K.; Slevin, M.K.; Burd, C.E.; Liu, J.; Marzluff, W.F.; Sharpless, N.E. Circular RNAs Are Abundant, Conserved, and Associated with ALU Repeats. *RNA* **2013**, *19*, 141–157, doi:10.1261/RNA.035667.112.
124. Enuka, Y.; Lauriola, M.; Feldman, M.E.; Sas-Chen, A.; Ulitsky, I.; Yarden, Y. Circular RNAs Are Long-Lived and Display Only Minimal Early Alterations in Response to a Growth Factor. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, 1370–1383, doi:10.1093/NAR/GKV1367.
125. Rybak-Wolf, A.; Stottmeister, C.; Glažar, P.; Jens, M.; Pino, N.; Giusti, S.; Hanan, M.; Behm, M.; Bartok, O.; Ashwal-Fluss, R.; Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Mol Cell* **2015**, *58*, 870–885, doi:10.1016/J.MOLCEL.2015.03.027.
126. Alhasan, A.A.; Izuogu, O.G.; Al-Balool, H.H.; Steyn, J.S.; Evans, A.; Colzani, M.; Ghevaert, C.; Mountford, J.C.; Marenah, L.; Elliott, D.J.; Circular RNA Enrichment in Platelets Is a Signature of Transcriptome Degradation. *Blood* **2016**, *127*, e1–e11, doi:10.1182/BLOOD-2015-06-649434.
127. Holdt, L.M.; Kohlmaier, A.; Teupser, D. Molecular Roles and Function of Circular RNAs in Eukaryotic Cells. *75*, doi:10.1007/S00018-017-2688-5.
128. Memczak, S.; Jens, M.; Elefsinioti, A.; Torti, F.; Krueger, J.; Rybak, A.; Maier, L.; Mackowiak, S.D.; Gregersen, L.H.; Munschauer, M.; Circular RNAs Are a Large Class of Animal RNAs with Regulatory Potency. *Nature* **2013**, *495*, 333–338, doi:10.1038/NATURE11928.
129. Distributions of Exons and Introns in the Human Genome - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15217358/> (accessed on 5 August 2022).
130. Szabo, L.; Salzman, J. Detecting Circular RNAs: Bioinformatic and Experimental Challenges. *Nat Rev Genet* **2016**, *17*, 679–692, doi:10.1038/nrg.2016.114.
131. Guo, J.U.; Agarwal, V.; Guo, H.; Bartel, D.P. Expanded Identification and Characterization of Mammalian Circular RNAs. *Genome Biol* **2014**, *15*, 1–14, doi:10.1186/S13059-014-0409-Z/FIGURES/6.
132. Meng, S.; Zhou, H.; Feng, Z.; Xu, Z.; Tang, Y.; Li, P.; Wu, M. CircRNA: Functions and Properties of a Novel Potential Biomarker for Cancer. *Mol Cancer* **2017**, *16*, doi:10.1186/S12943-017-0663-2.
133. Kristensen, L.S.; Hansen, T.B.; Venø, M.T.; Kjems, J. Circular RNAs in Cancer:

- Opportunities and Challenges in the Field. *Oncogene* 2018 375 **2017**, 37, 555–565, doi:10.1038/onc.2017.361.
134. Fan, X.; Yang, Y.; Chen, C.; Wang, Z. Pervasive Translation of Circular RNAs Driven by Short IRES-like Elements. *Nat Commun* 2022 131 **2022**, 13, 1–15, doi:10.1038/s41467-022-31327-y.
135. Dong, R.; Zhang, X.O.; Zhang, Y.; Ma, X.K.; Chen, L.L.; Yang, L. CircRNA-Derived Pseudogenes. *Cell Res* **2016**, 26, 747, doi:10.1038/CR.2016.42.
136. Rupaimoole, R.; Calin, G.A.; Lopez-Berestein, G.; Sood, A.K. MiRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. *Cancer Discov* **2016**, 6, 235–246, doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0893.
137. Zheng, Q.; Bao, C.; Guo, W.; Li, S.; Chen, J.; Chen, B.; Luo, Y.; Lyu, D.; Li, Y.; Shi, G.; Circular RNA Profiling Reveals an Abundant CircHIPK3 That Regulates Cell Growth by Sponging Multiple MiRNAs. *Nat Commun* 2016 71 **2016**, 7, 1–13, doi:10.1038/ncomms11215.
138. Li, W.; Zhong, C.; Jiao, J.; Li, P.; Cui, B.; Ji, C.; Ma, D. Characterization of Hsa_circ_0004277 as a New Biomarker for Acute Myeloid Leukemia via Circular RNA Profile and Bioinformatics Analysis. *Int J Mol Sci* **2017**, 18, doi:10.3390/IJMS18030597.
139. Boeckel, J.N.; Jaé, N.; Heumüller, A.W.; Chen, W.; Boon, R.A.; Stellos, K.; Zeiher, A.M.; John, D.; Uchida, S.; Dimmeler, S. Identification and Characterization of Hypoxia-Regulated Endothelial Circular RNA. *Circ Res* **2015**, 117, 884–890, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306319.
140. Yang, W.; Du, W.W.; Li, X.; Yee, A.J.; Yang, B.B. Foxo3 Activity Promoted by Non-Coding Effects of Circular RNA and Foxo3 Pseudogene in the Inhibition of Tumor Growth and Angiogenesis. *Oncogene* **2016**, 35, 3919–3931, doi:10.1038/ONC.2015.460.
141. Hsiao, K.Y.; Lin, Y.C.; Gupta, S.K.; Chang, N.; Yen, L.; Sun, H.S.; Tsai, S.J. Noncoding Effects of Circular RNA CCDC66 Promote Colon Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Res* **2017**, 77, 2339–2350, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1883.
142. Hansen, T.B.; Kjems, J.; Damgaard, C.K. Circular RNA and MiR-7 in Cancer. *Cancer Res* **2013**, 73, 5609–5612, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1568.
143. Panda, A.C.; Grammatikakis, I.; Kim, K.M.; De, S.; Martindale, J.L.; Munk, R.; Yang,

- X.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. Identification of Senescence-Associated Circular RNAs (SAC-RNAs) Reveals Senescence Suppressor CircPVT1. *Nucleic Acids Res* **2017**, *45*, 4021–4035, doi:10.1093/NAR/GKW1201.
144. Chen, J.; Li, Y.; Zheng, Q.; Bao, C.; He, J.; Chen, B.; Lyu, D.; Zheng, B.; Xu, Y.; Long, Z.; Circular RNA Profile Identifies CircPVT1 as a Proliferative Factor and Prognostic Marker in Gastric Cancer. *Cancer Lett* **2017**, *388*, 208–219, doi:10.1016/J.CANLET.2016.12.006.
145. Faria, A.M.; Sbiera, S.; Ribeiro, T.C.; Soares, I.C.; Mariani, B.M.P.; Freire, D.S.; De Sousa, G.R.V.; Lerario, A.M.; Ronchi, C.L.; Deutschbein, T.; Expression of LIN28 and Its Regulatory MicroRNAs in Adult Adrenocortical Cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2015**, *82*, 481–488, doi:10.1111/CEN.12607.
146. Hansen, T.B.; Wiklund, E.D.; Bramsen, J.B.; Villadsen, S.B.; Statham, A.L.; Clark, S.J.; Kjems, J. MiRNA-Dependent Gene Silencing Involving Ago2-Mediated Cleavage of a Circular Antisense RNA. *EMBO J* **2011**, *30*, 4414–4422, doi:10.1038/EMBOJ.2011.359.
147. Turai, P.; Igaz, P. A Cirkuláris Ribonukleinsav És Tumorbilógiai Jelentősége. *Orv Hetil* **2020**, *161*, 403–412, doi:10.1556/650.2020.31678.
148. Abdelmohsen, K.; Panda, A.C.; Munk, R.; Grammatikakis, I.; Dudekula, D.B.; De, S.; Kim, J.; Noh, J.H.; Kim, K.M.; Martindale, J.L.; Identification of HuR Target Circular RNAs Uncovers Suppression of PABPN1 Translation by CircPABPN1. *RNA Biol* **2017**, *14*, 361–369, doi:10.1080/15476286.2017.1279788.
149. Turai, P.I.; Herold, Z.; Nyirő, G.; Borka, K.; Micsik, T.; Tóke, J.; Szücs, N.; Tóth, M.; Patócs, A.; Igaz, P. Tissue MiRNA Combinations for the Differential Diagnosis of Adrenocortical Carcinoma and Adenoma Established by Artificial Intelligence. *Cancers* **2022**, *Vol 14, Page 895* **2022**, *14*, 895, doi:10.3390/CANCERS14040895.
150. Lebedeva, S.; Jens, M.; Theil, K.; Schwanhäusser, B.; Selbach, M.; Landthaler, M.; Rajewsky, N. Transcriptome-Wide Analysis of Regulatory Interactions of the RNA-Binding Protein HuR. *Mol Cell* **2011**, *43*, 340–352, doi:10.1016/J.MOLCEL.2011.06.008.
151. Du, W.W.; Fang, L.; Yang, W.; Wu, N.; Awan, F.M.; Yang, Z.; Yang, B.B. Induction of Tumor Apoptosis through a Circular RNA Enhancing Foxo3 Activity. *Cell Death Differ* **2017**, *24*, 357–370, doi:10.1038/CDD.2016.133.

152. Li, Z.; Huang, C.; Bao, C.; Chen, L.; Lin, M.; Wang, X.; Zhong, G.; Yu, B.; Hu, W.; Dai, L.; Exon-Intron Circular RNAs Regulate Transcription in the Nucleus. *Nat Struct Mol Biol* **2015**, *22*, 256–264, doi:10.1038/NSMB.2959.
153. Pamudurti, N.R.; Bartok, O.; Jens, M.; Ashwal-Fluss, R.; Stottmeister, C.; Ruhe, L.; Hanan, M.; Wyler, E.; Perez-Hernandez, D.; Ramberger, E.; Translation of CircRNAs. *Mol Cell* **2017**, *66*, 9-21.e7, doi:10.1016/J.MOLCEL.2017.02.021.
154. Legnini, I.; Di Timoteo, G.; Rossi, F.; Morlando, M.; Briganti, F.; Sthandier, O.; Fatica, A.; Santini, T.; Andronache, A.; Wade, M.; Circ-ZNF609 Is a Circular RNA That Can Be Translated and Functions in Myogenesis. *Mol Cell* **2017**, *66*, 22-37.e9, doi:10.1016/J.MOLCEL.2017.02.017.
155. Jiang, T.; Xia, Y.; Lv, J.; Li, B.; Li, Y.; Wang, S.; Xuan, Z.; Xie, L.; Qiu, S.; He, Z.; A Novel Protein Encoded by CircMAPK1 Inhibits Progression of Gastric Cancer by Suppressing Activation of MAPK Signaling. *Mol Cancer* **2021**, *20*, 1–18, doi:10.1186/S12943-021-01358-Y/FIGURES/8.
156. Li, Y.; Chen, B.; Zhao, J.; Li, Q.; Chen, S.; Guo, T.; Li, Y.; Lai, H.; Chen, Z.; Meng, Z.; HNRNPL Circularizes ARHGAP35 to Produce an Oncogenic Protein. *Adv Sci* **2021**, *8*, 2001701, doi:10.1002/ADVS.202001701.
157. Gao, X.; Xia, X.; Li, F.; Zhang, M.; Zhou, H.; Wu, X.; Zhong, J.; Zhao, Z.; Zhao, K.; Liu, D.; Circular RNA-Encoded Oncogenic E-Cadherin Variant Promotes Glioblastoma Tumorigenicity through Activation of EGFR-STAT3 Signalling. *Nat Cell Biol* **2021**, *23*, 278–291, doi:10.1038/S41556-021-00639-4.
158. Tömböl, Z.; Szabó, P.M.; Molnár, V.; Wiener, Z.; Tölgyesi, G.; Horányi, J.; Riesz, P.; Reismann, P.; Patócs, A.; Likó, I.; Integrative Molecular Bioinformatics Study of Human Adrenocortical Tumors: MicroRNA, Tissue-Specific Target Prediction, and Pathway Analysis. *Endocr Relat Cancer* **2009**, *16*, 895–906, doi:10.1677/ERC-09-0096.
159. Szabó, D.R.; Luconi, M.; Szabó, P.M.; Tóth, M.; Szücs, N.; Horányi, J.; Nagy, Z.; Mannelli, M.; Patócs, A.; Rácz, K.; Analysis of Circulating MicroRNAs in Adrenocortical Tumors. *Lab Invest* **2014**, *94*, 331–339, doi:10.1038/LABINVEST.2013.148.
160. Feinmesser, M.; Benbassat, C.; Meiri, E.; Benjamin, H.; Lebanony, D.; Lebenthal, Y.; Vries, L. De; Drozd, T.; Spector, Y. Specific MicroRNAs Differentiate Adrenocortical Adenomas from Carcinomas and Correlate With Weiss Histopathologic System. *Appl*

- Immunohistochem Mol Morphol AIMM* **2015**, *23*, 522–531,
doi:10.1097/PAI.000000000000117.
161. Chabre, O.; Libé, R.; Assie, G.; Barreau, O.; Bertherat, J.; Bertagna, X.; Feige, J.J.; Cherradi, N. Serum MiR-483-5p and MiR-195 Are Predictive of Recurrence Risk in Adrenocortical Cancer Patients. *Endocr Relat Cancer* **2013**, *20*, 579–594,
doi:10.1530/ERC-13-0051.
162. Romero, D.G.; Plonczynski, M.W.; Carvajal, C.A.; Gomez-Sanchez, E.P.; Gomez-Sanchez, C.E. Microribonucleic Acid-21 Increases Aldosterone Secretion and Proliferation in H295R Human Adrenocortical Cells. *Endocrinology* **2008**, *149*, 2477–2483, doi:10.1210/EN.2007-1686.
163. Özata, D.M.; Caramuta, S.; Velázquez-Fernández, D.; Akçakaya, P.; Xie, H.; Höög, A.; Zedenius, J.; Bäckdahl, M.; Larsson, C.; Lui, W.O. The Role of MicroRNA Deregulation in the Pathogenesis of Adrenocortical Carcinoma. *Endocr Relat Cancer* **2011**, *18*, 643–655, doi:10.1530/ERC-11-0082.
164. Khafaei, M.; Rezaie, E.; Mohammadi, A.; Shahnazi Gerdehsang, P.; Ghavidel, S.; Kadkhoda, S.; Zorrieh Zahra, A.; Forouzanfar, N.; Arabameri, H.; Tavallaie, M. MiR-9: From Function to Therapeutic Potential in Cancer. *J Cell Physiol* **2019**, *234*, 14651–14665, doi:10.1002/JCP.28210.
165. Soon, P.S.H.; Tacon, L.J.; Gill, A.J.; Bambach, C.P.; Sywak, M.S.; Campbell, P.R.; Yeh, M.W.; Wong, S.G.; Clifton-Bligh, R.J.; Robinson, B.G.; MiR-195 and MiR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 7684–7692, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1587.
166. Salvianti, F.; Canu, L.; Poli, G.; Armignacco, R.; Scatena, C.; Cantini, G.; Di Franco, A.; Gelmini, S.; Ercolino, T.; Pazzagli, M.; New Insights in the Clinical and Translational Relevance of MiR483-5p in Adrenocortical Cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 65525–65533, doi:10.18632/ONCOTARGET.19118.
167. Decmann, A.; Bancos, I.; Khanna, A.; Thomas, M.A.; Turai, P.; Perge, P.; Pintér, J.Z.; Tóth, M.; Patócs, A.; Igaz, P. Comparison of Plasma and Urinary MicroRNA-483-5p for the Diagnosis of Adrenocortical Malignancy. *J Biotechnol* **2019**, *297*, 49–53, doi:10.1016/J.JBIOTECH.2019.03.017.
168. Zheng, S.; Cherniack, A.D.; Dewal, N.; Moffitt, R.A.; Danilova, L.; Murray, B.A.; Lerario, A.M.; Else, T.; Knijnenburg, T.A.; Ciriello, G.; Comprehensive Pan-Genomic

- Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 723–736, doi:10.1016/J.CCELL.2016.04.002.
169. Perge, P.; Butz, H.; Pezzani, R.; Bancos, I.; Nagy, Z.; Pálóczi, K.; Nyíró, G.; Decmann, Á.; Pap, E.; Luconi, M.; Evaluation and Diagnostic Potential of Circulating Extracellular Vesicle-Associated MicroRNAs in Adrenocortical Tumors. *Sci Rep* **2017**, *7*, doi:10.1038/S41598-017-05777-0.
170. Veronese, A.; Lupini, L.; Consiglio, J.; Visone, R.; Ferracin, M.; Fornari, F.; Zanesi, N.; Alder, H.; D’Elia, G.; Gramantieri, L.; Oncogenic Role of MiR-483-3p at the IGF2/483 Locus. *Cancer Res* **2010**, *70*, 3140–3149, doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4456.
171. Duregon, E.; Rapa, I.; Votta, A.; Giorcelli, J.; Daffara, F.; Terzolo, M.; Scagliotti, G. V.; Volante, M.; Papotti, M. MicroRNA Expression Patterns in Adrenocortical Carcinoma Variants and Clinical Pathologic Correlations. *Hum Pathol* **2014**, *45*, 1555–1562, doi:10.1016/J.HUMPATH.2014.04.005.
172. Koperski, L.; Kotlarek, M.; Swierniak, M.; Kolanowska, M.; Kubiak, A.; Górnicka, B.; Jazdzewski, K.; Wójcicka, A. Next-Generation Sequencing Reveals MicroRNA Markers of Adrenocortical Tumors Malignancy. *Oncotarget* **2017**, *8*, 49191–49200, doi:10.18632/ONCOTARGET.16788.
173. Adrenocortical Carcinoma: Clinical and Laboratory Observations - PubMed Available online: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10679640/> (accessed on 5 August 2022).
174. Goh, G.; Scholl, U.I.; Healy, J.M.; Choi, M.; Prasad, M.L.; Nelson-Williams, C.; Kuntsman, J.W.; Korah, R.; Suttorp, A.C.; Dietrich, D.; Recurrent Activating Mutation in PRKACA in Cortisol-Producing Adrenal Tumors. *Nat Genet* **2014**, *46*, 613–617, doi:10.1038/NG.2956.
175. Kwok, G.T.Y.; Zhao, J.T.; Glover, A.R.; Gill, A.J.; Clifton-Bligh, R.; Robinson, B.G.; Ip, J.C.Y.; Sidhu, S.B. MicroRNA-431 as a Chemosensitizer and Potentiator of Drug Activity in Adrenocortical Carcinoma. *Oncologist* **2019**, *24*, e241–e250, doi:10.1634/THEONCOLOGIST.2018-0849.
176. Pereira, S.S.; Monteiro, M.P.; Antonini, S.R.; Pignatelli, D. Apoptosis Regulation in Adrenocortical Carcinoma. *Endocr Connect* **2019**, *8*, R91–R104, doi:10.1530/EC-19-0114.
177. Patterson, E.E.; Holloway, A.K.; Weng, J.; Fojo, T.; Kebebew, E. MicroRNA Profiling

- of Adrenocortical Tumors Reveals MiR-483 as a Marker of Malignancy. *Cancer* **2011**, *117*, 1630–1639, doi:10.1002/CNCR.25724.
178. Glover, A.R.; Zhao, J.T.; Gill, A.J.; Weiss, J.; Mugridge, N.; Kim, E.; Feeney, A.L.; Ip, J.C.; Reid, G.; Clarke, S.; MicroRNA-7 as a Tumor Suppressor and Novel Therapeutic for Adrenocortical Carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 36675–36688, doi:10.18632/ONCOTARGET.5383.
179. Liaw, A.; Wiener, M. Classification and Regression by RandomForest. **2002**, *2*.
180. Package “caret” Title Classification and Regression Training. **2022**.
181. Modern Applied Statistics with S | SpringerLink Available online: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-0-387-21706-2> (accessed on 5 August 2022).
182. Robin, X.; Turck, N.; Hainard, A.; Tiberti, N.; Lisacek, F.; Sanchez, J.C.; Müller, M. PROC: An Open-Source Package for R and S+ to Analyze and Compare ROC Curves. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, doi:10.1186/1471-2105-12-77.
183. Li, H.; Durbin, R. Fast and Accurate Short Read Alignment with Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760, doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTP324.
184. Zhang, X.O.; Dong, R.; Zhang, Y.; Zhang, J.L.; Luo, Z.; Zhang, J.; Chen, L.L.; Yang, L. Diverse Alternative Back-Splicing and Alternative Splicing Landscape of Circular RNAs. *Genome Res* **2016**, *26*, 1277–1287, doi:10.1101/GR.202895.115/-/DC1.
185. Gao, Y.; Zhang, J.; Zhao, F. Circular RNA Identification Based on Multiple Seed Matching. *Brief Bioinform* **2018**, *19*, 803–810, doi:10.1093/BIB/BBX014.
186. Zhou, C.; Molinie, B.; Daneshvar, K.; Pondick, J. V.; Wang, J.; Van Wittenberghe, N.; Xing, Y.; Giallourakis, C.C.; Mullen, A.C. Genome-Wide Maps of M6A CircRNAs Identify Widespread and Cell-Type-Specific Methylation Patterns That Are Distinct from MRNAs. *Cell Rep* **2017**, *20*, 2262–2276, doi:10.1016/J.CELREP.2017.08.027.
187. Aufiero, S.; Reckman, Y.J.; Tijssen, A.J.; Pinto, Y.M.; Creemers, E.E. CircRNAprofiler: An R-Based Computational Framework for the Downstream Analysis of Circular RNAs. *BMC Bioinformatics* **2020**, *21*, doi:10.1186/S12859-020-3500-3.
188. Chen, H.; Boutros, P.C. VennDiagram: A Package for the Generation of Highly-Customizable Venn and Euler Diagrams in R. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, 1–7,

doi:10.1186/1471-2105-12-35/TABLES/1.

189. Li, J.H.; Liu, S.; Zhou, H.; Qu, L.H.; Yang, J.H. StarBase v2.0: Decoding MiRNA-CeRNA, MiRNA-NcRNA and Protein-RNA Interaction Networks from Large-Scale CLIP-Seq Data. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, doi:10.1093/NAR/GKT1248.
190. Turai, P.I.; Nyiró, G.; Borka, K.; Micsik, T.; Likó, I.; Patócs, A.; Igaz, P. Exploratory Circular RNA Profiling in Adrenocortical Tumors. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, doi:10.3390/CANCERS14174313.
191. Bavelloni, A.; Ramazzotti, G.; Poli, A.; Piazzzi, M.; Focaccia, E.; Blalock, W.; Faenza, I. MiRNA-210: A Current Overview. *Anticancer Res* **2017**, *37*, 6511–6521, doi:10.21873/ANTICANRES.12107.
192. Pouyssegur, J.; Dayan, F.; Mazure, N.M. Hypoxia Signalling in Cancer and Approaches to Enforce Tumour Regression. *Nature* **2006**, *441*, 437–443, doi:10.1038/NATURE04871.
193. Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 721–732, doi:10.1038/NRC1187.
194. Grosso, S.; Doyen, J.; Parks, S.K.; Bertero, T.; Paye, A.; Cardinaud, B.; Gounon, P.; Lacas-Gervais, S.; Noël, A.; Pouyssegur, J.; MiR-210 Promotes a Hypoxic Phenotype and Increases Radioresistance in Human Lung Cancer Cell Lines. *Cell Death Dis* **2013**, *4*, doi:10.1038/CDDIS.2013.71.
195. Ladeiro, Y.; Couchy, G.; Balabaud, C.; Bioulac-Sage, P.; Pelletier, L.; Rebouissou, S.; Zucman-Rossi, J. MicroRNA Profiling in Hepatocellular Tumors Is Associated with Clinical Features and Oncogene/Tumor Suppressor Gene Mutations. *Hepatology* **2008**, *47*, 1955–1963, doi:10.1002/HEP.22256.
196. Berthon, A.; Martinez, A.; Bertherat, J.; Val, P. Wnt/ β -Catenin Signalling in Adrenal Physiology and Tumour Development. *Mol Cell Endocrinol* **2012**, *351*, 87–95, doi:10.1016/J.MCE.2011.09.009.
197. Decmann, A.; Bancos, I.; Thomas, M.A.; Turai, P.; Perge, P.; Toth, M.; Patocs, A.; Igaz, P. Evaluating the Applicability of Urinary MiR-483-5p as a Non-Invasive Marker in Adrenocortical Cancer Patients. *Endocr Abstr* **2019**, *63*, doi:10.1530/ENDOABS.63.P18.
198. De Fraipont, F.; El Atifi, M.; Cherradi, N.; Moigne, G. Le; Defaye, G.; Houlgatte, R.; Bertherat, J.; Bertagna, X.; Plouin, P.F.; Baudin, E.; Gene Expression Profiling of

- Human Adrenocortical Tumors Using Complementary Deoxyribonucleic Acid Microarrays Identifies Several Candidate Genes as Markers of Malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* **2005**, *90*, 1819–1829, doi:10.1210/JC.2004-1075.
199. Soon, P.S.H.; Gill, A.J.; Benn, D.E.; Clarkson, A.; Robinson, B.G.; McDonald, K.L.; Sidhu, S.B. Microarray Gene Expression and Immunohistochemistry Analyses of Adrenocortical Tumors Identify IGF2 and Ki-67 as Useful in Differentiating Carcinomas from Adenomas. *Endocr Relat Cancer* **2009**, *16*, 573–583, doi:10.1677/ERC-08-0237.
 200. Agosta, C.; Laugier, J.; Guyon, L.; Denis, J.; Bertherat, J.; Libé, R.; Boisson, B.; Sturm, N.; Feige, J.J.; Chabre, O.; MiR-483-5p and MiR-139-5p Promote Aggressiveness by Targeting N-Myc Downstream-Regulated Gene Family Members in Adrenocortical Cancer. *Int J cancer* **2018**, *143*, 944–957, doi:10.1002/IJC.31363.
 201. Liu, K.; He, B.; Xu, J.; Li, Y.; Guo, C.; Cai, Q.; Wang, S. MiR-483-5p Targets MKNK1 to Suppress Wilms' Tumor Cell Proliferation and Apoptosis In Vitro and In Vivo. *Med Sci Monit* **2019**, *25*, 1459–1468, doi:10.12659/MSM.913005.
 202. Wang, L.; Shi, M.; Hou, S.; Ding, B.; Liu, L.; Ji, X.; Zhang, J.; Deng, Y. MiR-483-5p Suppresses the Proliferation of Glioma Cells via Directly Targeting ERK1. *FEBS Lett* **2012**, *586*, 1312–1317, doi:10.1016/J.FEBSLET.2012.03.035.
 203. Corbetta, S.; Vaira, V.; Guarnieri, V.; Scillitani, A.; Eller-Vainicher, C.; Ferrero, S.; Vicentini, L.; Chiodini, I.; Bisceglia, M.; Beck-Peccoz, P.; Differential Expression of MicroRNAs in Human Parathyroid Carcinomas Compared with Normal Parathyroid Tissue. *Endocr Relat Cancer* **2010**, *17*, 135–146, doi:10.1677/ERC-09-0134.
 204. Zhao, J.J.; Yang, J.; Lin, J.; Yao, N.; Zhu, Y.; Zheng, J.; Xu, J.; Cheng, J.Q.; Lin, J.Y.; Ma, X. Identification of MiRNAs Associated with Tumorigenesis of Retinoblastoma by MiRNA Microarray Analysis. *Childs Nerv Syst* **2009**, *25*, 13–20, doi:10.1007/S00381-008-0701-X.
 205. Sarkar, S.; Dey, B.K.; Dutta, A. MiR-322/424 and -503 Are Induced during Muscle Differentiation and Promote Cell Cycle Quiescence and Differentiation by down-Regulation of Cdc25A. *Mol Biol Cell* **2010**, *21*, 2138–2149, doi:10.1091/MBC.E10-01-0062.
 206. Forrest, A.R.R.; Kanamori-Katayama, M.; Tomaru, Y.; Lassmann, T.; Ninomiya, N.; Takahashi, Y.; De Hoon, M.J.L.; Kubosaki, A.; Kaiho, A.; Suzuki, M.; Induction of MicroRNAs, Mir-155, Mir-222, Mir-424 and Mir-503, Promotes Monocytic

- Differentiation through Combinatorial Regulation. *Leukemia* **2010**, *24*, 460–466, doi:10.1038/LEU.2009.246.
207. Vabalas, A.; Gowen, E.; Poliakoff, E.; Casson, A.J. Machine Learning Algorithm Validation with a Limited Sample Size. *PLoS One* **2019**, *14*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0224365.
208. Greene, J.; Baird, A.M.; Casey, O.; Brady, L.; Blackshields, G.; Lim, M.; O'Brien, O.; Gray, S.G.; McDermott, R.; Finn, S.P. Circular RNAs Are Differentially Expressed in Prostate Cancer and Are Potentially Associated with Resistance to Enzalutamide. *Sci Reports 2019 91* **2019**, *9*, 1–11, doi:10.1038/s41598-019-47189-2.
209. Greene, J.; Baird, A.M.; Lim, M.; Flynn, J.; McNevin, C.; Brady, L.; Sheils, O.; Gray, S.G.; McDermott, R.; Finn, S.P. Differential CircRNA Expression Signatures May Serve as Potential Novel Biomarkers in Prostate Cancer. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 344, doi:10.3389/FCELL.2021.605686/BIBTEX.
210. Sun, Q.; Li, X.; Xu, M.; Zhang, L.; Zuo, H.; Xin, Y.; Zhang, L.; Gong, P. Differential Expression and Bioinformatics Analysis of CircRNA in Non-Small Cell Lung Cancer. *Front Genet* **2020**, *11*, 586814, doi:10.3389/FGENE.2020.586814.
211. Jahani, S.; Nazeri, E.; Majidzadeh-A, K.; Jahani, M.; Esmaeili, R. Circular RNA; a New Biomarker for Breast Cancer: A Systematic Review. *J Cell Physiol* **2020**, *235*, 5501–5510, doi:10.1002/JCP.29558.
212. Lei, B.; Tian, Z.; Fan, W.; Ni, B. Circular RNA: A Novel Biomarker and Therapeutic Target for Human Cancers. *Int J Med Sci* **2019**, *16*, 292, doi:10.7150/IJMS.28047.
213. Zhang, Z.; Yang, T.; Xiao, J. Circular RNAs: Promising Biomarkers for Human Diseases. *EBioMedicine* **2018**, *34*, 267–274, doi:10.1016/J.EBIOM.2018.07.036.
214. Verduci, L.; Tarcitano, E.; Strano, S.; Yarden, Y.; Blandino, G. CircRNAs: Role in Human Diseases and Potential Use as Biomarkers. *Cell Death Dis 2021 125* **2021**, *12*, 1–12, doi:10.1038/s41419-021-03743-3.
215. Wang, S.; Zhang, K.; Tan, S.; Xin, J.; Yuan, Q.; Xu, H.; Xu, X.; Liang, Q.; Christiani, D.C.; Wang, M.; Circular RNAs in Body Fluids as Cancer Biomarkers: The New Frontier of Liquid Biopsies. *Mol Cancer* **2021**, *20*, 1–10, doi:10.1186/S12943-020-01298-Z/FIGURES/2.
216. Li, W.; Liu, R.; Wei, D.; Zhang, W.; Zhang, H.; Huang, W.; Hao, L. Circular RNA Circ-

- CCAC1 Facilitates Adrenocortical Carcinoma Cell Proliferation, Migration, and Invasion through Regulating the MiR-514a-5p/C22orf46 Axis. *Biomed Res Int* **2020**, *2020*, doi:10.1155/2020/3501451.
217. Belmihoub, I.; Silvera, S.; Sibony, M.; Dousset, B.; Legmann, P.; Bertagna, X.; Bertherat, J.; Assié, G. From Benign Adrenal Incidentaloma to Adrenocortical Carcinoma: An Exceptional Random Event. *Eur J Endocrinol* **2017**, *176*, K15–K19, doi:10.1530/EJE-17-0037.
218. Kohli, H.S.; Manthri, S.; Jain, S.; Kashyap, R.; Chen, S.; Koritala, T.; Tekin, A.; Adhikari, R.; Tirupathi, R.; Barbaryan, A.; An Adrenocortical Carcinoma Evolving After Nine Years of Latency From a Small Adrenal Incidentaloma. *Cureus* **2021**, *13*, doi:10.7759/CUREUS.16851.
219. Rebielak, M.E.; Wolf, M.R.; Jordan, R.; Oxenberg, J.C. Adrenocortical Carcinoma Arising from an Adrenal Adenoma in a Young Adult Female. *J Surg Case Reports* **2019**, *2019*, 1–2, doi:10.1093/JSCR/RJZ200.
220. Lerario, A.M.; Mohan, D.R.; Hammer, G.D.; Hammer, D. Update on Biology and Genomics of Adrenocortical Carcinomas: Rationale for Emerging Therapies. *Endocr Rev* **2022**, *109*, doi:10.1210/ENDREV/BNAC012.
221. Levine, S.S.; Weiss, A.; Erdjument-Bromage, H.; Shao, Z.; Tempst, P.; Kingston, R.E. The Core of the Polycomb Repressive Complex Is Compositionally and Functionally Conserved in Flies and Humans. *Mol Cell Biol* **2002**, *22*, 6070, doi:10.1128/MCB.22.17.6070-6078.2002.
222. Iwata, S.; Takenobu, H.; Kageyama, H.; Koseki, H.; Ishii, T.; Nakazawa, A.; Tatezaki, S. ichiro; Nakagawara, A.; Kamijo, T. Polycomb Group Molecule PHC3 Regulates Polycomb Complex Composition and Prognosis of Osteosarcoma. *Cancer Sci* **2010**, *101*, 1646–1652, doi:10.1111/J.1349-7006.2010.01586.X.
223. Xia, S.; Feng, J.; Lei, L.; Hu, J.; Xia, L.; Wang, J.; Xiang, Y.; Liu, L.; Zhong, S.; Han, L.; Comprehensive Characterization of Tissue-Specific Circular RNAs in the Human and Mouse Genomes. *Brief Bioinform* **2017**, *18*, 984–992, doi:10.1093/BIB/BBW081.
224. Soon, P.S.H.; Tacon, L.J.; Gill, A.J.; Bambach, C.P.; Sywak, M.S.; Campbell, P.R.; Yeh, M.W.; Wong, S.G.; Clifton-Bligh, R.J.; Robinson, B.G.; MiR-195 and MiR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 7684–7692, doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-1587/347526/P/MIR-195-AND-

MIR-483-5P-IDENTIFIED-AS-PREDICTORS-OF.

225. Zhong, X.; Li, N.; Liang, S.; Huang, Q.; Coukos, G.; Zhang, L. Identification of MicroRNAs Regulating Reprogramming Factor LIN28 in Embryonic Stem Cells and Cancer Cells. *J Biol Chem* **2010**, *285*, 41961–41971, doi:10.1074/JBC.M110.169607/ATTACHMENT/C59E7F7B-83C7-487B-AD5F-85760C646F2A/MMC1.ZIP.
226. Faria, A.M.; Sbiera, S.; Ribeiro, T.C.; Soares, I.C.; Mariani, B.M.P.; Freire, D.S.; De Sousa, G.R.V.; Lerario, A.M.; Ronchi, C.L.; Deutschbein, T.; Expression of LIN28 and Its Regulatory MicroRNAs in Adult Adrenocortical Cancer. *Clin Endocrinol (Oxf)* **2015**, *82*, 481–488, doi:10.1111/CEN.12607.
227. Tömböl, Z.; Szabó, P.M.; Molnár, V.; Wiener, Z.; Tölgyesi, G.; Horányi, J.; Riesz, P.; Reismann, P.; Patócs, A.; Likó, I.; Integrative Molecular Bioinformatics Study of Human Adrenocortical Tumors: MicroRNA, Tissue-Specific Target Prediction, and Pathway Analysis. *Endocr Relat Cancer* **2009**, *16*, 895–906, doi:10.1677/ERC-09-0096.
228. Cheng, A.M.; Byrom, M.W.; Shelton, J.; Ford, L.P. Antisense Inhibition of Human MiRNAs and Indications for an Involvement of MiRNA in Cell Growth and Apoptosis. *Nucleic Acids Res* **2005**, *33*, 1290–1297, doi:10.1093/NAR/GKI200.
229. Patterson, E.E.; Holloway, A.K.; Weng, J.; Fojo, T.; Kebebew, E. MicroRNA Profiling of Adrenocortical Tumors Reveals MiR-483 as a Marker of Malignancy. *Cancer* **2011**, *117*, 1630, doi:10.1002/CNCR.25724.
230. Feinmesser, M.; Benbassat, C.; Meiri, E.; Benjamin, H.; Lebanony, D.; Lebenthal, Y.; Vries, L. De; Drozd, T.; Spector, Y. Specific MicroRNAs Differentiate Adrenocortical Adenomas from Carcinomas and Correlate with Weiss Histopathologic System. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2015**, *23*, 522–531, doi:10.1097/PAI.000000000000117.
231. Zheng, S.; Cherniack, A.D.; Dewal, N.; Moffitt, R.A.; Danilova, L.; Murray, B.A.; Lerario, A.M.; Else, T.; Knijnenburg, T.A.; Ciriello, G.; Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 723, doi:10.1016/J.CCELL.2016.04.002.
232. Rochow, H.; Franz, A.; Jung, M.; Weickmann, S.; Ralla, B.; Kilic, E.; Stephan, C.; Fendler, A.; Jung, K. Instability of Circular RNAs in Clinical Tissue Samples Impairs Their Reliable Expression Analysis Using RT-QPCR: From the Myth of Their

Advantage as Biomarkers to Reality. *Theranostics* **2020**, *10*, 9268,
doi:10.7150/THNO.46341.

10. Saját publikációk jegyzéke

10.1. Az értekezés alapjául szolgáló saját közlemények jegyzéke

1. Turai PI, Herold Z, Nyirő G, Borka K, Micsik T, Tőke J, Szücs N, Tóth M, Patócs A, Igaz P (2022) Tissue miRNA Combinations for the Differential Diagnosis of Adrenocortical Carcinoma and Adenoma Established by Artificial Intelligence. *CANCERS* 14: 4 Paper: 895, 14 p.

Impakt faktor 2021: 6,575

2. Turai PI, Igaz P (2020) A cirkuláris ribonukleinsav és tumorbiológiai jelentősége. *ORVOSI HETILAP* 161: 11 pp. 403-412., 10 p.

Impakt faktor 2020: 0,540

3. Turai PI, Nyirő G, Borka K, Micsik T, Likó I, Patócs A, Igaz P (2022) Circular RNA profiling in adrenocortical tumors *CANCERS* 14: 17 Paper: 4313 , 14 p.

Impakt faktor 2021: 6,575

10.2. Az értekezéshez közvetlenül nem kapcsolódó saját közlemények jegyzéke

1. Igaz P, Toth G, Nagy P, Dezső K, Turai PI, Medvecz M, Wikonkal N, Huszty G, Piros L, Toth E, Bozsik A, Likó I, Patócs A, Butz H (2022) Surprising genetic and pathological findings in a patient with giant bilateral perirenal tumours: PEComas and mutations of PTCH1 in Gorlin-Goltz syndrome. *JOURNAL OF MEDICAL GENETICS*

Impakt faktor 2021: 5,954

2. Turai PI, Nyirő G, Butz H, Patócs A, Igaz P (2021) MicroRNAs, Long Non-Coding RNAs, and Circular RNAs: Potential Biomarkers and Therapeutic Targets in Pheochromocytoma/Paraganglioma. *CANCERS* 13: 7 Paper: 1522, 16 p.

Impakt faktor 2021: 6,575

3. Decmann A, Perge P, Turai PI, Patócs A, Igaz P (2020) Non-Coding RNAs in Adrenocortical Cancer: From Pathogenesis to Diagnosis. *CANCERS* 12: 2 Paper: 461, 17 p.

Impakt faktor 2020: 6,639

4. Tömböl Zs, Turai PI, Decmann A, Igaz P (2020) MicroRNAs and Adrenocortical Tumors: Where do we Stand on Primary Aldosteronism? *HORMONE AND METABOLIC RESEARCH* 52: 6 pp. 394-403., 10 p.

Impakt faktor 2020: 2,936

5. Decmann A, Nyirő G, Darvasi O, Turai PI, Bancos I, Pezzani R, Kraljevic I, Kastelan D, Parasiliti-Caprino M, Nirschl N, Daniel Heinric, Attila Patócs, Peter Igaz (2019) Analysis of circulating microRNAs in primary aldosteronism. *ENDOCRINE ABSTRACTS* 63 Paper: GP198
6. Decmann A, Nyirő G, Darvasi O, Turai PI, Bancos I, Kaur RJ, Pezzani R, Iacobone M, Kraljevic I, Kastelan D, Parasiliti-Caprino M, Maccario M, Nirschl N, Heinrich D, Reincke M, Patócs A, Igaz P (2019) Circulating miRNA Expression Profiling in Primary Aldosteronism. *FRONTIERS IN ENDOCRINOLOGY* 10 Paper: 739, 12 p.

Impakt faktor 2019: 3,644

7. Decmann A, Bancos I, Khanna A, Thomas MA, Turai PI; Perge P, Pintér JZs, Tóth M, Patócs A, Igaz P (2021) Comparison of plasma and urinary microRNA-483-5p for the diagnosis of adrenocortical malignancy. *JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY* 297 pp. 49-53., 5 p.

Impakt faktor 2022: 3,595

8. Decmann A, Bancos I, Thomas MA, Turai PI, Perge P, Toth M, Patocs A, Igaz P (2019) Evaluating the applicability of urinary *hsa-miR-483-5p* as a non-invasive marker in adrenocortical cancer patients ENDOCRINE ABSTRACTS 63 Paper: P18 (2019)

11. Köszönetnyilvánítás

Nagy hálával tartozom **Dr. Igaz Péter Professornak**, a Semmelweis Egyetem Belgyógyászati és Onkológiai Klinika, Endokrinológiai Tanszék vezetőjének, témavezetőmnek, hogy kutatócsoportjába fogadott és számomra kimagasló példát mutatva irányította munkásságomat.

Köszönöm **Dr. Patócs Attila Professornak**, az Endokrin Genetika Labor vezetőjének, hogy kutatásom számára helyet biztosított és kérdéseimre mindig nagy tudással és barátsággal válaszolt.

Köszönöm továbbá az Endokrin Genetika Labor, illetve a Szteroid és Izotóp Laboratórium minden dolgozójának mindig segítőkész hozzáállását. Különösképpen is **Dr. Nyirő Gábornak**, aki nagy tapasztalatával számtalanszor segítséget nyújtott a molekuláris biológiai módszertan alkalmazásában, továbbá **Dr. Herold Zoltán** biostatistikusnak és **Bató Emese** és **Dr. Likó István** bioinformatikusnak, **Dr. Borka Katalin** és **Dr. Micsik Tamás** patológusoknak, illetve **Krokker Lilla** és **Ag-Szabó Borbála** PhD-hallgatóknak.

Hálás vagyok a családomnak, páromnak, barátaimnak, hogy mindvégig türelmesen támogattak és kísérték utamon.