

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Tatjana V. Isailović

**KLINIČKE I EPIDEMIOLOŠKE KARAKTERISTIKE
SINDROMA MULTIPLE ENDOKRINE NEOPLAZIJE
TIP 1 I MEHANIZMI INAKTIVACIJE *MEN1* GENA U
TUMORSKIM TKIVIMA ENDOKRINO I VAN
ENDOKRINO SISTEMA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2018. god.

**UNIVERSITY OF BELGRADE
SCHOOL OF MEDICINE**

Tatjana V. Isailović

**CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL
CHARACTERISTICS OF MULTIPLE ENDOCRINE
NEOPLASIA TYPE 1 AND MECHANISMS OF
MEN1 GENE INACTIVATION IN ENDOCRINE AND
NON-ENDOCRINE TUMOR TISSUES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2018

Mentor:

Prof. dr Svetozar Damjanović

Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma

Klinički Centar Srbije, Beograd

Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije za ocenu završene doktorske disertacije:

1. Prof dr Milan Petakov

Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

2. Prof. dr Ivana Novaković

Institut za humanu genetiku

Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

3. Prof. dr Milica Medić Stojanoska

Klinika za endokrinologiju, Klinički centar Vojvodine

Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

Datum odbrane: ____/____ 2018. godine

U trenutku kada je doktorska disertacija završena, čast mi je da svojim saradnicima izrazim zahvalnost na bezrezervnoj i kolegijalnoj saradnji tokom njene izrade. Ova doktorska teza samo je mali, slobodnom oku vidljivi, deo višegodišnjeg, požrtvovanog rada brojnih posvećenih lekara i saradnika, koje bih ovom prilikom želela da pomenem.

Zahvaljujem se svom mentoru Profesoru dr Svetozaru Damjanoviću na nesebično prenesenom iskustvu i znanju, kao i stručnim savetima vezanim za izradu ove naučne teze.

Zahvaljujem se kolegama i prijateljima sa Odeljenja za endokrine tumore i nasledne kancerske sindrome: profesoru dr Đuri Macutu, profesoru dr Milanu Petakovu, dr Sanji Ognjanović, dr Bojani Popović, dr Ivani Božić Antić, dr Tamari Bogavac, dr Valentini Elezović Kovačević i dr Dušanu Iliću čiji je rad podjednako kao i autorov utkan u rezultate ove doktorske teze.

Zahvaljujem se svim koleginicama iz Laboratorije za genetsko ispitivanje, a posebno Ivani Milićević koja je analizirala postojanje MEN1 mutacija i gubitka heterozigotnosti, kao i Bojani Ilić na pomoći prilikom izolacije DNK.

Veliku zahvalnost dugujem profesorki Tatjani Pekmezović na pomoći prilikom obrade epidemioloških podataka i iskrenoj i bezrezervnoj podršci koja je u mnogome odredila postojanje ove doktorske teze.

Zahvalnost dugujem i svim medicinskim sestrama Odeljenja za endokrine tumore i nasledne kancerske sindrome,

mojim prijateljima i članovima porodice, ovde i tamo.

Mojim roditeljima

**KLINIČKE I EPIDEMIOLOŠKE KARAKTERISTIKE SINDROMA
MULTIPLE ENDOKRINE NEOPLAZIJE TIP 1 I MEHANIZMI
INAKTIVACIJE *MEN1* GENA U TUMORSKIM TKIVIMA ENDOKRINO I
VAN ENDOKRINO SISTEMA**

REZIME:

Multipla endokrina neoplazija tip 1 (MEN1) je nasledni tumorski sindrom koji se u svom klasičnom obliku karakteriše pojavom primarnog hiperparatiroidizma (PHPT), neuroendokrinih tumora pankreasa (pNET) i pituitarnih adenoma (PA). Gen odgovoran za nastanak sindroma jeste *MEN1* gen koji kodira protein menin, ubikvitarno eksprimirani protein koji učestvuje u brojnim ćelijskim procesima. Germinativna mutacija u *MEN1* genu i gubitak heterozigotnosti (GH) govore u prilog tumorsupresorske uloge menina u ovim tumorima. Uprkos ubikvitarnoj ekspresiji menina, za MEN1 je karakteristična predilekcija za endokrine organe. Ipak, ni svi endokrini organi nemaju istu predispoziciju za nastanak tumora. Iako je GH očekivani mehanizam inaktivacije, izvesni stepen heterogenosti među tumorima postoji i u pogledu inaktivacije gena. Razlozi ovakve tkivne specifičnosti nisu razjašnjeni.

Cilj studije: Cilj ove doktorske disertacije jeste da se ispituju kliničke, patohistološke i genetske karakteristike pacijenata sa MEN1 sindromom, kao i analiza inaktivacije *MEN1* gena u endokrinim i neendokrinim tumorima ovih pacijenata.

Materijal i metode: retrospektivno su analizirane genetičke, kliničke i patohistološke karakteristike 102 uzastopna pacijenta sa MEN1 sindromom (prosečna starost $41,1 \pm 18,7$ godina, od 3 do 72 godine, žene 68,6%, muškarci 31,4%). Direktno sekvenciranje i MLPA *MEN1* gena sprovedeno je kod svih pacijenata. Gubitak genskog materijala 11q13 ispitivan je na 30 različitih uzoraka MEN1 tumora od 10 ispitanika.

Rezultati: Analizirano je 75 indeksnih pacijenata i njihovih 27 srodnika koji su pripadali 31 različitoj porodici. PHPT je nađen kod 70/88, (79,5%), PA kod 59/88 (67%) a pNET kod 27/88 (30,7 %) pacijenata. Četrnaest (20,9%) pacijenata je bilo asimptomatsko. Mutacija u *MEN1* genu je nađena kod 53,3% (40/75) indeksnih slučajeva, odnosno 65,7% u ukupnom broju ispitanika. Većina pacijenata su bile žene,

ali je ovo naročito bilo izraženo među *MEN1*-negativnim pacijentima (86% odn. 59% kod nosilaca, $p < 0.01$). Opisano je 6 novootkrivenih mutacija (W220G, 941delG, 1088del7, 1184insA, 1473del10, 1602del17). Mutacije koje dovode do skraćanja proteina predvidele su pojavu pNET (OR=5.8, 95% CI 1.7 – 19.7%) i PHPT (OR= 4.3, 95% CI 1.5 – 12.4%). Nosioce mutacije u *MEN1* genu odlikovala je značajno ranija pojava svih klasičnih *MEN1* tumora, dok ni u jednog od *MEN1*-negativnih pacijenata nije dijagnostikovano više od 2 klasična *MEN1* tumora. PA su bili češći kod nosilaca mutacije (83% odn. 57%, $p < 0.01$), ali je akromegalija gotovo isključivo dijagnostikovana kod *MEN1*-negativnih pacijenata (41% vs. 3% kod nosilaca, $p < 0.001$). PNET su dominantno dijagnostikovani kod nosilaca mutacije (45% odn. 9% kod *MEN1*-negativnih, $p < 0.01$), a u većini slučajeva se radilo o multiplim tumorima (58%). PHPT je bio podjednako zastupljen u obe grupe, ali je postojanje poliglandularne bolesti bilo glavno obeležje nosilaca mutacije (77% odn. 0 kod *MEN1*-negativnih). Gubitak heterozigotnosti je nađen kod 100% pNET, uključujući i dva uzorka nezidioblastoze, 77,8% paratiroidnih lezija (adenoma i hiperplazije), ni u jednom od uzoraka pituitarnih adenoma (3/3) i bronhijalnih NET (2/2), u dva uzorka tumora nadbubrega, jednom uzorku adenokarcinoma dojke, NET timusa i papilarnom karcinomu štitnjače (100%).

Zaključak: zastupljenost mutacije u *MEN1* genu kod pacijenata sa *MEN1* sindromom kao i veliki broj novootkrivenih mutacija u skladu su sa podacima u literaturi. Pankreasni NET i PHPT su bili značajno češći kod pacijenata sa mutacijama koje dovode do skraćanja proteina. Pacijenti sa *MEN1* fenokopijom razlikuju se od genetski potvrđenog *MEN1* sindroma u nekoliko aspekata: postojanju najviše dva solitarna, koegzistetna tumora koji nastaju u kasnijm godinama života, značajno češćoj zastupljenosti žena, čestom pojavom akromegalije i retkom pojavom pNET. Različita zastupljenost GH među *MEN1* tumorima govori u prilog izražene tkivne specifičnosti i kod klasičnih *MEN1* tumora.

Ključne reči: *MEN1* sindrom, *MEN1* gen, *MEN1* fenokopija, novootkrivene mutacije, gubitak heterozigotnosti, endokrini i neendokrini tumori

Naučna oblast: medicina

Uža naučna oblast: Interna medicina - endokriologija

CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MULTIPLE ENDOCRINE NEOPLASIA TYPE 1 AND MECHANISMS OF *MEN1* GENE INACTIVATION IN ENDOCRINE AND NON-ENDOCRINE TUMOR TISSUES

Tatjana Isailović

ABSTRACT:

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) is an autosomal dominant heritable cancer syndrome characterized by the occurrence of primary hyperparathyroidism (PHPT), pancreatic neuroendocrine tumor (pNET) and pituitary adenoma (PA). The gene responsible for MEN1 is MEN1 tumor suppressor gene which encodes menin, ubiquitously expressed scaffold protein, influencing various cellular processes. The coexistence of heterozygous germline mutation in MEN1 gene, and loss of heterozygosity (LOH) in tumor tissues, demonstrates tumor suppressor role of menin in these tumors. Despite ubiquitous expression of menin, there is strong tissue specificity for endocrine tissue, but some endocrine organs are more frequently affected than other. Although LOH is an expected mechanism of gene inactivation in tumor-suppressor genes, there is heterogeneity in types of gene inactivation among tumors.

The aim of the study: The aim of this doctoral thesis is to examine clinical, pathohistological and genetic characteristics of patients with MEN1 syndrome, and to analyze mechanisms of inactivation of *MEN1* gene in endocrine and non-endocrine MEN1 tumors in these patients.

Materials and methods: Genetic, clinical and histopathological features were analyzed in a retrospective study of 102 consecutive patients with MEN1 (mean age $41,1 \pm 18,7$ years, range 3 – 72, females 68,6%, males 31,4%). Direct sequencing and MLPA of *MEN1* gene were performed in all patients. The presence of 11q13 loss was examined in 30 different MEN1 tumors belonging to 10 patients.

Results: We have analyzed 75 index cases and 27 family members, belonging to 31 different families. PHPT was found in 70/88, (79,5%), PA in 59/88 (67%) and pNET in 27/88 (30.7 %) patients. Fourteen (20,9%) patients were asymptomatic. Mutation in

MEN1 was found in 53,3% index cases (40/75), or 65,7% of all patients. Women were more prevalent among all patients, but this was especially pronounced in mutation-negative patients (86% vs. 59% in mutation-positive, $p<0.01$). Six novel point mutations (W220G, 941delG, 1088del7, 1184insA, 1473del10, 1602del17) were found. Truncating mutations predicted development of pNETs (OR=5.8, 95% CI 1.7 – 19.7%) and PHPT (OR= 4.3, 95% CI 1.5 – 12.4%). *MEN1* mutation carriers. All major MEN1 tumors appeared earlier in mutation carriers, and none of mutation-negative patients had more than two major MEN1-tumors. PA was more frequent in mutation-negative than in mutation-positive patients (83% vs. 57% respectively, $p<0.01$). Acromegaly appeared almost exclusively in mutation-negative patients (41% vs. 3% in mutation positive, $p<0.001$). PNETs predominantly appeared in mutation-positive patients (45% vs. 9% in mutation-negative, $p<0.01$), and majority of them were multiple (58%). PHPT was equally distributed, but the presence of polyglandular disease was a major feature of mutation carriers (77% vs. none in mutation-negative). The LOH was found in 100% of pNETs, including two samples of nesidioblastosis, 77, 8% of parathyroid lesions (both adenoma and hyperplasia), two samples of adrenal tumors, and one sample of adenocarcinoma of the breast, thymic NET, and papillary thyroid carcinoma (100%). None of PA (3/3) and brNETs (2/2) displayed loss of 11q13.

Conclusions: the frequency of *MEN1* mutation carriers does not differ from previously reported. Large number of novel mutations among MEN1 patients confirmed previously reported data. PNETs and PHPT were more frequent in patients with truncating mutations. MEN1 phenocopy differs from genetically confirmed MEN1 syndrome in several aspects: the presence of only two, solitary, coexisting major MEN1-tumors that develop later in life, marked female predominance, frequently occurring acromegaly, and rare pNETs. Different LOH rate among tumors suggest that the mechanism that drives LOH may be influenced by the tissue context.

Key words: MEN1 syndrome, MEN1 gene, MEN1 phenocopy, novel mutations, loss of heterozigosity, endocrine and nonendocrine tumors

Scientific area: medicine

Scientific field: internal medicine - endocrinology

1. UVOD	1
1.1. Definicija, istorijat i podela	1
1.2. Epidemiologija MEN1 sindroma	3
1.3. Klinička prezentacija	4
1.3.1. Primarni hiperparatiroidizam	4
1.3.2. Neuroendokrini tumori pankreasa i duodenuma	5
1.3.3. Tumori hipofize	7
1.3.4. Ostali tumori	8
1.3.4.1. Tumori nadbubrežnih žlezda	8
1.3.4.2. Neuroendokrini tumori bronha	9
1.3.4.3. Neuroendokrini tumori timusa	9
1.3.4.4. Neuroendokrini tumori želuca	10
1.3.5. Ne-endokrini tumori	10
1.3.6. MEN1 fenokopije	11
1.3.7. Dijagnoza i praćenje pacijenata sa MEN1 sindromom	12
1.3.8. Mortalitet	13
1.4. Genetika MEN1 sindroma	15
1.4.1. <i>MEN1</i> gen	15
1.4.2. Menin	17
1.4.2.1. Regulacija genske transkripcije	20
1.4.2.2. Regulacija signalnih puteva	22
1.4.3. Germinativne i somatske mutacije u <i>MEN1</i> genu	22
1.4.4. Genotip – fenotip korelacija	25
2. CILJEVI RADA	26
3. METODOLOGIJA ISTRAŽIVANJA	27
3.1. Ispitanici	27
3.2. Dijagnostički kriterijumi za MEN1 sindrom i klasifikacija MEN1 sindroma	27
3.3. Kriterijumi za dijagnozu MEN1 sindroma	28
3.4. Prevalencija MEN1 sindroma	29
3.5. Genotipizacija	29
3.6. Analiza tumorskih tkiva	30

3.6.1. Deparafinizacija tkiva	31
3.6.2. Izolacija DNK	31
3.6.3. Analiza gubitka heterozigotnosti 11q13 lokusa	32
3.7. Statistička analiza podataka	37
4. REZULTATI	38
4.1. Prevalencija MEN1 sindroma	38
4.2. Opšte karakteristike ispitanika	40
4.3. Fenotipske karakteristike	41
4.3.1. Primarni hiperparatiroidizam	41
4.3.2. Tumori hipofize	42
4.3.3. NET pankreasa i duodenuma	43
4.3.4. Ostali endokrini tumori	44
4.3.5. Atipični MEN1 sindrom	45
4.3.6. Tumori van endokrinog sistema	46
4.4. Kliničke i patohistološke razlike nosilaca mutacije i MEN1 fenokopija	48
4.5. Mortalitet i preživljavanje	54
4.6. Prediktori mutacije u <i>MEN1</i> genu	58
4.7. Mutacije u <i>MEN1</i> genu	59
4.8. Gubitak heterozigotnosti 11q13 lokusa u tumorima	64
5. DISKUSIJA	71
6. ZAKLJUČAK	83
7. LITERATURA	86

1.1. Definicija, istorijat i podela

Multipla endokrina neoplazija tip 1 ili (MEN1, OMIM 131100) je autozomno dominantni, nasledni tumorski sindrom koji se u svom klasičnom obliku karakteriše pojavom tumora paraštitastih žlezdi, neuroendokrinih tumora pankreasa i tumora hipofize.

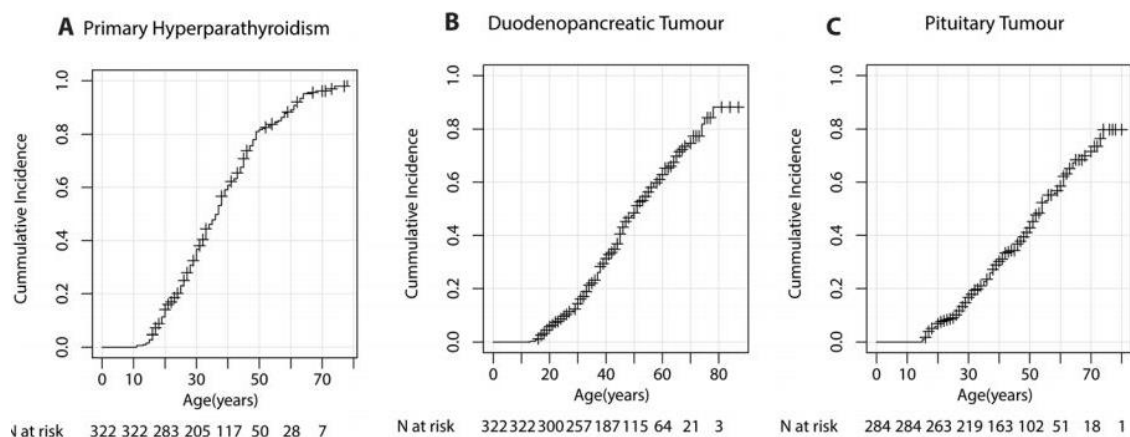
Prvi opis pacijenta sa MEN1 sindromom datira iz 1903. godine od strane Erdhajma, koji je opisao autopsijski nalaz kod pacijenta sa akromegalijom, pituitarnim adenomom i četiri uvećane paraštitaste žlezde [1]. Nasledna osnova sindroma predložena je 1939. godine prikazom dve sestre sa primarnim hiperparatiroidizmom i tumorima pankreasa, a prva geneaološka studija sprovedena je tek 1954. godine od strane Pola Vermera [2]. Vermer je kliničkom opservacijom više generacija američke porodice italijanskih emigranata sa tumorima hipofize, ulkusnom bolešću i hiperkalcemijom, došao do zaključka da se radi o naslednom oboljenju uzrokovanom mutacijom u genu koji se prenosi autozomno dominantno, da je bolest multiorganska i multifokalna zbog čega je mutirani gen ili prisutan u svakoj ćeliji datog organa ili odsutan iz svih, te da je aktivnost datog gena verovatno plejomorfna. [2].

Gen je tek 1988. godine lociran na dugom kraku 11 hromozoma, a 10 godina kasnije i pozicioniran unutar regiona od 2 Mb na 11q13, gotovo istovremeno od strane dve grupe istraživača [3,4]. Danas se zna da *MEN1* gen zauzima oko 10 Kb, sastoji se od 10 egzona i kodira protein menin od 610 amino-kiselina, a u prvoj dekadi od njegovog pronalaska identifikovano je više od 1300 različitih germinativnih i somatskih mutacija. [5] Poslednjih godina su genetskim inženjeringom razvijeni mišji modeli MEN1 na kojima se proučava tumorigeneza MEN1 tumora, metabolički putevi uključeni u inicijaciju i evoluciju ovih tumora, kao i potencijalni farmakološki agensi kojima bi se sprečio rast tumora [6-8].

MEN1 sindrom može biti familijaran i sporadičan. *Familijarni MEN1* sindrom odlikuje pojava kliničkih manifestacija MEN1 sindroma u više članova unutar nekoliko generacija jedne porodice i najčešće je vezan za postojanje tačkaste mutacije u *MEN1* genu. *Sporadični MEN1* sindrom se javlja kod osoba kod kojih je mutacija u *MEN1* genu nastala u ranim fazama embrionalnog razvoja (*de novo*) te je prisutna u svim ćelijskim linijama, ali nije nasleđena i nema obolelih predaka. Pacijenti kod kojih nije detektovana mutacija u *MEN1* genu ali imaju fenotip MEN1 sindroma predstavljaju *MEN1 fenokopije*.

1.2. Epidemiologija MEN1 sindroma

MEN1 sindrom sa prevalencijom od 1 na 30000 jedinki spada u retke bolesti [9]. Javlja se u 1-18% pacijenata sa primarnim hiperparatiroidizmom (PHPT), 16-38% sa gastrinomoma i u manje od 3% pacijenata sa pituitarnim tumorima [10]. Distribucija među polovima je jednaka, 40 : 60 u korist žena. Ne postoji rasna ili etnička predilekcija. Javlja se u svim uzrastnim grupama od prve do devete dekade života, ali je dijagnoza pre 10. godine retka [11]. Odlikuje ga izražena penetrantnost, tako da do pete dekade života oboli više od 98% nosilaca mutacije [11]. Najveću penetrantnost u oviru sindroma ima primarni hiperparatiroidizam, nešto manju neuroendokrini tumori pankreasa (pNET) a najmanju tumor hipofize. Penetrantnost PHPT je takva da gotovo svi pacijenti obole do svoje 60 godine [12] (slika 1).



Slika 1. Penetrantnost pojedinih komponenti MEN1 sindroma u odnosu na starost. Preuzeto iz De Lat i sar.[13]

Ekspresija MEN1, međutim, može značajno varirati u odnosu na geografski region, pa se izdvaja nekoliko fenotipskih varijanti. MEN1_{Burin} fenotip javlja se na Njufaulndendu i na Mauricijusu, a odlikuje se visokom zastupljenošću prolaktinoma (32%) i niskom učestalošću gastrinoma [14-16]. MEN1_{Tasmanian} fenotipska varijanta takođe odlikuje značajna zastupljenost prolaktinoma, koja u nekim porodičnim linijama ide i do 76% a karakteristična je za region Tasmanije [17]. MEN1_{Brazil} odlikuje slična zastupljenost prolaktinoma kao i MEN1_{Burin}, 29,6% [18].

1.3. Klinička prezentacija

MEN1 sindrom odlikuje pojava klasičnih MEN1 tumora, tzv. 3P tumora – tumor hipofize u 30-40% (engl. *Pituitary*), primarni hiperparatiroidizam - PHPT u 90% (engl. *Parathyroid*) i neuroendokrini tumor pankreasa - pNET (engl. *Pancreatic neuroendocrine tumor*) u 30-70% pacijenata. U manjem broju slučajeva mogu se javiti i ostali tumori: neuroendokrini tumori želuca (10%), bronha (2%), timusa (2%), tumori kore nadbubrega (40%) i feohromocitom (<1%) [10]. Za sindrom je patognomonična pojava određenih tumora van endokrinog sistema, poput angiofibroma (85%), kolagenoma (70%) i lipoma (30%). Sve je veći broj dokaza da menin učestvuje u onkogenezi i brojnih drugih tumora, poput adenokarcinoma dojke, meningeoma, ependimoma i dr [19-21].

1.3.1. Primarni hiperparatiroidizam

PHPT predstavlja najčešću manifestaciju MEN1 sindroma. Kao i kod sporadične forme bolesti (sPHPT) odlikuje ga povećana proliferacija paratiroidnih ćelija i Ca^{2+} -nezavisna hipersekrecija parathormona (PTH). Dijagnostikuje se dve ili tri decenije pre sporadične forme bolesti, najčešće u drugoj i trećoj dekadi života. Odlikuje ga gotovo potpuna penetrantnost, tako da skoro svi nosioci mutacije obole od PHPT do svoje 50. godine. [22] Retko se dijagnostikuje pre 10 godine, iako 75% MEN1 pacijenata dijagnostikovanih ispod 21 godine ima PHPT [23]. Za razliku od sPHPT koji se prezentuje solitarnim adenomom, PHPT u MEN1 odlikuje multiglandularna bolest. Bilo da se radi o hiperplaziji ili adenomima, zahvaćene su sve paratiroidne žlezde, istovremeno ili metahrono. Najčešće se radi o asimetričnoj, asinhronoj hiperplaziji, budući da je svaka paratiroidna žlezda monoklonalna lezija, a inaktivacija drugog alela ta koja diktira pojavu tumora u žlezdi [24]. U oko 20% slučajeva se sreće ektopična paratiroidna žlezda, najčešće locirana u predelu timusa, ređe u štitastoj žlezdi, prednjem medijastinumu ili perikardu.

Klinički bolest dugo ostaje asimptomatska ali se povećane vrednosti kalcijuma mogu detektovati već u 15. godini života. Nivo kalcijuma je najčešće lako povećan, dok je PTH neadekvatno normalan za nivo hiperkalcemije [25]. Nefrolitijaza je ređe

zastupljena nego u sPHPT ali je kost zahvaćena češće, tako da je koštana mineralna gustina niža nego kod pacijenata sa sPHPT. Za razliku od sPHPT gde češće oboljevaju žene, u MEN1 sindromu podjednako oboljevaju oba pola [26].

Optimalan hirurški pristup pacijentu je i dalje predmet diskusije. Trenutno se preporučuju subtotalna paratiroidektomija sa uklanjanjem 3 ili 3 i ½ žlezde ili totalna tiroidektomija sa autolognom implantacijom paratiroidnog tkiva u radijalni mišić nedominantne ruke. Zbog česte ektopije neophodna je intraoperativna vizualizacija sve četiri paratiroidne žlezde. Ekstenzivna hirurgija povećava rizik od primarnog hipoparatiroidizma, dok je manje ekstenzivna hirurgija skopčana sa češćim recidivom bolesti.

Nesuglasice postoje i oko trenutka u kojem se preporučuje hirurško lečenje. Prerana operacija može biti komplikovana činjenicom da su paraštitaste žlezde još uvek male pa je rizik od rekurentnog hiperparatiroidizma visok; kasna operacija znači i dugotrajniju bolest, te nastanak koštanih i renalnih komplikacija [27]. Prema važećem vodiču operišu se svi pacijenti sa simptomatskom bolešću (nefrokalciinoza ili hiperkalciurija > 400mg/dan, smanjenje GFR < 30ml/min, osteoporoza), asimptomatski pacijenti između 15. i 50. godine života i svi pacijenti sa Colinger-Elisonovim sindromom [28,29].

1.3.2. Neuroendokrini tumori pankreasa i duodenuma

Neuroendokrini tumori pankreasa i duodenuma (dpNET) čine drugu najčešću komponentu MEN1 sindroma. Najčešći su gastrinom, nefunkcijski tumori pankreasa (NF-pNET), insulinom, glukagonom i vipom. Opšte karakteristike svih dpNET u okviru MEN1 jesu rana pojava tumora sa pojavom do dve ili tri dekade pre sporadičnih dpNET, pojava multiplih, sinhronih ili metahronih tumora i izražen maligni potencijal [30].

Gastrinom je najčešći funkcijski pNET u okviru MEN1 sindroma (40%), dok se MEN1 sreće u 12-15% pacijenata sa gastrinomom. Klinički se odlikuje ekscisivnom produkcijom gastrina i pojavom multiplih ulceracija mukoze želuca i duodenuma

(Colinger – Elisonov sindrom). Za razliku od sporadičnih koji su većinom locirani u pankreasu, MEN1 gastrinomi su u 80% slučajeva locirani u prvoj i drugoj trećini duodenuma i gotovo su bez izuzetka multipli [31]. Nastaju iz multifokalnih, hiperplastičnih proliferacija gastrin-produkujućih ćelija, te su najčešće udruženi sa difuznim hiperplastičnim promjenama i multicentričnim mikrotumorima < 1cm duž duodenuma. Ove lezije nisu nađene kod sporadičnih gastrinoma [32]. I pored toga što se uglavnom radi o malim tumorima, odlikuje ih visok maligni potencijal – oko 50% MEN1 gastrinoma je već dalo udaljene metastaze u trenutku postavljanja dijagnoze. Metastaziraju najčešće u jetru i regionalne limfne noduse, a diseminacija u jetru predstavlja loš prognostički znak. Dijagnoza se postavlja ultrasonografski, CT/NMR-om, selektivnom arterijskom angiografijom, sintigrafijom somatostatinskih receptora i Ga⁶⁸ PET CT-om.

Insulinomi se viđaju u oko 10% pacijenata sa MEN1 sindromom [10]. Najčešće se radi o solitarnim ili multiplim tumorima nastalim na terenu hiperplazije endokrinih ostrvaca pankreasa i nezidioblastoze, iako i sporadični insulinomi mogu biti multipli u manje od 4%. Javlja se ranije od ostalih gastroentero-pankreatičnih NET (GEP NET), zbog čega je neophodno rano početi sa skriningom. Odlikuje ih ekscesivna produkcija insulina, a klinički se prezentuju Viplovom trijadom: hipoglikemija, simptomi hipoglikemije i prestanak simptoma po davanju glukoze. Maligni su u 5-20% pacijenata. Zlatni standard u dijagnostici insulinoma predstavlja 72h test gladovanja, a od dijagnostičkih metoda se koriste endoskopski ultrazvuk koji uspešno lokalizuje insulinom u 70-95% slučajeva, CT/NMR i Ga⁶⁸ PET CT. Zbog činjenice da se radi o malim tumorima često ih je teško lokalizovati, pa se radi selektivna angiografija sa intraarterijskom stimulacijom kalcijumom i venskim uzorkovanjem insulina, kojim se uspešno lokalizuje insulinom u više od 80% slučajeva [33].

Nefunkcijski pankreasni neuroendokrini tumori (NF-pNET) se javljaju u 20-30% MEN1 pacijenata, ali je uvođenje endoskopskog ultrazvuka u dijagnostiku povećalo broj dijagnostikovanih NF-pNET na 55% [10,34]. Mogu biti solitarni ili udruženi sa drugim funkcijskim i nefunkcijskim pNET. Prirodni tok NF-pNET je i dalje nepoznat. Najčešće su indolentni i sporog rasta, sa vremenom udvostručavanja od 5-10 godina. Ove karakteristike su dovele do zvaničnog stava koji je još uvek aktuelan u

važecem vodiču, da nefunkcijske tumore manje od 2cm ne treba operisati već pratiti [35]. Međutim, Donegan i sar. su u velikoj retrospektivnoj studiji pokazali da postojanje metastaza nije prediktovano veličinom tumora, te da je 24% pacijenata sa tumorima ispod 2cm umrlo tokom perioda praćenja, tako da sve veći broj centara zagovara stav rane hirurgije umesto pažljivog praćenja (engl. *watchfull waiting*) [36]. Nasuprot njima, Grupa za poručavanje endokrinih tumora (fra: *Groupe d'Etude des Tumeurs Endocrines, GTE*) je pokazala postojanje niske stope mortaliteta, ali je značajna progresija zabeležena u 36% pacijenata [37]. U velikoj studiji Gudea i sar. na više od 800 simptomatskih MEN1 pacijenata NF-pNET su nosili najveći rizik od smrti odmah iza karcinoida timusa i GVS (glukagonom/vipom/somatostatinom) tumora (HR = 3.43, 95% CI = 1.71-6.88) [38]. Klinički značaj ranog otkrivanja NF-pNET ogleda se u činjenici da predstavljaju najčešći uzrok smrti pacijenata sa MEN1 i imaju lošiju prognozu od ostalih, funkcijskih, pNET. Desetogodinje preživljavanje iznosi 23-62%. [39]

GVS tumori se javljaju u manjem broju pacijenata, ali se radi o tumorima sa izraženim malignim potencijalom. Prema studiji Gudea i sar. rizik od smrti (HR) za GVS tumore je iznosio 4,29, 95% CI = 1,54 – 11,93 [38]. Kao i kod drugih funkcijskih pNET zlatni standard lečenja je hirurgija, a u slučaju metastatske bolesti primena biološke (analozi somatostatina, interferon alfa), sistemske hemioterapije (temozolomid/kapecitabin, streptozotocin/5-FU protokoli), ciljane antitumorske terapije (everolimus, sunitinib) ili primenom radionuklidne terapije (engl. *peptide receptor radiotherapy, PRRT*), prema vodiču za lečenje pNET [40].

1.3.3. Tumori hipofize

Prevalencija tumora hipofize u MEN1 sindromu varira od 10 - 76%, dok se MEN1 sindrom javlja u 2-3% pacijenata sa pituitarnim tumorima [18,41,42]. Najčešće se radi o klinički funkcijskim, neretko plurihormonskim tumorima, pri čemu su najzastupljeniji prolaktinomi (25%) i somatotropinomi (10%). Prevalencija MEN1 sindroma među obolelima od prolaktinoma iznosi 14 % [42]. Češće se javljaju kod žena. Vreme dijagnoze je najčešće u četvrtoj dekadi života [43,44]. Kao i kod ostalih

familijarnih tumora češće se prezentuju kao makroadenomi, invazivniji su, agresivniji i rezistentniji na lečenje [45]. Iako nisu najčešći, tumori hipofize predstavljaju najraniju kliničku prezentaciju MEN1 sindroma, sa opisom ACTH-sekretujućeg makroadenoma kod petogodišnjeg dečaka [46,47]. Iako je za MEN1 tumore karakteristična multipla pojava, kod tumora hipofize to nije čest slučaj, mada su češće multipli nego kod pacijenata van MEN1 sindroma (4% vs. 0,1%). Maligni tumor hipofize opisan je samo kod jednog pacijenta [48].

Klinička slika zavisi od hormonske hipersekrecije i posledica lokalne invazivnosti tumora (hipopituitarizam, kompresija opštice hijazme, invazija kavernoznih sinusa, efekat mase) i u tom smislu se ne razliju od sporadičnih tumora hipofize [49]. Indikacije za operaciju su iste kao i kod sporadičnih tumora, s tim da treba imati na relativnu rezistenciju na somatostatinske receptore koja je ipak manje izražena nego kod nosilaca mutacije u *AIP* genu.

1.3.4. Ostali tumori

1.3.4.1. Tumori nadbubrežnih žlezda

Prevalencija tumora nadbubrežnih žlezda u MEN1 sindromu varira među studijama od 9 - 73% [50]. Najveća studija koja je ispitivala karakteristike adrenalnih lezija kod 146 MEN1 pacijenata pokazala je da MEN1 pacijenti oboljevaju ranije od pacijenata sa sporadičnim incidentalomima nadbubrega ($46,1 \pm 1,4$ odn. $55 \pm 0,9$ godina) ali da se ne razlikuju u pogledu distribucije polova ili veličine tumora [51]. U poređenju sa incidentalomima, MEN1 pacijenti su imali češći primarni aldosteronizam, manje feohromocitoma i više adrenokortikalnih karcinoma (13,8% u MEN1 grupi i 1,3% u grupi incidentaloma) [51]. I druge studije su pokazale značajnu zastupljenost karcinoma kore nadbubrega [52,50]. Gude i sar. su pokazali da tumor nadbubrega nije nosio povećan rizik od smrti, iako je dostigao graničnu statističku značajnost (HR = 1,72, 95% CI 0,97 – 3,06, p = 0,064), a tri pacijenta su umrli od adrenokortikalnog karcinoma [38]. Iako nema zvaničnog konsenzusa, zbog izraženije progresije tumora nadbubrega u adrenokortikalni karcinom, opšte je prihvaćena preporuka da se operišu sve adrenalne lezije veće od 3cm [53].

1.3.4.2. Neuroendokrini tumori bronha

Prevalencija brNET u MEN1 varira od 3 – 31% [54-56]. U studiji Lekomta i saradnika na 1023 MEN1 pacijenata brNET je dijagnostikovano kod 5% pacijenata, podjednako su bila zastupljena oba pola, a pored tipičnog i atipičnog karcinoida zabaleženi su i sitnoćelijski (SCNEC) i krupnoćelijski (LCNEC) karcinomi pluća. Bronhijalni NET nisu značajno menjali ukupno preživljavanje MEN1 pacijenata, ali su bili uzrok smrti u 47% umrlih [54]. U studiji de Lat i sar. zastupljenost brNET među MEN1 pacijentima je iznosila 13%, nije bilo razlike među polovima ali je vreme udvostručavanja veličine tumora bilo dvostruko veće kod muškaraca nego kod žena [56]. Često se vide multipli brNET koji se mogu javiti sinhrono ili metahrono, najčešće su nefunkcijski ali se retko mogu prezentovati atipičnim karcinoidnim sindromom ili ektopičnom ACTH sekrecijom ili sekrecijom hormona rasteinja. I pored toga što nastaju iz difuznih neuroendokrinih ćelija bronha, difuzna idiopatska neuroendokrini ćelijska hiperplazija je opisana samo u jednog pacijenta sa MEN1 [57].

1.3.4.3. Neuroendokrini tumori timusa

Neuroendokrini tumori timusa se javljaju u 1 – 8% MEN1 pacijenata [41,58]. Većina pacijenata je asimptomatska, a trenutak kada se razviju nespecifični simptomi, poput kašlja ili bola u grudima, najčešće označava uznapredovalu bolest. Nasuprot sporadičnim karcinoidima timusa gde je ektopična sekrecija česta pojava, MEN1-asocirani karcinoidi timusa su u većini slučajeva nefunkcijski a ektopična sekrecija je izuzetno retka. [59]. Gotovo isključivo se javljaju kod muškaraca i povezani su sa pušenjem [56]. Zbog česte ektopije paratiroidnih žlezda u regiji timusa ali i visokog mortaliteta zbog karcinoida timusa, predložena je cervikalna timektomija prilikom totalne odn. subtotalne paratiroidektomije. Međutim, izgleda da ova procedura ne eliminiše u potpunosti pojavu karcinoida timusa, te neki autori preporučuju i primenu preoperativne zračne terapije [60,58,26].

1.3.4.4. Neuroendokrini tumori želuca

Neuroendokrini tumori želuca, tumori ćelija nalik enterohromafinim ćelijama (engl. *enterochromaffine-like cells – ECLoma*) se javljaju u oko 7% pacijenata sa MEN1. U pitanju su ECLoma tip 2 tumori, koji se javljaju u Colinger-Elisonovom sindromu odn. gastrinomi. Lezije su najčešće male i multiple, imaju mali metastatski potencijal ali nešto veći nego kod ECLoma koji se javljaju na terenu hroničnog atrofičnog gastritisa (ECLoma tip 1) [61]. Za razliku od sporadičnog Colinger-Elisonovog sindroma gde su NET želuca retki, uprkos hipergastrinmiji, ECLoma se javljaju u 13-30% pacijenata sa Colinger-Elisonovim sindromom u MEN1 [62]. Optimalni terapijski pristup ovim pacijentima još uvek nije definisan. Prema ENETS (engl. *European Neuroendocrine Tumor Society*) preporukama polipe ispod 10mm treba pratiti, a veće od 10cm endoskopski resekovati. Ukoliko ima više od 6 polipa većih od 10mm, predlažu se bilo hirurška resekcija bilo antrektomija [63].

1.3.5. Ne-endokrini tumori

Tumori van endokrinog sistema, poput facijalnih angiofibroma, kolagenoma i lipoma predstavljaju značajnu komponentu MEN1 sindroma. Ovi tumori su estrogen-zavisni i ne mogu se sresti kod pacijenata pre puberteta. Kada se jave kod mlade osobe udruženi sa nekom drugom komponentom MEN1 sindroma, poput hiperkalcemije ili tumora hipofize, u 100% slučajeva potvrđuju dijagnozu MEN1 sindroma. I druge kutane lezije, poput multiplih gingivalnih papula i hipopigmentnih makula kože, mogu biti deo MEN1 sindroma [64]. Sve je veći broj opisa za sindrom netipičnih, neendokrinih tumora, poput meningeoma, ependimoma, lejomiona, adenokarcinoma dojke [20,21,19]. Gubitak heterozigotnosti - GH (engl. *loss of heterozygosity - LOH*) 11q13 u ovim tumorima pokazao je ulogu *MEN1* gena u onkogenezi ovih tumora i jednu opštu tumor-supresorsku ulogu menina, koja nije ograničena samo na neuroendokrini tkiva [21,65,66].

1.3.6. MEN1 fenokopije

Oko 10% pacijenata sa MEN1 sindromom nema mutaciju u *MEN1* genu [10]. Ovo je delom pripisano ograničenjima same metode detekcije (mutacije u netranslantiranim regionima, intronima, pormotoru, veliki genski rearanžmani), a delom mutacijama u drugim genima koje dovode do sindroma nalik MEN1 sindromu, kada govorimo o MEN1 fenokopijama ili MEN1-sličnom sindromu (engl. *MEN1-like syndrome*). Prvi takav gen bio je *cdkn1b* gen, otkriven 2006. godine na modelu miša koji je u isto vreme imao znake i MEN1 i MEN2 sindroma (MENX sindrom). Nedugo potom mutacija je pokazana i u homolognom *CDKN1B* genu pacijenta sa akromegalijom i PHPT, a sindrom je nazvan MEN4 [67]. *CDKN1B* (12p13) je tumor-supresorski gen koji kodira ciklin-zavisni kinazni inhibitor 1B ili p27Kip1, koji učestvuje u regulaciji ćelijskog ciklusa i procesima proliferacije, diferencijacije i apoptoze. Nishodna regulacija *CDKN1b* dovodi do nastanka brojnih neoplazmi.

Do momenta kada nastaje ova teza, MEN4 je dijagnostikovao u svega 19 pacijenata, bliža karakterizacija i preporuke za skrining i praćenje pacijenata još uvek ne postoje. Primarni hiperparatiroidizam je opisan kod svih pacijenata, tumor hipofize u oko 40% (HR, PRL, ACTH-sekretujući i nefunkcijski tumori), a opisano je i postojanje karcinoida bronha, neuroendokrinog karcinoma cerviksa, gastrinoma i tumora nadbubrežne žlezde [68,69].

I mutacije u drugim genima, poput mutacije u genu koji kodira aril hidrokarbonski receptor - interaktivni protein (AIP, engl. *aryl hydrocarbon receptor interacting protein*), kao i duplikacija *GPR101* odgovorna za nastanak akrogigantizma vezanog za X romozom (XLAG, engl. *X-linked acrogigantism*) mogu biti udružene sa *MEN1-like* sindromom [49,70]. Mutacije u genima za druge ciklin-zavisne kinaze, kao što su *CDKN2b* (p15), *CDKN2c* (p18) and *CDKN1a* (p21), takođe dovode do fenotipa sličnog MEN1 sindromu, ali su za sada otkrivene kod veoma malog broja pacijenata [71].

1.3.7. Dijagnoza i praćenje pacijenata sa MEN1 sindromom

Prema važećem vodiču za dijagnozu i lečenje pacijenata sa MEN1, multipla endokrina neoplazija tip 1 je definisana kliničkim, familijarnim i genetskim kriterijumima. Kliničke kriterijume čini postojanje dva ili više od MEN1-asociranih tumora: tumor hipofize, tumor paraštitastih žlezda i pankreasni neuroendokrini tumor, tzv. 3P tumori (engl. *Pituitary, Parathyroid, Pancreatic NET*). Familijarne kriterijume čini postojanje jednog MEN1-asociranog tumora i srodnika prvog stepena sa kliničkom dijagnozom MEN1. Genetske kriterijume za dijagnozu čini postojanje mutacije u MEN1 genu, uključujući i asimptomatske nosioce [28]. Genetskom ispitivanju podležu svi pacijenti koji ispunjavaju kliničke kriterijume za MEN1, dijagnoza multiplih adenoma paraštitastih žlezda pre 40. godine, rekurentni hiperparatiroidizam, gastrinom, multipli neuroendokrini tumori pankreasa u bilo kom uzrastu, kao i pacijenti sa atipičnim MEN1 [28]. Atipični MEN1 sindrom nije jasno definisan, čini ga udružena pojava klasičnog MEN1-asociranog tumora i nekog od tumora koji su netipični za sindrom, npr. primarni hiperparatiroidizam udružen sa tumorom nadburežne žlezde [28]. Ne postoje studije koje su ispitivale učestalost atipičnih formi među MEN1 pacijenata, niti učestalost mutacije MEN1 gena među atipičnim MEN1 pacijentima.

Biohemijski skrining za detekciju MEN1-asociranih tumora omogućava detekciju tumora 10 ili 20 godina pre nego što se bolest klinički manifestuje. Prema važećim kriterijumima skrining za određeni tumor počinje u godinama u kojim je dati tumor najranije otkriven, iako po nekim autorima skrining može početi i kasnije, u adolescenciji [28,72]. Rana dijagnoza omogućava raniji početak lečenja, iako ne postoje studije koje su eksplicitno pokazale da rana diagnostika dovodi do smanjenja ukunog mortaliteta MEN1 pacijenata [35]. Program skrininga za pacijente sa tipičnim MEN1 tumorima prikazan je u tabeli 1.

Tabela 1. Smernice za praćenje nosilaca mutacije u *MEN1* genu. Preuzeto iz Brandi i sar. [35]

Tumor	Starost na početku praćenja	Biohemijsko praćenje	Radiološko praćenje
PT žlezde	8 godina	Ca ²⁺ , PTH	nije potrebno
pNET			
Gastrinom	20 godina	Gastrin (± pH želuca)	Nije potrebno
Insulinom	5 godina	Glik. našte, insulin	Nije potrebno
Ostali NET	< 10. godine	Hromogranin A, PP, glucagon, VIP	NMR, CT ili EUZ godišnje
Hipofiza	5 godina	Prolaktin, IGF-1	NMR svake 3. godine
Nadbubreg	< 10. godine	Nije potrebno ukoliko nema kliničkih znakova i/ili je tumor > 1cm	NMR ili CT, godišnje
Bronh, timus	15 godina	Nije potrebno	CT ili NMR, godišnje ili svake 2. godine

PT – paratiroidne, PTH – paratiroidni hormon, pNET – pankreasni neuroendokrini tumor, NET – neuroendokrini tumor, PP – pankreasni polipeptid, VIP – vazointestinalni peptid, EUZ – endoskopski ultrazvuk

1.3.8. Mortalitet

Nekoliko studija je pokazalo da su MEN1 pacijenti u većem riziku za prevremenu smrt u odnosu na opštu populaciju ili njihove srodnike koji nisu nosioci mutacije [73,43,74]. De Lat i sar. su pokazali da se preživljavanje razlikuje i u odnosu na postojanje MEN1 mutacije, odn. da nosioci mutacije imaju manje preživljavanje od MEN1 fenokopija (73 godine (95%CI 69,5 – 76,5) kod mutiranih u odnosu na 87 godina (95%CI nije dostupan) kod nemutiranih MEN1 pacijenata, p=0,001) [13]. U

studiji Gudea i sar. je pokazano da najveći rizik od smrti imaju oboleli od karcinoida timusa, glukagonoma, somatostatina i vipoma, nefunkcijskog pNET i gastrinoma. Sa druge strane, tumori hipofize, insulinom i brNET nisu povećavali rizik od smrti [38] (tabela 2). U oko 60% pacijenata uzrok smrti je neposredno vezan za postojanje MEN1 sindroma, bilo da se radi o ulkusnoj bolesti, komplikacijama hiperkalcemije ili malignom neuroendokrinom tumoru, koji je poslednjih godina vodeći uzrok smrti u MEN1 pacijenata [74,43,73,13].

Tabela 2. Rizik od smrti u odnosu na pojedine MEN1 komponente. Podaci iz Gudea i sar. [38]

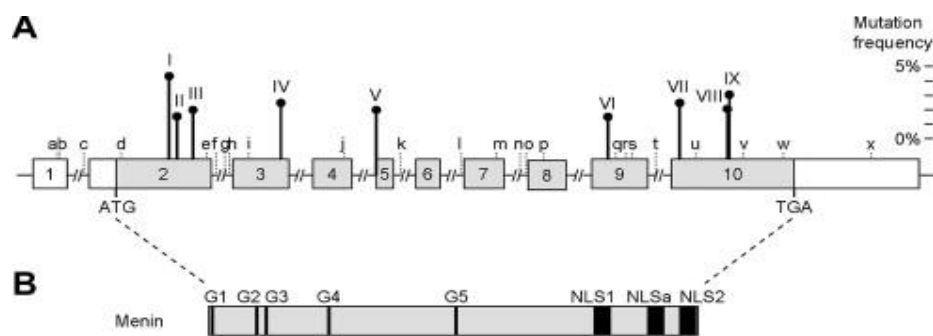
	Rizik	95% CI	P
Ž/M	0,46	0,28 – 0,76	0,003
Porodična anamneza	0,46	0,27 – 0,79	0,005
Period dijagnoze			
1980-1989. vs <1980.	0,33	0,18 – 0,60	<0,001
1990-1995. vs <1980	0,18	0,09 – 0,35	<0,001
>1996 vs. <1980.	0,17	0,08 – 0,40	<0,001
NET timusa	4,64	1,73 – 12,41	0,002
GVS	4,29	1,54 – 11,93	0,005
NF-pNET	3,43	1,71 – 6,88	0,001
Gastrinom	1,89	1,09 – 3,25	0,022
Tu nadbubrega	1,72	0,97 – 3,06	0,064
BrNET	1,55	0,64 – 3,77	0,332
Tu hipofize	1,17	0,72 – 1,90	0,536
Insulinom	0,85	0,39 – 1,86	0,679

Tabela prikazuje rezultate najveće studije o uzrocima smrti u MEN1, sprovedene na 758 MEN1 pacijenata. Pozitivna porodična anamneza za MEN1, ženski pol i dijagnoza MEN1 nakon 1980. godine su asocirani sa manjim rizikom od smrti. Postojanje pankreasnog NET, bez obzira na tip tumora, je bilo povezano sa povećanim rizikom od smrti, naročito ako se radi o tumorima iz GVS grupe. Najveći, pojedinačni rizik od smrti bio je povezan sa postojanjem karcinoida timusa. Tumori nadbubrega nisu povećavali rizik od smrti, iako je karcinom kore nadbubrega bio uzrok smrti kod tri pacijenta [38]; GVS – glukagonom, vipom, somatostatinom, NF-pNET – nefunkcijski NET pankreasa, brNET – bronhijalni NET;

1.4. Genetika MEN1 sindroma

1.4.1. *MEN1* gen

MEN1 gen je lociran na hromozomu 11q13, prostire se na nešto više od 9 Kb i sastoji se od 10 egzona, od kojih egzoni 2 - 10 kodiraju protein menin, sastavljen od 610 aminokiselina [3,4] (slika 2).



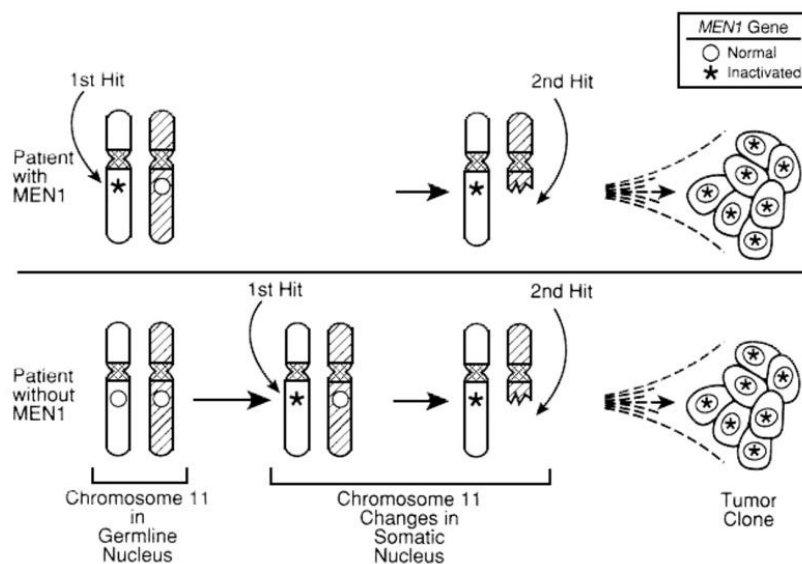
A: *MEN1* gen se sastoji od 10 egzona koji se prostiru na preko 9kb genomske DNK, i kodira protein od 610 aminokiselina. Kodirajući region od 2 – 10 egzona označen je tamnijim kvadratićima. ATG i TGA predstavljaju početni odnosno stop kodon. Egzon 1 i 5' deo egzona 2, kao i 3' deo egzona 10 su nekodirajući delovi gena. Prikazane su pozicije 9 najčešćih mutacija (I – IX) čije su učestalosti prikazane vertikalnim linijama i skalom sa desne strane. B: Prikazan je menin i tri nuklearna lokalizaciona signala (NLS) kao i pet guanozin-trifosfataza (GTPaze) G1-G5.

Slika 2. Shematski prikaz strukturne organizacije *MEN1* gena i menina. Preuzeto iz Taker i sar.[10]

Menin je ubikvitarno eksprimiran, predominantno jedarni, skafoldni protein, premda se u deobnim ćelijama nalazi uglavnom u citoplazmi [75]. Menin intereaguje sa brojnim proteinima (Jun-D, NK-kB, Smad3, RPA2, FANCD2 itd.) i na taj način učestvuje u procesima regulacije transkripcije, stabilnosti genoma, diferencijacije i proliferacije ćelija [5]. Tumor-supresorska uloga menina u tumorima endokrinog

sistema pokazana je postojanjem heterozigotne germinativne mutacije u *MEN1* genu i gubitkom heterozigotnosti (*GH*) u tumorskom tkivu [76].

U skladu sa Knudsonovom hipotezom tumorigeneze o dva pogotka, inaktivacija *MEN1* gena je dvostepena (slika 3). Prva inaktivacija je najčešće tačkasta, heterozigotna mutacija koja se događa u germinativnim ćelijama. Drugi pogodak se dešava u endokrinim tkivima i dovodi do inaktivacije preostale, normalne kopije *MEN1* gena, što za posledicu ima gubitak funkcije menina i formiranje tumora [41].



Svaka kopija hromozoma 11 nasleđena je od drugog roditelja (obeleženo različito). Prvi pogodak je obično tačkasta mutacija, nasleđena od jednog roditelja, kojom je inaktivirana jedna kopija *MEN1* gena (heterozigotno stanje). Pošto se dešava u germinativnoj ćeliji, prisutna je u svakoj ćeliji u organizmu. Drugi pogodak se dešava u postzigotnim, somatskim ćelijama i obično zahvata veći deo (delecije) druge, normalne kopije hromozoma 11 (gubitak heterozigotnog stanja). Time je inaktivirana i druga, normalna kopija *MEN1* gena, što dovodi do promocije proliferacije tumorskog klona [41].

Slika 3. Dvostepena inaktivacija *MEN1* gena. Preuzeto iz Marx S i sar.[41]

1.4.2. Menin

Menin spada u visoko konzervirane proteine tokom evolucije i nađen je u nekoliko različitih vrsta, od Drozofile do ljudi [77]. Spada u ubikvitarno eksprimirane proteine, sa dominantnom lokalizacijom u jedru. Menin poseduje dva glavna nuklearna lokalizaciona signala ((NLS 1 i 2) i treći, akscesorni NLS-3, koji se nalaze u C-terminalnoj četvrtini proteina (slika 1). Zanimljivo je da nijedna tačkasta mutacija ne pogađa sekvence NLS1-2, dok mutacije koje dovode do skraćanja proteina (besmislene, engl. *nonsense* i mutacije pomaka, engl. *frameshift*) pogađaju bar jedan od NLS-a [78]. Ukoliko dođe do skraćanja proteina i gubitka jednog od dva glavna NLS-a, izostaje jedarna lokalizacija menina, protein ostaje u citoplazmi i podleže degradaciji i inaktivaciji [79].

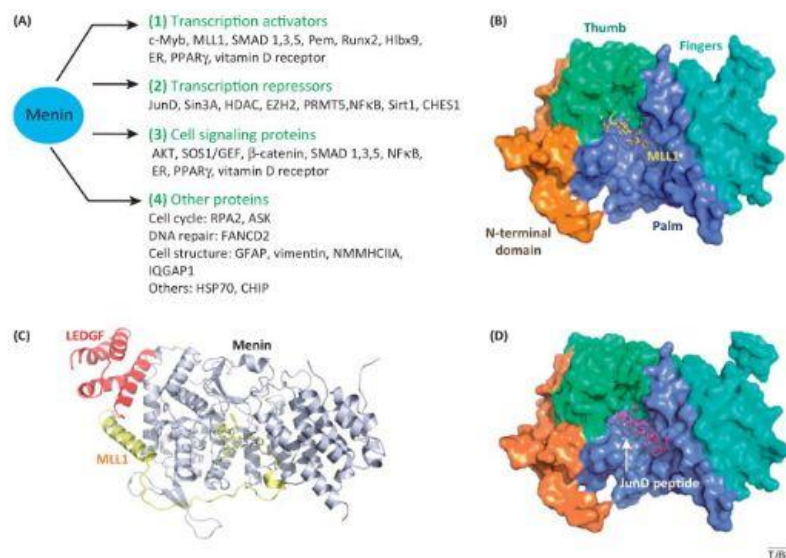
Uloga menina je po svemu sudeći visoko tkivno zavisna, ponekad sa potpuno suprotnim efektima u različitim tkivima: u endokrinim organima je poznat kao tumor-supresorski protein a u isto vreme ima važnu ulogu u promociji leukemogeneze [80]. Analizom amino-kiselinske sekvence menina nije nađena homologija ni sa jednim poznatim proteinskim motivom i sekvencom, tako da je većina podataka o funkciji menina dobijena *in vitro* studijama. Zbog toga su veliki naponi uloženi u proučavanje odnosa menina sa njegovim brojnim proteinskim partnerima: 1) aktivatorima transkripcije - c-Myb, *Protein-energy malnutrition* (Pem) i *runt-related transcription factor 2* (Runx2), *mixed lineage leukemia proteins* (MML1-2), histon H3 lizin 4 (H3K4) metiltransferaza; 2) represorima transkripcije - Jun-D, NF-kB, homeobox HB9 Hlxb9, histon deacetilaza 1/2 (HDAC1/2), histon deacetilaza Sirt1, histon H3 lizin 27 metiltransferaza EZH2, protein arginin metiltransferaza 5 (PRMT5); 3) ćelijskim signalnim proteinima - SMAD, β -katenin, nuklearni receptori poput estrogenog receptora i PPAR γ , Ras-aktivirajući protein SOS1 i brojnim drugim proteinima koji učestvuju u regulaciji popravke DNK i integriteta ćelije (Tabela 3).

Tabela 3. Proteini koji intereaguju sa meninom i njihove funkcije. Preuzeto iz Agarwal SK [81]

Protein	Funkcija	Literatura
Jedarni		
<i>Faktori modifikacije hromatina</i>		
DAXX	Regulacija transkripcije	Feng (2017)
HDACs, mSIN3A	Regulacija transkripcije	Kim (2003)
LEDGF	Regulacija transkripcije	Yokoyama & Cleary (2008)
MLL complex (H3K4me3) (KMT2A/MLL1 or MT2B/MLL2; ASH2L, hDPY30, HCF-2, RBBP5, RPB2/RNA-Pol-II, WDR5)	Regulacija transkripcije	Hughes (2004) Yokoyama (2005)
PRMT5	Regulacija transkripcije	Gurung (2013)
SuV39H1 (H3K9me3)	Regulacija transkripcije	Yang (2013)
<i>Faktori transkripcije</i>		
DNMT1 (Hedgehog put)	Regulacija transkripcije	Cheng (2016)
FBP1	Regulacija transkripcije	Zaman (2014)
FOXA2	Regulacija transkripcije	Bonnaivion (2017)
HLXB9/MNX1	Regulacija transkripcije	Shi (2013)
JUND	Regulacija transkripcije	Agarwal (1999) Gobl (1999)
c-MYB	Regulacija transkripcije	Jin (2010)
c-MYC	Regulacija transkripcije	Bres (2009)
NFκB - p50, p52, p65	Regulacija transkripcije	Heppner (2001)
Nuklearni receptori (AR, ERα, LXRα, PPARα, PPARγ, RXR, VDR)	Regulacija transkripcije	Cheng (2011, 2015) Dreijerink et al. (2006, 2009), Malik (2015)
PEM	Regulacija transkripcije	Lemmens (2001)

RUNX2 (BMP2 signaling)	Regulacija transkripcije	Sowa (2004)
SMADs (TGF β signaling) (SMAD1, SMAD3, SMAD5)	Regulacija transkripcije	Sowa (2004)
SIRT1	Regulacija transkripcije	Gang (2013)
SON	Regulacija transkripcije	Kim (2016)
TCF3, TCF4, β -Catenin (Wnt signaling)	Regulacija transkripcije	Cao (2009)
<i>Faktori inicijacije transkripcije ili elongacije</i>		
RNA-Pol-II izoforme (pSer5 and pSer2)	Regulacija transkripcije	Francis (2011)
SKIP (HIV-1 Tat:P-TEFb transkripcija)	Regulacija transkripcije	Bres (2009)
<i>Faktori koji nisu asocirani sa transkripcijom</i>		
ASK	Replikacija i popravka DNK	Schnepp (2004)
CHES1	Replikacija i popravka DNK	Busygina (2006)
FANCD2	Replikacija i popravka DNK	Jin (2003)
RPA2	Replikacija i popravka DNK	Sukhodolets (2003)
ARS2	MicroRNA biogeneza	Gurung (2014)
CHIP	Degradacija proteina	Yaguchi (2004)
Citoplazmatski		
AKT1	Signalni putevi	Wang (2011)
FOXO1	Signalni putevi	Wuescher (2011)
NM23 β	Signalni putevi	Yaguchi (2002)
GRB2, RAS, SOS1	Signalni putevi	Wu (2012)
GFAP	Deoba/Adhezija/Motilitet	Lopez-Egido (2002)
IQGAP1	Deoba/Adhezija/Motilitet	Yan (2009)
NMMHC-IIA	Deoba/Adhezija/Motilitet	Obungu (2003)
VIMENTIN	Deoba/Adhezija/Motilitet	Lopez-Egido (2002)

Funkcionalna karakterizacija menina je značano napredovala otkrićem trodimenzionalnog (3D) modela strukture *Nematostella* i humanog menina (Banka proteinskih podataka broj 3RE2 i 3U84) [82] (slika 4). Kristalna struktura menina ima izgled zakrivljene leve šake i sastoji se od četiri domena: dugački β -hairpin, N-terminalni domen, transglutaminaza—sličan domen koji predstavlja palac, heliksni domen koji sadrži tri tetraikopeptidna motiva i predstavlja dlan i C-terminalni domen koji prestavlja prst. “Dlan” formira duboki džep koji je ključan za vezivanje MML1 ali i drugih intereagujućih proteina, poput Jun Di kompleksa AP-1.



Slika 4. 3D model kristalne strukture menina. Preuzeto iz Huang J i sar [82].

1.4.2.1. Regulacija genske transkripcije

Transkripcija predstavlja ključni korak u prenošenju informacija sa DNK do proteina i grubo rečeno predstavlja prepisivanje DNK u RNK. Menin kao skafoldni protein (engl. *scaffold*, prev. skela) reguliše transkripciju ciljnih gena tako što se udružuje sa brojnim transkripcionim faktorima, poput JunD, NF- κ B, Smad3 i dr. U zavisnosti od tkiva i proteina sa kojima inreaguje, menin istovremeno učestvuje kako u procesima supresije tako i u procesima aktivacije transkripcije gena.

Menin ushodno reguliše ekspresiju ciklin-zavisnih kinaznih inhibitora (CDKI). CDKI imaju inhibitorski efekat na sve članove CDK koji učestvuju u napredovanju ćelijskog ciklusa (p21Cip1/Waf1, p27Kip1, p57Kip2) kao i CDK4 i CDK6 molekule (p15Ink4b, p16Ink4a, p18Ink4c i p19nk4d) [83]. Ushodnom regulacijom odn. transkripcijom p18 i p27 proteina, menin redukuje proliferaciju beta ćelija i na taj način sprečava nastanak insulinoma. Ovaj proces se bar deličimčno odvija preko MML1 proteina, procesima hromatinske modifikacije. MML1 ima histon metiltransferaznu aktivnost pošto poseduje domen za metilaciju lizina 4 na histonu H3 (H3K4), koji potom regrutuje specifični vezujući protein hromatin-remodelujućeg kompleksa sa ATP-aznom funkcijom, koji dalje aktivira transkripciju gena remodeliranjem hromafina. Ovo je pokazano i u *in vivo* modelu *Men1 knockout* miša, gde je genetskom ablacijom H3K4 demetilaze postignuta je redukcija formiranja insulinoma [84].

Sa druge strane, interesantna je i neočekivana uloga menina u procesu leukemogeneze gde menin kroz iste procese ima pro-okogeni efekat. Izostanak metilacije H3K4 pod dejstvom menina dovodi do istovremene metilacije H3K27 koja je epigenetski marker genske represije [85]. Translokacija *MML1* gena (11q23 hromozom) sa drugim genima koji kodiraju transkripcione faktore dovodi do ekspresije MML1 fuzionih proteina (MML1-FP) koji aktiviraju ekspresiju *HOX* gena i dovode do nastanka leukemije [86].

Represija transkripcije gena se odvija kroz interakciju menina sa brojnim faktorima, poput JunD, NF- κ B i sl. JunD reguliše gensku ekspresiju u odgovoru na različite stimulse, citokine i faktore rasta. Menin inhibiše JunD tako što blokira njegovu fosforilaciju posredstvom c-Jun N-terminalne kinaze. JunD se vezuje za promotor pro-proliferativnih gena, pa prisustvo ili odsustvo menina kontroliše da li JunD inhibira odn. aktivira ekspresiju ovih gena [87].

Menin direktno deluje i sa p65 subjedinicom NF- κ B i vrši represiju Nf- κ B-zavisne transkripcije. NF- κ B su glavni regulatori ćelijskog odgovora na različite tipove stresa. NF- κ B se u nestimulisanoj ćeliji nalazi u citoplazmi u neaktivnom obliku, vezan za inhibitorni molekul I- κ B. Pod dejstvom faktora rasta, citokina, jonizujućeg zračenja, I- κ B se fosforiliše, oslobađa se NF- κ B iz kompleksa i translocira u jedro. Menin u ćelijama hepatocelularnog karcinoma inhibiše NF- κ B tako što preko histon deacetilaze

Sirt1 deacetiliše lizin 310 (K310) subjedinice p65 i na taj način onemogućuje njegovo osobađanje iz inhibitornog kompleksa [88].

Menin smanjuje ekspresiju pojedinih gena i posttranskripciono, ushodnom regulacijom mikro RNK koje redukuju translaciju proteina i stabilnost ciljne RNK. Menin indukuje ekspresiju mikro RNK-26a (miR-26a) koja smanjuje ekspresiju SMAD 1, signalnog efektor koštanog morfogenetskog proteina BMP (negl. *bone morphogenic protein*), čijom redukcijom dolazi do smanjenja osteoblasne diferencijacije i smanjenja koštane gustine [89].

1.4.2.2. Regulacija signalnih puteva

Menin učestvuje u brojnim signalnim putevima, poput Wnt puta u procesu proliferacije pankreasnih β ćelija, delom povećavajući ekspresiju Pitx2 proteina a delom i preko transkripcionog faktora β -katenina. Menin intereaguje i sa nekoliko nuklearnih receptorskih transkripcionih faktora, uključujući estrogini receptor ($ER\alpha$) i PPAR γ . Direktnom, hormon-zavisnom interakcijom menin pojačava aktivnost $ER\alpha$ na MCF7 ćelijama karcinoma dojke, a njegova ekspresija koreliše sa lošijom prognozom ER-pozitivnih kardinoma dojke lečenih tamoksifenom [90]. Menin inhibiše ERK-zavisnu fosforilaciju u Ras signalnom putu blokadom SOS1 i GRB2 proteina, čime se inhibiše ERK aktivacija važna u migraciji ćelija karcinoma pluća [91]. Supresijom Akt-1-zavisne proliferacije menin učestuje u procesima apoptoze u neendokrinim i endokrinim ćelijama. Direktnom interakcijom sa PRMT5, negativnim regulatorom genske transkripcije, menin učestvuje u represiji pro-proliferativnog Hedžhog signalnog puta važnog za nastanak karcinoma pankreasa[92]. Farmakološka inhibicija Hh signalnog puta značajno redukuje proliferaciju ćelija insulinoma.

1.4.3. Germinativne i somatske mutacije u *MEN1* genu

Od 1997. godine kada je mapiran, opisano je više od 1800 različitih germinativnih (85%) i somatskih (15%) mutacija u *MEN1* genu [93]. Mutacije su raspoređene duž celog kodirajućeg dela *MEN1* gena, bez grupisanja odn. jasnih “hot-spotova” u

određenim delovima gena. Ne postoji očigledna genotip – fenotip korelacija kao u slučaju mutacija u *RET* protoonkogenu [10]. Dve velike studije su analizirale germinativne mutacije u *MEN1* genu prijavljene u periodu od 1997 – 2007. i od 2007-2015. godine. Ukupno je identifikovano 576 jedinstvenih germinativnih mutacija u *MEN1* genu [5,94]. Više od 75% ovih mutacija je inaktivirajuće, što je u skladu sa tumor-supresorskom ulogom *MEN1* gena [78]. Najveći broj mutacija dovodi do skraćenja proteina usled postojanja besmislenih mutacija – engl. *nonsense* (14%) i mutacija koje menjaju okvir čitanja – engl. *frame shift* (42%), delecija egzona prilikom splajsovanja – engl. *splice site deletions* (10,5%) i većih delecija (2,5%). Pogrešne tačkaste mutacije, engl. *missense* (25,5%) i pojedinačne unutar-okvirne amino-kiselinske delecije ili insercije - engl. *in frame del/ins* (5,5%) ne dovode do očigledne inaktivacije menina, ali mogu dovesti do zamene ili brisanja značajnih amino-kiselina. Za njihovu konačnu karakterizaciju kao benigne ili patološke promene, neophodno je dodatno ispitivanje i praćenje [94]. Iako su mutacije prisutne u kompletnom kodirajućem regionu *MEN1* gena, može se primetiti određeni obrazac rasporeda različitih tipova mutacija. Pogrešne *missense* i male *in-frame del/ins* su najfrekventnije unutar evoluciono konzerviranih regiona menina. *Nonsense* mutacije su takođe neravnomerno raspoređene, ali ih ima i u evoluciono nekonzerviranim regionima, što se može objasniti nejednakim rasporedom potencijalnih mesta gde se zamenom jednog nukleotida mogu formirati stop kodoni. Mutacije pomaka imaju ujednačeniji raspored, zabeležene su u repetitivnim delovima sekvence [95].

Do sada je identifikovano 7 polimorfizama koje čine sinonimne ili nesinonimne amino-kiselinske zamene u kodirajućim deovima gena. Njihovo poznavanje je važno kako bi se adekvatno okarakterisale kao nepatogene genske varijante koje ne dovode do nastanka *MEN1* sindroma (tabela 4). Ipak, neke od nesinonimnih zamena, poput R171Q, su primećene i kod pacijenata sa sporadičnim i familijarnim *MEN1* sindromom, te je preporuka da se pacijenti sa ovom genskom alteracijom pažljivo prate [96].

Za razliku od germinativnih mutacija gde je prva inaktivacija alela germinativna a druga somatska, sporadični tumori imaju dve somatske inaktivacije *MEN1* gena. Somatske mutacije u *MEN1* genu su prijavljene u sledećim tumorima: glukagonom (60%), VIPom (57%), NF-pNET (44%), gastrinom (38%), brNET (35%), adenom

paraštitaste žlezde (35%), lipom (28%), insulinom (2-19%), angiofibrom (10%), tumori adenohipofize (3,5%) i adrenokortikalni tumori (2%) [81]. Kao i kod germativnih mutacija, ne postoje hot-spotovi niti genotip-enotip korelacija a tipovi mutacija se javljaju sa istom učestalošću kao i u familijarnom MEN1.

Tabela 4. Polimorfizmi MEN1 gena. Preuzeto iz Agarwal SK i sar [81]

Lokalizacija hg19 (dbSNP)	Zamena kodona	Posledica	Tip	Učestalost kraćeg alela (%)
1 11:64577552 (rs371192390)	G/T CTG/CTT	p.Leu10Leu	Sinonimna	0.07
2 11:64577147 (rs61736636)	C/T AGC/AGT	p.Ser145Ser	Sinonimna	2.9
3 11:64575505 (rs607969)	G/A CGG/CAG	p.Arg171Gln	Nesinonimna	1.2
4 11:64572602 (rs2071313)	C/T GAC/GAT	p.Asp418Asp	Sinonimna	39.3
5 11:64572560 G/A(rs138770431)	CTG/CTA	p.Leu432Leu	Sinonimna	0.1
6 11:64572557 (rs540012)	C/T CAC/CAT	p.His433His	Sinonimna	0.72
7 11:64572018 (rs2959656)	G/A GCA/ACA	p.Ala541Thr	Nesinonimna	6.2

Učestalost kraćeg alela dobijena iz baze podataka Exome aggregation Consortium-a (ExAC), koja pokriva 60,706 nesrodnih ispitanika koji su sekvencirani u okviru različitih populacionih genetskih studija.

1.4.4. Genotip – fenotip korelacija

Iako je u više velikih studija pokazano da ne postoji korelacija između tipa ili lokalizacije mutacija unutar gena (genotip) sa kliničkom prezentacijom (fenotip), postoje izuzeci. Izgleda da su mutacije koje skraćuju protein (*frame shift*, *splice site*, *nonsense*) povezane sa većom incidencijom karcinoida timusa i malignih NET [97,98]. U studiji Lima i sar. mutacije koje skraćuju protein su pokazane u više od 90% pacijenata sa karcinoidom timusa. Nađeno je da mutacije koje skraćuju protein a locirane su u N-terminalnom i C- terminalnom regionu (egzoni 2, 9 ili 10) odlikuje znatno veća učestalost malignih pNET i znatno kraći period bez bolesti (engl. *disease free survival*), što ide u prilog agresivnijeg tumora. [15]Nađena je i veća učestalost mutacija koje skraćuju protein kod pacijenta sa MEN1_{Burin} fenotipskom varijantom, koja se odlikuje visokom učestalošću prolaktinoma i niskom učestalošću gastrinoma [15,16]. Velika tasmanijska MEN1 porodica koja broji više od 160 članova ima istu c.446-3C>G mutaciju u MEN1 genu; jedna porodična linija se prezentuje prolaktinom u više od 50% članova, dok je PRL u drugoj porodičnoj liniji redak [17]. Ovakav nalaz upućuje na moguće dodatne genetske faktore koji mogu modifikovati MEN1 ekspresiju. Postojanje MEN1 mutacije pokazano je kod 42 porodice sa izolovanim PHPT a čak 38% pacijenata je imalo *missens* mutacije, koje ne bi trebalo da dovedu do skraćenog odn. inaktivnog proteina. Ovaj broj je značajno veći nego zastupljenost *missens* mutacija među MEN1 pacijentima [5]. Konačno, u velikoj GTE studiji na 806 MEN1 pacijenata je pokazano da su mutacije koje zahvataju JunD intereagujući deo proteina povezane sa većim rizikom od smrti (HR = 1.88: 95%-CI = 1.15-3.07). Uprkos navedenim primerima, direktna veza genotipa i fenotipa na ovako velikom broju pacijenata nije nađena [6].

1. Ustanoviti prevalenciju MEN1 sindroma u našoj populaciji
2. Analiza kliničkih karakteristika pacijenata sa MEN1 sindromom
3. Analiza mutacija u *MEN1* genu konstitutivne DNK i korelacija sa kliničkom slikom
4. Analiza mehanizma inaktivacije *MEN1* gena u MEN1 tumorima endokrinog i van endokrinog sistema.

Studija se sastoji iz dva dela. Prvi deo studije je retrospektivna studija kohorte, kojom su analizirane kliničke, patohistološke i genetske karakteristike pacijenata sa MEN1 sindromom. Drugi deo studije je eksperimentalni, obavljen na uzorcima tumorskih tkiva pacijenata sa MEN1 sindromom dobijenih iz parafinskih kalupa nakon operacije tumora. Studija je odobrena od strane Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta u Beogradu i svi ispitanici su potpisali pismeni pristanak za učešće u studiji.

3.1. Ispitanici

Analizirana je medicinska dokumentacija 102 uzastopna pacijenta lečena u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije, na Odeljenju za endokrine tumore i nasledne kancerske sindrome u periodu od 2004. do 2017. godine. Pacijenti su uključeni u analizu ukoliko su zadovoljavali bar jedan od navedenih kriterijuma:

- 1) postojanje dva ili više od tri klasična MEN1 tumora – PHPT, pNET ili tumor hipofize
- 2) postojanje multiplih adenoma paraštitastih žlezdi dijagnostikovanih pre 40. godine
- 3) rekurentni hiperparatiroidizam
- 4) postojanje gastrinoma ili multiplih pNET dijagnostikovanih u bilo kom uzrastu
- 5) postojanje jednog od klasičnih MEN1 tumora udruženog sa drugim NET bilo koje lokalizacije (atipični MEN1)

3.2. Dijagnostički kriterijumi za MEN1 sindrom i klasifikacija MEN1 sindroma

Dijagnoza MEN1 je postavljena na osnovu jednog od tri važeća kriterijuma za dijagnozu MEN1 sindroma:

- 1) *klinički* – postojanje dva ili više klasičnih MEN1 tumora (PHPT, pNET, tumor hipofize)

- 2) *familijarni* – postojanje jednog klasičnog MEN1 tumora i srodnika prvog stepena sa kliničkom dijagnozom MEN1
- 3) *genetski* – postojanje mutacije u *MEN1* genu, uključujući i asimptomatske nosioce [35].

MEN1 je označen kao *familijarni* ukoliko je dijagnostikovao kod prvog srodnika pacijenta sa jednim ili više MEN1 tumora. MEN1 je označen kao *sporadični* ukoliko pacijent zadovoljava kliničke ili genetske kriterijume ali nema obolele srodnike. MEN1 *fenokopija* definisana je odsustvom mutacije u *MEN1* genu kod pacijenta sa kliničkom dijagnozom MEN1 sindroma.

Vreme dijagnoze definisano je starošću kada je bolest prvi put prepoznata kao MEN1 sindrom. Početak bolesti definisan je uzrastom u kojem je dijagnostikovao prvi tumor.

3.3. Dijagnoza MEN1 tumora

Primarni hiperparatiroidizam je definisan postojanjem hiperkalcemije u prisustvu povećanog ili neadekvatno normalnog nivoa PTH u više merenja [99].

Dijagnoza pankreasnog neuroendokrinog tumora kod najvećeg broja pacijenata je postavljena na osnovu patohistološkog nalaza po operaciji primarnog tumora ili biopsiji sekundarnih depozita. Ukoliko tumor nije operisan, postojanje pNETa je definisano CT/NMR nalazom, endoskopskim ultrazvučnim pregledom, pozitivnom scintigrafijom neuroendokrinih tumora (Octreoscan) ili Ga⁶⁸-PET CT vizualizacijom, sa ili bez povećanja neuroendokrinih tumorskih markera (hromogranin A, neuron-specifična enolaza) [100].

Tumor hipofize je definisan postojanjem tumora na NMR selarne regije sa ili bez povećanih hormona prednjeg režnja hipofize, kao i patohistološkim nalazom ukoliko je tumor operisan. Klasifikacija različitih tipova funkcijskih tumora hipofize (prolaktinom, somatotrofni, kortikotrofni, tireotrofni ili gonadotrofni adenom) bazirana je na važećim preporukama [101-104].

Tumor nadbubrega dijagnostikovao je NMR/CT-om abdomena i patohistološkim nalazom kod operisanih pacijenata. Klasifikacija različitih tipova funkcijskih tumora nadbubrega (feohoromocitom, korizol-sekretujuć, androgen-sekretujuć, aldosteron-sekretujuć ili nefunkcijski tumori) vršena je na osnovu važećih preporuka [105,103,106].

Neuroendokrini tumor bronha definisan je CT/NMR nalazom, Octreoscan-om ili Ga⁶⁸-PET CT-om i patohistološkom analizom dobijenom operacijom tumora ili endoskopskom biopsijom. Neuroendokrini tumor timusa definisan je CT/NMR nalazom, Octreoscan-om i patohistološkim nalazom dobijenim transtorakalnom bipsijom ili operacijom [107].

Tumori van endokrinog sistema definisani su patohistološki po operaciji.

3.4. Prevalencija MEN1 sindroma

Za izračunavanje prevalencije korišćeni su podaci iz Genteske laboratorije Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma, gde su dijagnostikovani svi MEN1 pacijenti sa mutacijom u *MEN1* genu na teritoriji Republike Srbije, ukupno 85 do 2016. godine.

Prevalencija je računata standradnim metodama, na dan 31.12.2016. uz korišćenje populacije Srbije za istu godinu, na dan 30.06. 2016. Intervali poverenja na nivou 95% računati su prema metodi za retke događaje. Standardizovana prevalencija računata je metodom direktne standardizacije uz korišćenje Standradne populacije Evrope, kao komparatora.

3.5. Genotipizacija

Svim pacijentima je u okviru standardne kliničke obrade za vreme hospitalizacije uzet uzorak periferne krvi (6ml pune krvi) za analizu prisustva mutacija u *MEN1* genu, nakon što je od strane svakog pacijenta dobijeno pismeno odobrenje za izvođenje genske analize. Ukoliko direktnim sekvenciranjem *MEN1* gena nije nađena

tačkasta mutacija, sprovedena je multipleks ligaciono zavisna amplifikacija proba u cilju detekcije delecija i duplikacija regiona DNK. Ovako dobijeni podaci o genetskim alteracijama *MEN1* gena retrospektivno su analizirani u pogledu tipa mutacija, lokalizacije u *MEN1* genu, efekta mutacije i korelacije sa kliničkom prezentacijom MEN1 sindroma. Pošto su podaci retrospektivno korišćeni, proces detekcije alteracija *MEN1* gena nije detaljno naveden.

Analiza mutacija sprovedena je na genomskoj DNK, izolovanoj iz leukocita periferne krvi koristeći Pure Link Genomic DNA Mini Kit (*Thermo Fisher Scientific, SAD*), prema instrukcijama proizvođača. Čitav kodirajući region plus granični intronski regioni *MEN1* gena koji okružuju mesta iskrajanja (egzoni 2-10) analizirani su PCR sekvenciranjem (PCR, engl. *Polymerase chain reaction*) koristeći specifične prajmere. Direktno DNK sekvenciranje koristeći Big Dye Terminator v3.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems, SAD*) sprovedeno je na automatizovanom ABI PRISM 3130 genetskom analizeru (*Applied Biosystems, SAD*) i analizirano pomoću ABI DNA Sequencing Analysis softvera v5.2. Svi uzorci kod kojih nije pokazana tačkasta mutacija u *MEN1* genu analizirani su na postojanje delecija pomoću SALSA MLPA P017-C1 MEN1 kita (*MRC-Holland, Holandija*). Za fragmentnu i komparativnu analizu MLPA uzoraka korišćen je Coffalyser.NET Software (*MRC-Holland, Holandija*). Analizirani su i DNK uzorci dobijeni od zdrave i negativne kontrole. Odnos ispod 0.7 ili preko 1.3 smatran je graničnim vrednostima za heterozigotnu deleciju odn. amplifikaciju.

3.6. Analiza tumorskih tkiva

Gubitak heterozigotnosti 11q13 lokusa analiziran je na uzorcima 30 različitih MEN1 tumora dobijenih ih parafinskog bloka nakon operacije tumora. Reprezentativni uzorak tumorskog tkiva je odabran od strane patohistologa.

3.6.1. Deparafinizacija tkiva

Tumorsko tkivo za izolaciju DNK dobijeno je deparafinizacijom 4-5 parafinskih isečaka (preseka) debljine do 10 μ , nakon što je u parafinskom bloku od strane patohistologa identifikovano tumorsko tkivo. Deparafinizacija je postignuta inkubacijom uzorka od 2-3 minuta u destilovanoj vodi, zagrejanom do temperature od 90-95°C (tačka topljenja parafina iznosi oko 70°C). Ovaj proces je ponovljen tri puta, čime je omogućeno topljenje kompletne količine parafina i odvajanje od tumorskog tkiva [108].

3.6.2. Izolacija DNK

Za izolaciju DNK iz uzoraka tkiva upotrebljen je standardni protokol za fenol-hloroform-izoamilalkoholnu izolaciju (Modifikovano Holand JL i sar. 1995) [109]:

1. U tubu od 1.5 ml dodavano je tumorsko tkivo dobijeno deparafinizacijom, 400 μ l digestionog pufera (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA, pH8), 30 μ l SDS i 30 μ l proteinaze K (Proteinase K Solution, 20 mg/ml; Applied Biosystem, Foster City, SAD).
2. Smeša je inkubirana preko noći na 37 °C.
3. Smeši je dodavano 30 μ l proteinaze K, a zatim je inkubirana 60 minuta na 56 °C i potom preko noći na 37 °C.
4. U uzorke je dodavano 490 μ l smeše fenol-hloroform-izoamilalkohol u razmeri 25:24:1.
5. Uzorci su vorteksovani 15 s i centrifugirani na 5000 rpm 5 min.
6. Gornja faza je prebačena u novu tubu od 1.5 ml i dodavano je 490 μ l smeše hloroforma-izoamilalkohol u odnosu 24:1.
7. Uzorci su vorteksovani 15 s i centrifugirani na 5000 rpm 5 min.
8. Gornja faza je prebačena u novu tubu od 1.5 ml i dodavani su natrijumacetat u finalnoj koncentraciji od 0.3 M i 2.2 volumena 96 % etanola, zatim su ostavljani na - 20 0C preko noći.
9. Uzorci su centrifugirani na 10000 rpm 15 minuta, na 4 0C.

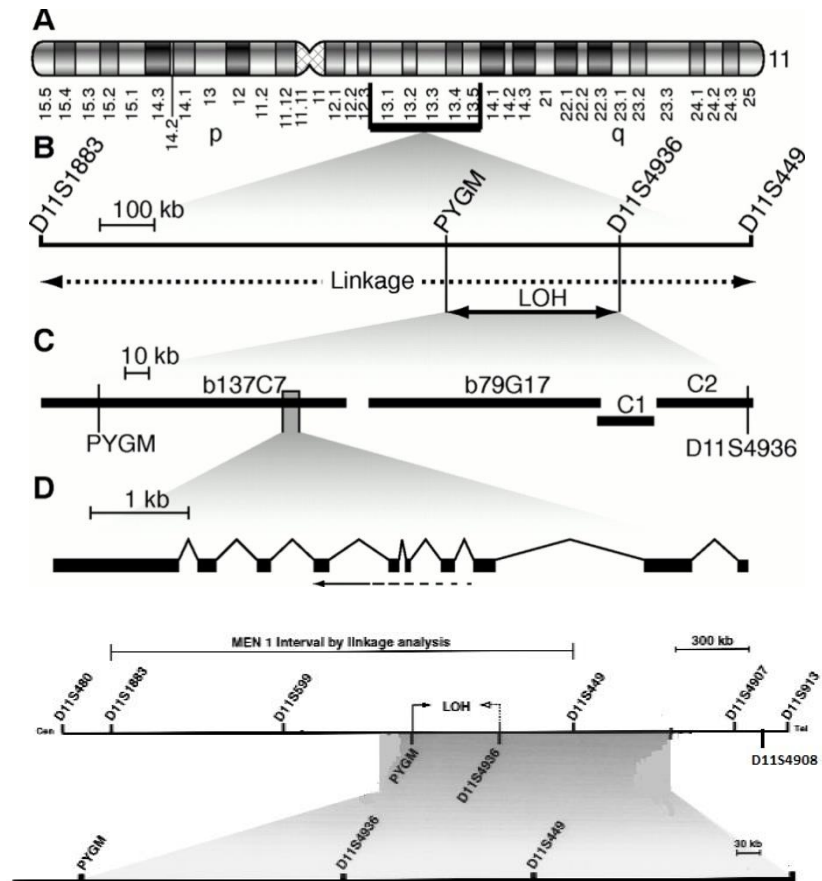
10. Precipitat DNK je ispiran dodavanjem 500 μ l 70 % etanola, a smeša je zatim centrifugirana na 10000 rpm 5min.
11. Etanol je odlivan i tube sa DNK su ostavljane na sobnoj temperaturi do potpunog isparavanja tečnosti.
12. DNK je resuspendovana u TE puferu (pH 7.5) (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH8) ili u dejonizovanoj vodi i inkubirana na 37 °C preko noći.

DNK je kvantifikovana korišćenjem spektrofotometra, merenjem apsorbcije na talasnoj dužini od 260 nm (GeneQuant, GE Helthcare, Švedska) i čuvana na - 20 °C.

3.6.3. Analiza gubitka heterozigotnosti 11q13 lokusa

Devet polimorfnih mikrosatelitnih markera (tabela 5) koji okružuju gen MEN1 (slika 5) amplifikovano je metodom lančane reakcije polimerizacije (engl. *Polymerase Chain Reaction, PCR*) primenom MyTaq™DNA Polymerase PCR kita (Bioline, UK) [110,111]. Komponente reakcione smeše i temperaturni profili reakcije predstavljeni su u tabelama 6 i 7.

Amplifikovani fragmenti su elektroforetski razdvojeni na automatskom četvorokapilarnom genetičkom analizatoru 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, SAD). Dužina fragmenata je određena poređenjem sa internalnim GeneScan™ - 500 LIZ™ Size standardom (Applied Biosystems, SAD). Intenzitet signala (visina pikova) PCR produkata za svaki pojedinačni marker tumorskog tkiva poređen je sa intenzitetom signala svakog pojedinačnog markera kontrolne DNK (DNK izolovana iz leukocita periferne krvi pacijenata). GeneScan softver za analizu fragmenata (Applied Biosystems, SAD) je korišćen za merenje visine (h) dva glavna pika P1 (kraći) i P2 (duži) i za izračunavanje njihovog odnosa $r=P2/P1$. Gubitak heterozigotnosti je određivan izračunavanjem odnosa AIR (eng. Allelic Imbalance Ratio, AIR) prema sledećoj formuli $AIR=r(\text{normalno})/r(\text{tumor})$. Kod uzoraka sa vrednostima $AIR < 0.5$ za bar jedan od ispitivanih markera potvrđen je gubitak heterozigotnosti.



Slika 5. Šematski prikaz lokalizacije MEN1 gena i 9 mikrosatelitnih markera od D11S480 do D11S913 korišćenih za analizu gubitka heterozigotnosti (modifikovano Manikam i sar, 1997) [110].

D11S4908	R-TCACCCTCTTGTCATCATCATCTC F- TGTTGAAAAATATGTATATGTAGGTTT G* R-CTGGGGCTATTGCTTTGTCC	168	*NED	60°C	GH9
----------	---	-----	------	------	-----

GH – gubitak heterozigotnosti

Tabela 6. Komponente reakcione smeše PCR reakcije

Reakciona smeša	Finalna koncentracija	Zapremina (µl)
DNK	100 ng	
<i>MyTaq Reaction Buffer</i>	1x	5 µl
<i>MyTaq DNA Polymerase</i>	2 U	0.2 µl
Prajmer miks (R i F)	0.2 µM	po 0.25 µl
<i>Rnase-free voda</i>		do finalne zapremine od 25 µl

Tabela 7. Temperaturni profil PCR reakcije

GH9				
Inicijalna denaturacija	35 ciklusa			Finalna ekstenzija
94°C/4min	Denaturacija 94°C/30s	Hibridizacija 60°C/30s	Elongacija 72°C/1 min	72°C/2min
GH8				
Inicijalna denaturacija	35 ciklusa			Finalna ekstenzija
95°C/4min	Denaturacija 95°C/40s	Hibridizacija 56°C/40s	Elongacija 72°C/30s	72°C/5min
GH1				
Inicijalna denaturacija	30 ciklusa			Finalna ekstenzija
94°C/4min	Denaturacija 94°C/30s	Hibridizacija 50°C/30s	Elongacija 72°C/30s	72°C/2min
GH6				
Inicijalna denaturacija	35 ciklusa			Finalna ekstenzija
95°C/4min	Denaturacija 95°C/40s	Hibridizacija 63°C/40s	Elongacija 72°C/30s	72°C/5min

3.7. Statistička analiza podataka

Statističke analize su rađene pomoću programa SPSS (SPSS for Windows, 17.0). Vrednost statističkih testova manja od 0.05 ($p < 0.05$) je smatrana značajnom. Normalnost raspodele kontinuiranih varijabli je proveravana pomoću Kolmogorov-Smirnov testa. Sve kontinuirane varijable sa normalnom raspodelom podataka su prikazivane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija (SD), a razlike između grupa su analizirane parametrijskim Studentovim T testom. Kontinuirane varijable koje nisu imale normalnu raspodelu su logaritamski transformisane i ukoliko se time postizala normalnost raspodele, nadalje su analizirane gore navedenim parametrijskim testom.

Kategoričke varijable su analizirane primenom χ^2 testa ukoliko su bili zadovoljeni kriterijumi, odnosno Fisherovim testom tačne verovatnoće ako nisu bili zadovoljeni kriterijumi.

Ukupno preživljavanje procenjeno je na osnovu Kaplan Majerove metode, a razlika između preživljavanja dve grupe analizirana je primenom Log rank testa.

Procena značajnosti prediktora postojanja mutacije u *MEN1* genu za postupak binarne logističke regresione analize je sprovedena pojedinačnim forsiranim unosom (*Enter*) varijabli u model.

4.1. Prevalencija MEN1 sindroma

Podaci za ukupnu prevalenciju MEN1 sindroma, kao i prevalenciju MEN1 sindroma po polovima, prikazana je u Tabeli 8. Uzrastno specifična prevalencija MEN1 sindroma na ukupnom broju MEN1 pacijenata data je u Tabeli 9.

Tabela 8. Prevalencija MEN1 sindroma (sa mutacijom u *MEN1* genu)

	Oboleli	Populacija*	Prevalencija/1000000	95%CI
Ukupno	61	7095383	8.59714	6,61-11,18
Muškarci	22	3455335	6.366966	3,89-9,80
Žene	39	3640048	10.71414	7,65-14,57

*Populacija Republike Srbije na dan 30.06. 2016. godine

Tabela 9. Uzrastno specifična prevalencija MEN1 sindroma (pacijenti sa mutacijom u *MEN1* genu)

	Broj Pacijenata	Populacija*	Uzrastno specifična prevalencija	ESP	Očekivani broj obolelih
Muškarci					
0-19	6	566561	10.59021	29000	3.071161
20-29	4	445217	8.984383	14000	1.257814
30-39	11	503545	21.84512	14000	3.058317
40-49	0	475190	0	14000	0
50+	1	1318787	0.758273	29000	0.219899
					7.60719
Žene					
0-19	11	671757	16.37497	29000	4.748741
20-29	5	423745	11.79955	14000	1.651937
30-39	12	487721	24.60423	14000	3.444592
40-49	4	478846	8.353416	14000	1.169478
50+	7	1577979	4.436054	29000	1.286456
					12.3012
Ukupno					
0-19	17	1238318	13.7283	29000	3.981207
20-29	9	868962	10.35718	14000	1.450006
30-39	23	991266	23.20265	14000	3.248371
40-49	4	954036	4.192714	14000	0.58698
50+	8	2896766	2.7617	29000	0.800893
					10.06746
0-19	17	1238318	13.7283	29000	3.981207

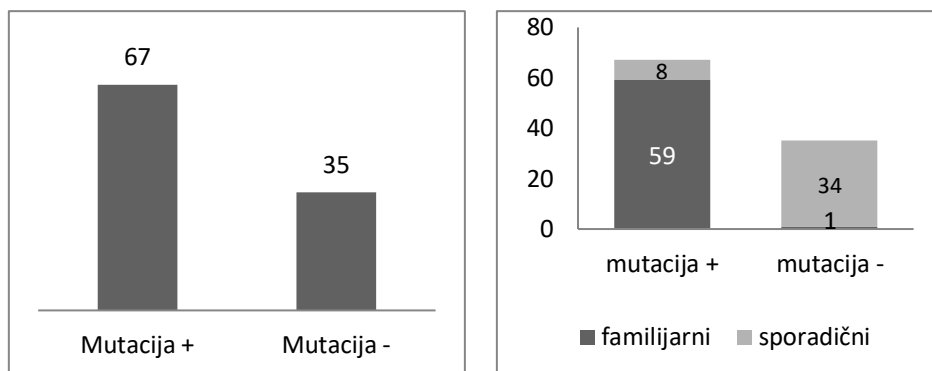
*Populacija Republike Srbije na dan 30.06. 2016. godine; ESP – Evropska standardizovana populacija

4.2. Opšte karakteristike ispitanika

Studijom je obuhvaćeno 75 indeksnih pacijenata i 27 članova porodice sa MEN1 sindromom. Ukupno je analizirano 102 pacijenta sa MEN1 sindromom oba pola, ali su žene bile zastupljenije od muškaraca (68,6% odn. 31,4%). Prosečni period praćenja pacijenata iznosio je $9,6 \pm 7,0$ godina.

Mutacija u *MEN1* genu nađena je kod 53,3% indeksnih slučajeva (40/75), a u 65,7% ukupnog broja pacijenata (67/102). Familijarni MEN1 je dijagnostikovao u 59 (56,9%) pacijenata koji su pripadali 31 različitoj porodici. Sporadični MEN1 dijagnostikovao je u 43 (42,1%) pacijenta, od čega je bilo 8 nosilaca mutacije (11,9% od svih nosilaca) (grafikon 1). Pedeset tri (79,1%) nosioca mutacije je imalo ispoljenu kliničku sliku u trenutku dijagnoze, dok je 14 (20,9%) pacijenata pripadalo asimptomatskim članovima porodice.

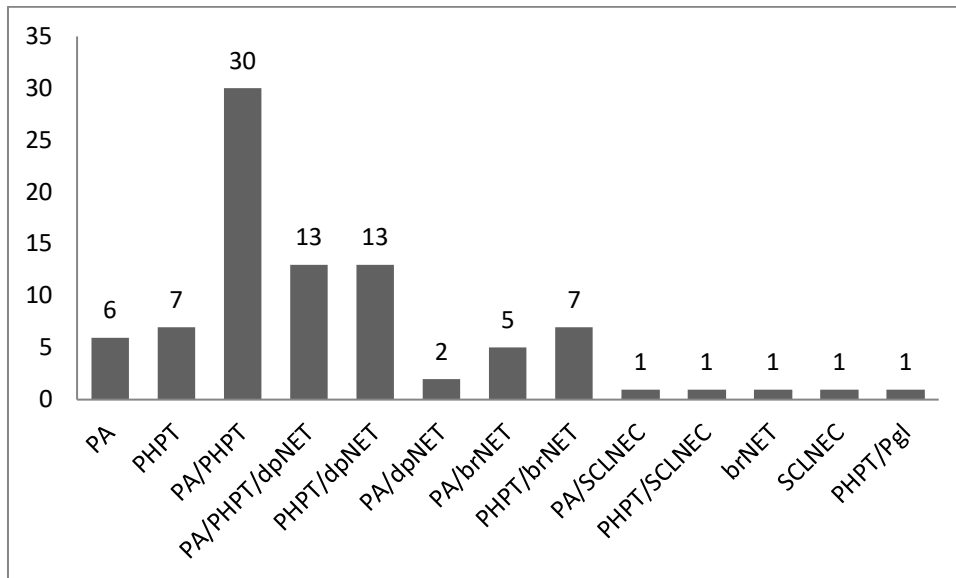
Prosečna starost ispitanika u trenutku kada je MEN1 dijagnostikovao iznosila $41,1 \pm 18,7$ godina, u rasponu od 3 do 72 godine. Prosečna starost u trenutku početka bolesti iznosila je $42,3 \pm 15,1$ godinu. Među pacijentima dijagnostikovanim u uzrastu ispod 30 godina (28/102, 27,5%), svi osim jednog (96,4%) su bili nosioci mutacije. Najmlađi pacijent sa ispoljenim MEN1 sindromom imao je 13 godina, a inicijalni tumor je bio tumor hipofize. Starost u trenutku postavljanja dijagnoze asimptomatskih pacijenata bila je statistički značajno niža nego kod klinički ispoljenih pacijenata ($16,5 \pm 13,6$ odn. $44,9 \pm 16,3$ godine).



Grafikon 1. Učestalost mutacija u *MEN1* genu i zastupljenost familijarnih i sporadičnih formi

4.3. Fenotipske karakteristike

Nakon isključenja 14 asimptomatskih pacijenata, fenotipske karakteristike su analizirane na 88 pacijenata. Fenotipovi MEN1 prikazani su na grafikonu 2.



PA – pituitarni adenoma, PHPT – prim. hiperparatiroidizam, dpNET – duodenopankreasni neuroendokrini tumor, brNET – neuroendokrini tumor bronha, SCLNEC – sitnoćelijski neuroendokrini karcinom pluća, Pgl – paragangliom

Grafikon 2. MEN1 fenotipovi

4.3.1. Primarni hiperparatiroidizam

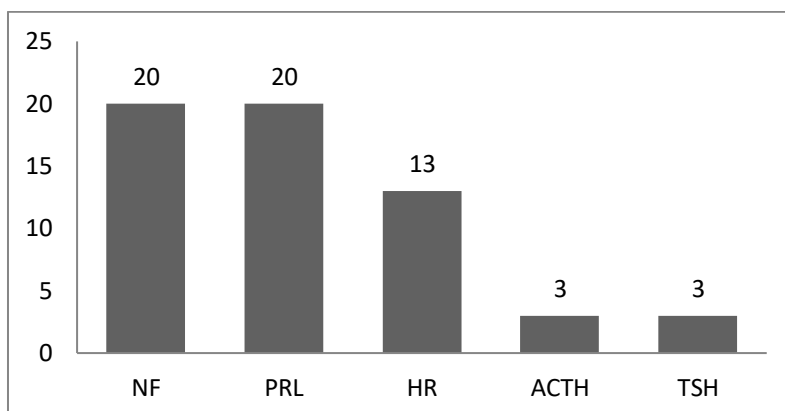
Primarni hiperparatiroidizam je bio najčešća komponenta MEN1 sindroma među pacijentima (70/88, 79,5%). Prosečna starost u trenutku dijagnoze iznosila je 45.9 ± 14.9 godina. Kao prva manifestacija bolesti javio se kod 23 (26,1%) a kao jedina komponenta kod 7 (8%) pacijenata sa MEN1 sindromom (prosečan period praćenja $7 \pm 6,4$ godine). Prosečan preoperativni nivo jonizovanog kalcijuma iznosio je $1,47 \pm 0,2$ mmol/l. Prosečna preoperativna vrednost PTH bila je $149,4 \pm 164,1$ ng/L. Simptomatska bolest dijagnostikovana je kod 24 (34,3%) pacijenta, osteoporoza kod 12 (50%), kalkuloza bubrega kod 14 (58,3%).

Operacija je sprovedena kod 44 (50%) pacijenta, a patohistološki podaci su bili dostupni za 40 pacijenata. Poliglandularna bolest dijagnostikovana je kod 25/40 (62,5%) pacijenata, hiperplazija kod 24/40 (60%), adenom kod 18/40 (45%).

4.3.2. Tumor hipofize

Tumor hipofize dijagnostikovana je kod 59/88 (67%) pacijenata, a čak kod 84,2% mlađih od 30 godina (16/19). Prosečan uzrast u kom je dijagnostikovana tumor hipofize iznosio je 40.8 ± 15.8 godina, što ga čini tumorom sa najranijom pojavom u ovoj grupi pacijenata. Tumor hipofize je bio inicijalna manifestacija kod 41 (69,5%), sa prosečnim vremenom dijagnoze u 37.6 ± 15.6 godini. Kao jedina *MEN1* manifestacija dijagnostikovana je kod 6/88 (6,8%), tokom prosečnog perioda praćenja od $8,7 \pm 5,7$ godina.

Makroadenomi su bili češći od mikroadenoma (42% odn. 23,9%), a funkcijski tumori češći od nefunkcijskih (44,3% odn. 22,7%). Posmatrajući sveukupno tipove tumora hipofize, najčešći su bili nefunkcijski tumori i prolaktinom (33,9%), akromegalija je bila zastupljena kod 22% a Mb. Cushing i TSH-sekretujuć adenom kod 5,1% pacijenata (Grafikon 3). Samo jedan (1,7%) pacijent je imao multicentrični tumor hipofize i taj pacijent je bio nosilac mutacije u *MEN1* genu.

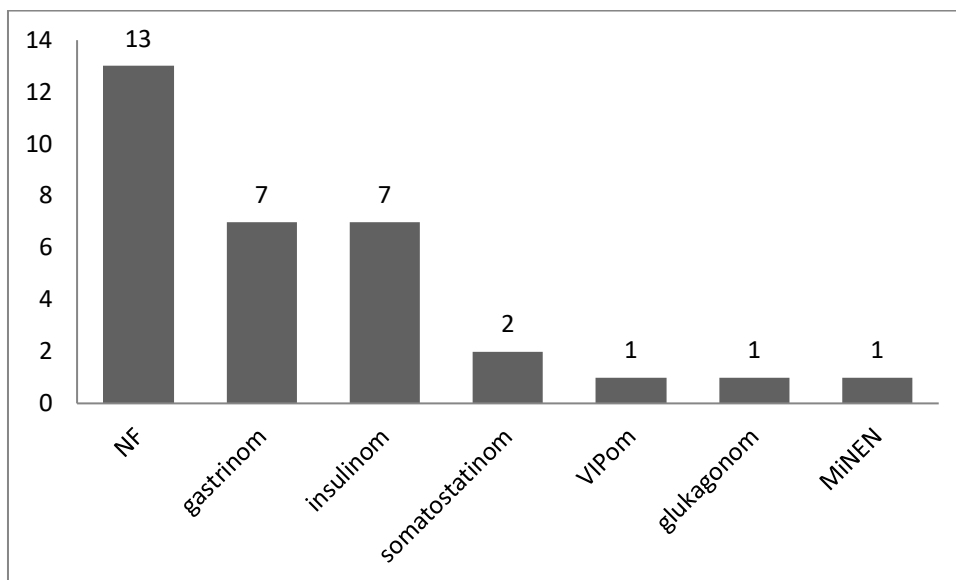


NF – nefunkcijski tumor, PRL – prolaktinom, HR – akromegalija, ACTH - kortikotropinom, TSH – tireotropinom

Grafikon 3. Učestalost tipova tumora hipofize

4.3.3. NET pankreasa i duodenuma

Neuroendokrini tumori duodenuma i pankreasa dijagnostikovani su kod 27/88 (30.7 %), sa prosečnom starošću od 43.5 ± 14.3 godina. Kao inicijalna manifestacija su dijagnostikovani kod 15 (17.4%) pacijenata, prosečno u 43.2 ± 16.2 godini. Multipli tumori dijagnostikovani su kod 15 (55,6%) pacijenata. Najčešći su bili efunkcijski tumori (48,1%), potom gastrinomi i insulinomi (25,9%) (grafikon 4).



NF – nefunkcijski, MiNEN – miksna neuroendokrina-neneuroendokrina neoplazma

Grafikon 4. Učestalost podtipova dpNET

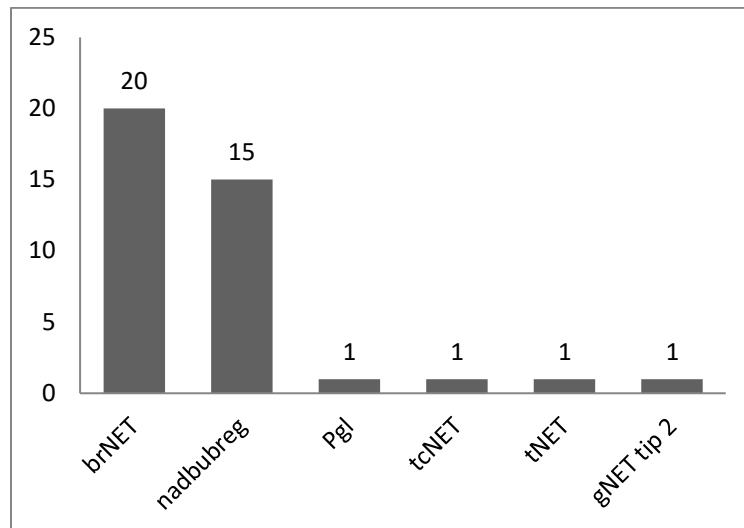
Osam (33,3%) je imalo metastatsku bolest: regionalni limfni nodusi 4 (50%), nadbubreg (37,5%), jetra 2 (25%) i pluća 1 (12,5%). Operativno lečenje je primenjeno kod svih pacijenata sa funkcijskim tumorima i 6 (46,2%) pacijenata sa nefunkcijskim dpNET. Srednji dijametar tumora koji su operisani iznosio je $46,3 \pm 26,3$ mm, dok je srednji dijametar neoperisanih tumora iznosio $10,6 \pm 7,5$ mm.

4.3.4. Ostali endokrini tumori

Neuroendokrini tumori bronha dijagnostikovani su kod 20 (22.7 %) pacijenata, i to 8 tipičnih (TK), 9 atipičnih karcinoida (AK), 3 sitnoćelijska neuroendokrina karcinoma pluća (SCLNEC) i 1 difuzna idiopatska hiperplazija neuroendokrinih ćelija pluća (engl. *diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia, DIPNECH*). Prosečna starost kada je dijagnostikovani brNET iznosila je $51,3 \pm 12,6$ godina. Metastatska bolest dijagnostikovana je kod 9 pacijenata: medijastinalni limfni nodusi 6 (66,6 %), jetra 4 (44,4 %), CNS 3 (33,3 %) i nadbubreg 1 (1,1%).

Tumor nadbubrega dijagnostikovani su kod 15 (17%) pacijenata, prosečne starosti u trenutku dijagnoze $49,6 \pm 11,1$ godina. Kao prva manifestacija javio se kod 3 (3,4%) pacijenata. Najčešće su bili asocirani sa PA/PHPT/dpNET fenotipom (6/13, 46,2%). Osim kod jednog pacijenta sa Kušingovim sindromom, nefunkcijski tumor nadbubrega je dijagnostikovani u 93,3% pacijenata. Svi analizirani tumori su imali radiološke karakteristike tipičnih adenoma. Samo tri pacijenta su operisani, jedan sa Kušingovim sindromom i dva tokom parcijalne pankreatektomije zbog NET pankreasa, koji su odgovarali makronodularnoj hiperplaziji nadbubrega.

Ekstra-adrenalni paragangliom, neuroendokrini tumor tankog creva, gastrični NET tip 2 i NET timusa dijagnostikovani su kod jednog (1,1%) pacijenta (Grafikon 5).



brNET – neuroendokrini tumori bronha, Pgl – paragangliom, tcNET – neuroendokrini tumor tankog creva, tNET – neuroendokrini tumor timusa, gNET tip 2 – гастриčni NET tip 2

Grafikon 5. Učestalost ostalih endokrinih tumora

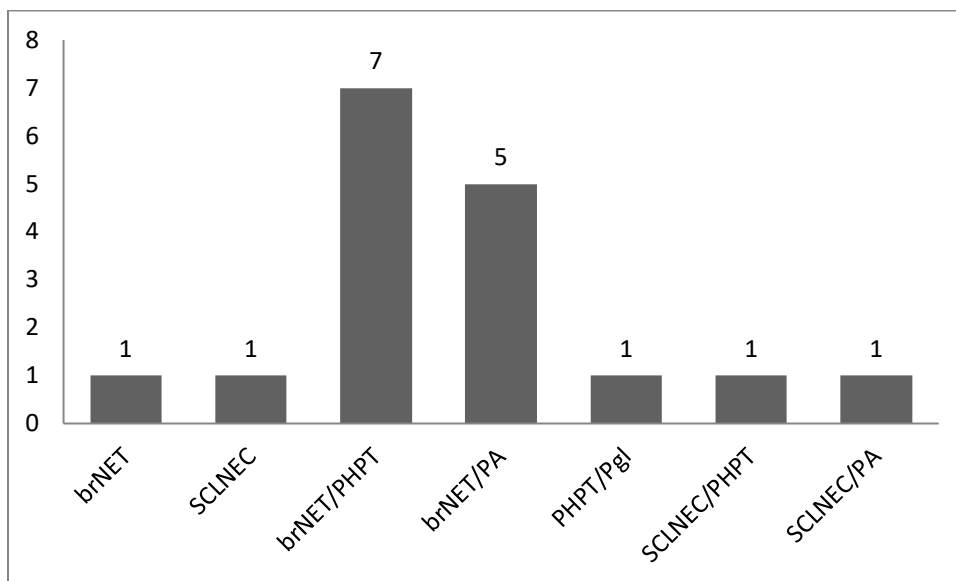
4.3.5. Atipični MEN1 sindrom

Među 75 indeksnih pacijenata koji su uključeni u studiju, 58/75 (77.3%) je zadovoljilo 3P kriterijume, dok 17/75 (22.7%) nije imalo dva ili više 3P tumora. Među ovim pacijentima koji su se inicijalno prezentovali atipičnim MEN1 sindromom, mutacija u *MEN1* genu je nađena kod 7/17 (41,2%) pacijenata (tabela 10). BrNET u kombinaciji sa PHPT otkriven je kod 6/40 (15%) nosilaca mutacije u trenutku kada je postavljena dijagnoza MEN1. Četiri od 40 (10%) pacijenata je zadržalo isti fenotip u trenutku uključivanja u studiju (period praćenja $9,3 \pm 4,8$ godina, u rasponu od 4 – 17 godina, prosečna starost $58,3 \pm 5,6$ godina) dok su dva pacijenta stekla brNET/PHPT/PA/dpNET i brNET/PHPT/dpNET fenotipove. Jedan pacijent (2,5%) se prezentovao samo postojanjem brNET tokom celog perioda praćenja od 26 godina, a jedan samo postojanjem sitnoćelijskog karcinoma tokom godinu dana praćenja. Jedan pacijent (2,5%) se inicijalno prezentovao ekstra adrenalnim paragangliomom, a tumor hipofize dijagnostikovao je tri godine kasnije. Sveukupno gledano, 17/88 (19,3%) od ukupnog broja odn. 7/40 (17.5%) nosilaca MEN1 mutacije se prezentovalo van klasične 3P trijade, odn. atipičnim MEN1 sindromom (grafikon 6).

Tabela 10. Postojanje aktuelnih kliničkih kriterijuma ($\geq 3P$ tumora) kod pacijenata sa i bez *MEN1* mutacije

Kliničke karakteristike indeksnih pacijenata		
	3P kriterijumi +	3P kriterijumi -
<i>MEN1</i> mutacija + n/N (%)	33/40 (82.5%)	7/40 (17.5%)
<i>MEN1</i> mutacija - n/N (%)	25/35 (71.4%)	10/35 (28.6%)
Σ	58/75 (77.3%)	17/75 (22.7%)

3P – engl. *pancreatic, pituitary, parathyroid tumors*



brNET – neuroendokrini tumor bronha, SCLNEC – sitnoćelijski neuroendokrini karcinom pluća, PHPT – primarni hiperparatiroidizam, PA – pituitarni adenom, Pgl - paragangliom

Grafikon 6. Fenotip pacijenata sa atipičnim MEN1 sindromom

4.3.6. Tumori van endokrinog sistema

Tumori van endokrinog sistema dijagnostikovani su kod 17 (19,3%) pacijenata. Najčešći “ne-endokrini” tumor pacijenata sa MEN1 sindromom bio je papilarni karcinom štitaste žlezde, dijagnostikovani kod 6/88 (6,8%) pacijenata i karcinom dojke,

dijagnostikovano kod 4/88 (4,5%) pacijenata. Detaljnije karakteristike ovih pacijenata prikazane su u tabeli 11.

Tabela 11. Karakteristike pacijenata sa tumorima van endokrinog sistema

Pacijent	Ne-endokrini tumori (starost u trenutku dijagnoze)	MEN1 tumori (starost u trenutku dijagnoze)	Mutacija
1	Ca dojke (34) Angiolipom (?)	Makroprolaktinom (34) Tumor nadburega (35) pNET (36)	1649insC
2	Ca dojke (60)	PHPT (63) TK (56)	P188L
3	Ca dojke (48)	NFPA (32)	1184_1185insA
4	Ca dojke (40)	PHPT (36)	M1V
5	PTK (52)	Gastrinom (31) PHPT (52) tNET (58)	1088del7
6	PTK (55)	PHPT (46) pNET (36)	865del4(CTCG)
7	PTK (29)	Mikrorolaktinom (29) PHPT (29) pNET (28) MAH (30)	1053delG
8	PTK (54)	PHPT (54) Akromegalija (58)	MEN1 fenokopija
9	PTK (59)	PHPT (59) Akromegalija (57)	MEN1 fenokopija
10	PTK (46) Fibroadenom dojke (46)	PHPT (46) Akromegalija (46)	MEN1 fenokopija
11	Meningeom (55)	NFPA(53) pNET (55) AK (53)	MEN1 fenokopija

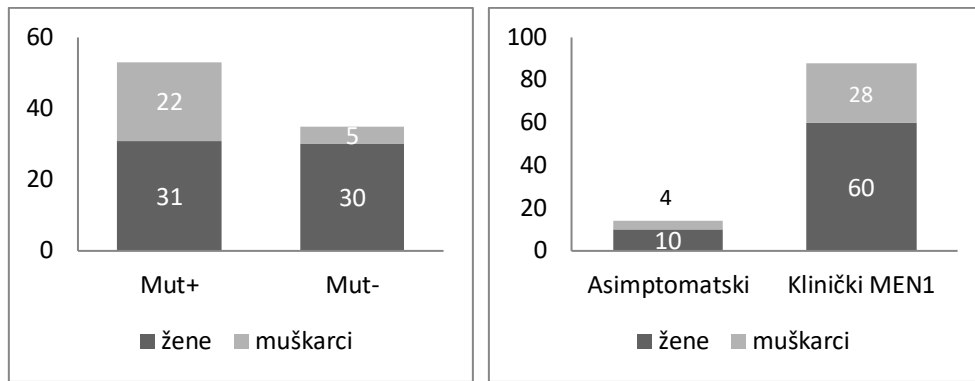
		Tumor nadbubrega (53)	
12	Hondroidni hordom (38)	Makroprolaktinom (34) PHPT (34)	S60delG
13	Lejomiosarkom uterusa (72)	pNET (53) PHPT (56)	1649insC
14	Mesoteliom pleure (56) Angiofibrom (?)	PHPT (52) Tumor nadbubrega (52)	W220G
15	Adenokarcinom želuca (63)	PHPT (70) dNET (63)	MEN1 fenokopija
16	Hondroidni hordom (48) Meningeom (48)	Acromegalija (48) TK (53)	MEN1 fenokopija
17	Adenokarcinom pankreasa (62)	Prolaktinom (55) AK (58)	MEN1 fenokopija

pNET – neuroendokrini tumor pankreasa, PHPT – primarni hiperparatiroidizam, TK – tipični karcinoid, NFPA – nefunkcijski pituitarni adenom, PTK – papilarni tiroidni karcinom, tNET – neuroendokrini tumor timusa, MAH – makronodularna hiperplazija, AK – atipični karcinoid, dNET – duodenalni neuroendokrini tumor

4.4. Kliničke i patohistološke razlike nosilaca mutacije i MEN1 fenokopija

Nosioci *MEN1* mutacije razlikovali su se u odnosu na pacijente sa MEN1 fenokopijom u pogledu distribucije pola, fenotipu i patohistološkim karakteristikama MEN1 tumora.

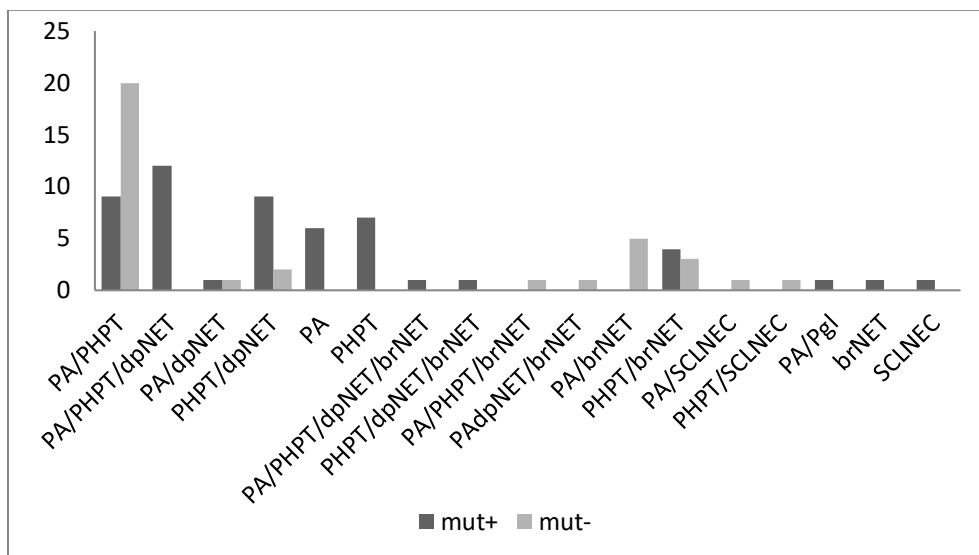
Grupu MEN1 fenokopija odlikovao je statistički značano veći broj žena nego grupu nosilaca *MEN1* mutacije ($\chi^2= 7.35$, $p = 0,006$, OR = 4,25, 95%CI 1,43 – 12,70). Analizom samo pacijenata sa mutacijom nije dobijena razlika u distribuciji pola između asimptomatskih i pacijenata sa ispoljenim MEN1 tumorima ($\chi^2= 0,06$, $p = 0,54$) (grafikon 7).



Distribucija polova u odnosu na postojanje mutacije; mut+ pozitivna *MEN1* mutacija, mut-negativna *MEN1* mutacija; distribucija pola u odnosu postojanje kliničke slike

Grafikon 7. Distribucija polova

Grupe su se međusobno razlikovale i u zastupljenosti određenih fenotipova. Najčešći fenotip u grupi nosilaca *MEN1* mutacije bio je PA/PHPT/pNET, dok je u grupi *MEN1* fenokopija najčešći fenotip bio PA/PHPT ($p < 0,01$). Niko od pacijenata sa *MEN1* fenokopijom nije imao više od dva glavna *MEN1* tumora, ali su dva pacijenta imala pridružene brNET (grafikon 8).



PA – pituitarni adenom, PHPT – primarni hiperparatiroidizam, dpNET – duodenopankreatični neuroendokrini tumori, brNET – neuroendokrini tumori bronha, SCLNEC – sitnoćelijski neuroendokrini karcinom pluća, Pgl - paragangliom

Grafikon 8. Fenotipovi nosilaca *MEN1* mutacije i *MEN1* fenokopija

Primarni hiperparatiroidizam bio je podjednako zastupljen u obe grupe ispitanika, ali su pacijenti sa mutacijom u *MEN1* genu bilo statistički značajno mlađi u trenutku dijagnoze MEN1 sindroma ($t = 4,45$ $p = 0,000$). Među operisanim pacijentima, u grupi nosilaca MEN1 mutacije 76,6% je imalo poliglandularnu bolest, dok su pacijenti sa MEN1 fenokopijama imali isključivo solitarni adenom paratiroidne žlezde ($p < 0,001$). Hiperplazija paratiroidnih žlezda je dijagnostikovana u 80% slučajeva, dok su solitarni adenomi dijagnostikovani kod 26,7% pacijenata, za period praćenja od $9,9 \pm 7,1$ godinu. Nije bilo razlike u pogledu preoperativnih vrednosti kalcijuma, PTH i kliničke slike (tabela 12).

Tabela 12. Kliničke i patohistološke karakteristike pacijenata sa PHPT u grupi nosilaca *MEN1* mutacije i MEN1 fenokopija

	Nosioци mutacije	MEN1 fenokopija	<i>P</i>
n/N, %	43/53 (81,1%)	27/35 (77,1%)	0,42
Starost (godine)	$40,4 \pm 13,4$	$55,0 \pm 12,7$	$<0,001$
Operacija, n/N, %	32/43 (74,4%)	12/27 (44,4%)	0,01
Poliglandularna bolest n/N, %	23/30 (80%)	/	$<0,001$
Hiperplazija, n/N, %	24/30 (80%)	/	$<0,001$
Adenom, n/N, %	8/30 (26,7%)	10/10 (100%)	$<0,001$
Ca ²⁺ , mmol/l *	$1,5 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,1$	0,3
PTH, ng/L*	$179,9 \pm 43,6$	$124 \pm 160,3$	0,34
Simptomatska bolest, n/N, %	21/43 (48,8%)	13/27 (48,1%)	0,61

* vrednosti prikazane kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija; PTH – paratiroidni hormon

Tumor hipofize je bio značajno češći u grupi pacijenata sa MEN1 fenokopijom nego kod nosilaca *MEN1* mutacije ($\chi^2 = 6,58$, $p = 0,009$). Makroadenomi su bili češći u obe grupe ispitanika, nije bilo razlike u zastupljenosti funkcijskih u odnosu na nefunkcijske tumore među grupama ($\chi^2 = 1,01$, $p = 0,23$). Najčešći tumor u grupi MEN1 fenokopija je bio somatotrofni adenom, dok je u grupi nosilca mutacije najčešći tumor bio prolaktinom (tabela 13).

Tabela 13. Kliničke karakteristike pacijenata sa tumorima hipofize u grupi nosilaca MEN1 mutacije i MEN1 fenokopije

	Nosioci mutacije	MEN1 fenokopija	<i>P</i>
n/N (%)	30/53 (56,6%)	29/35 (82,9%)	0,009
Starost (godine)*	31,9 ± 13,8	50,0 ± 12,2	< 0,001
NF tumori, n/N (%)	12/30 (40%)	8/29 (27,6%)	0,23
Prolaktinom, n/N (%)	14/30 (46,7%)	6/29 (20,7%)	0,03
Akromegalija, n/N (%)	1/30 (3,3%)	12/29 (70%)	< 0,001
Makroadenom, n/N (%)	17/30 (56,7%)	20/29 (70%)	0,24

* vrednosti prikazane kao aritmetička sredina ± standardna devijacija; NF tumori – nefunkcijski tumori

Neuroendokrini tumori pankreasa su se gotovo isključivo javljali u grupi nosilaca *MEN1* mutacije. Prosečna starost ispitanika u trenutku dijagnoze je bila statistički značajno manja u grupi nosilaca mutacije nego u grupi MEN1 fenokopije ($t = 2,43$, $p = 0,04$). Nefunkcijski tumori pankreasa su bili najčešći, potom gastrinom i insulinom, dok su se ostali tumori pankreasa (somatostatinom, VIP-om, glukagonom, MiNEN) javljali samo sporadično. Multipli tumori pankreasa nađeni su u 58.3% pacijenata sa MEN1 mutacijom (tabela 14).

Tabela 14. Kliničke razlike pacijenata sa pNET u grupi nosilaca MEN1 mutacije i MEN1 fenokopija

	Nosioci mutacije	MEN1 fenokopija	<i>P</i>
n/N (%)	24/53 (45,3%)	3/35 (8,6%)	< 0,001
Starost (godine)*	41,0 ± 13,5	58,3 ± 10,6	0,04
Multipli tumori, n/N (%)	14/24 (58,3%)	1/3 (33,3%)	0,56
NF-pNET, n/N (%)	10/24 (41,7%)	3/3 (100%)	0,09
Gastrinom, n/N (%)	7/24 (29,2%)	/	0,40
Insulinom, n/N (%)	7/24 (29,2%)	/	0,39
Somatostatinom, n/N (%)	2/24 (8,3%)	1/3 (33,3%)	0,31

VIP-om, n/N (%)	1/24 (4,2%)	/	0,89
Glukagonom, n/N (%)	1/24 (4,2%)	/	0,89
MiNEN, n/N (%)	1/24 (4,2%)	/	0,89

*Rezultat prikazan kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija; NF-pNET – nefunkcijski neuroendokrini tumori pankreasa, MiNEN – miksna neuroendokrina – neneuroendokrina neoplazma

Neuroendokrini tumori bronha su bili statistički značajno zastupljeniji u grupi MEN1 fenokopija ($\chi^2 = 4,42$, $p = 0,03$). Starost u trenutku dijagnoze brNET bila je statistički značajno manja u grupi pacijenata sa mutacijom u *MEN1* genu nego u grupi fenokopija ($\chi^2 = 2,34$, $p = 0,03$). Nije bilo razlike u zastupljenosti pojedinih vrsta brNET (tipični, atipični karcinoid, SCLNEC) (tabela 15).

Tabela 15. Karakteristike pacijenata sa brNET u grupi nosilaca *MEN1* mutacije i MEN1 fenokopija

	Nosioci mutacije	MEN1 fenokopija	P
n/N (%)	8/53 (15,1%)	12/35 (34,3%)	0,03
Starost (godine)*	43,5 \pm 10,6	56,6 \pm 11,3	0,02
TK, n/N (%)	4/8 (50%)	4/12 (33,3%)	0,61
AK, n/N (%)	3/8 (37,5%)	6/12 (50%)	0,24
SCLNEC, n/N (%)	1/8 (12,5%)	2/12 (16,7%)	0,61

* Rezultat prikazan kao aritmetička sredina \pm standardna devijacija; TK – tipični karcinoid, AK – atipični karcinoid, SCLNEC – sitnoćelijski neuroendokrini karcinom pluća

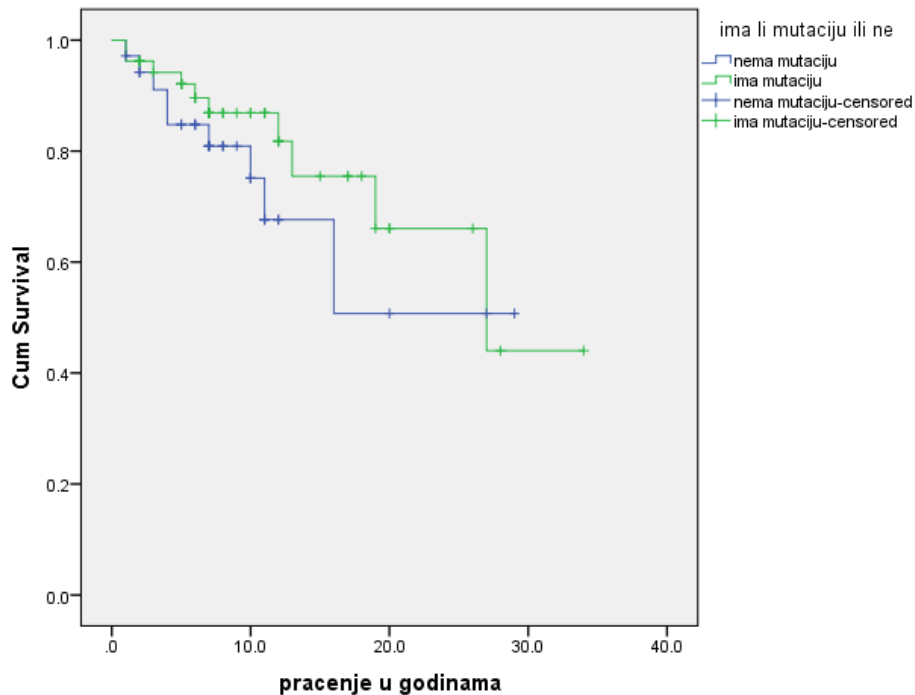
Tumori nadbubrega su se podjednako učestalošću javljali u obe grupe pacijenata (11/53 (20,8%) u grupi pacijenata sa mutacijom i 4/35 (11,4%) u grupi pacijenata sa MEN1 fenokopijom). Nije bilo razlike u starosti ispitanika kada je tumor dijagnostikovao (47,7 \pm 11,2 u grupi mutiranih, odn. 55,5 \pm 9,8 godina u grupi MEN1 fenokopija).

Nije bilo razlike u učestalosti tumora van endokrinog sistema među grupama (10/53 (18,9%) u grupi mutiranih i 7/35 (20%) u grupi pacijenata sa MEN1 fenokopijom (tabela 6).

4.5. Mortalitet i preživljavanje

Tokom perioda praćenja od 6.9 ± 5.8 godina, 19/102 (18.6%) pacijenata je umrlo: 10/67 (14.9 %) nosilaca mutacije i 9/35 (25.7 %) pacijenata sa MEN1 fenokopijom. Ukupno preživljavanje za celu grupu iznosilo je 28.4 godinu (95%CI 22.6 – 33.9 godina) (grafikon 9). Nije bilo razlike u starosti u trenutku smrti ($56,4 \pm 15,3$ godine kod nosilaca i $67,3 \pm 9,5$ kod MEN1 fenokopija, $p= 0,08$) i ukupnom preživljavanju između nosilaca mutacije (31,6 godina (95%CI 24,6 – 38,5 godina) i pacijenata sa MEN1 fenokopijom (18,9 godina (95%CI 13,4 – 24,3%).

Osim dva pacijenta sa mutacijom u MEN1 genu koji su umrli zbog kardiovaskularnog uzroka, 17/19 (89.4 %) pacijenata je umrlo zbog malignog tumora a 5/17 (29.4%) je umrlo zbog tumora van endokrinog sistema (tabela 16). BrNET je bio uzrok smrti kod 3/10 (33.3%) pacijenata sa mutacijom u MEN1 genu, odn. 7/9 (77.8%) pacijenata sa MEN1 fenokopijom ali nisu uticali na ukupno preživljavanje pacijenata sa MEN1 mutacijom (16.8 godina (95%CI 8.9 – 24.4) kod pacijenata sa brNET odn. 25.8 godina (95%CI 20.7 – 30.9) kod pacijenata bez brNET, $p= 0.11$). Nasuprot tome, u grupi pacijenata sa MEN1 fenokopijom, brNET je značajno skratio ukuno preživljavanje afektiranih pacijenata (9.3 godina (95%CI 5.8 – 12.8) sa brNET odn. vs. 27.8 godina (95%CI 25.6 – 30.1) bez brNET, $p<0.001$) (grafikon 10).



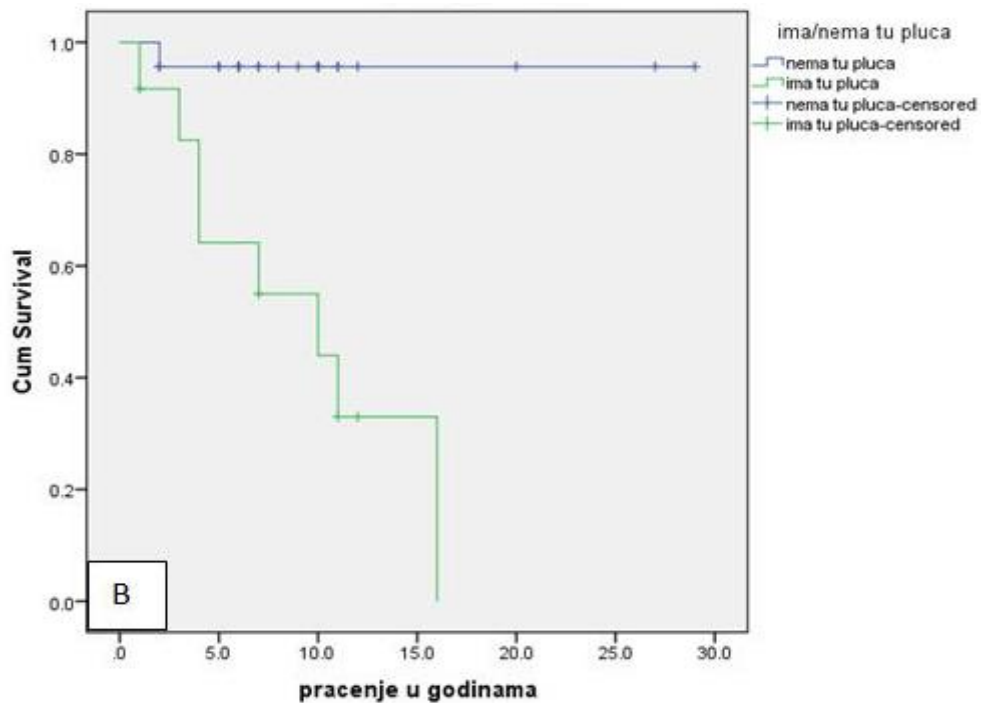
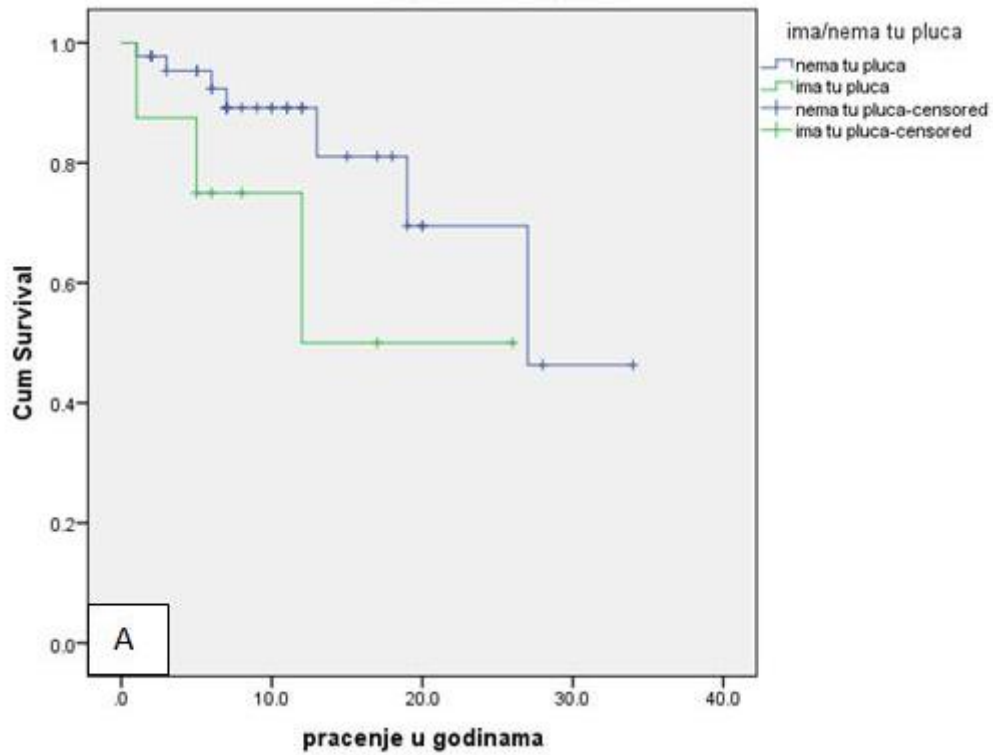
Grafikon 9. Ukupno preživljavanje pacijenata u odnosu na postojanje mutacije

Tabela 16. Uzroci smrti pacijenata sa MEN1 sindromom

Pacijent	Uzrok smrti	MEN1 status
1	Metastatski karcinom dojke	Nosilac mutacije
2	Pleuralni mezoteliom	Nosilac mutacije
3	Infarkt miokarda	Nosilac mutacije
4	Metastatski AK	Nosilac mutacije
5	Metastatski AK	MEN1 fenokopija
6	Metastatski AK	Nosilac mutacije
7	Metastatski SCLNEC	Nosilac mutacije
8	Metastatski pNET	Nosilac mutacije
9	Lejomiosarkom uterusa	Nosilac mutacije
10	tNET	Nosilac mutacije
11	Cerebrovaskularni insult	Nosilac mutacije
12	Hondroidni hordom	MEN1 fenokopija
13	HHM, metastatski AK	MEN1 fenokopija

14	Metastatski AK	MEN1 fenokopija
15	Metastatski AK	MEN1 fenokopija
16	SCLNEC	MEN1 fenokopija
17	Adenokarcinom pankreasa	MEN1 fenokopija
18	SCLNEC	MEN1 fenokopija
19	Metastatski AK	MEN1 fenokopija

AK – atipični karcinoid, SCLNEC – sitnoćelijski neuroendokrini karcinom pluća, pNET – neuroendokrini tumor pankreasa, tNET – neuroendokrini tumor timusa, HHM – humoralna hiperkalcemija u malignitetu



A: pacijenti sa mutacijom u MEN1 genu. B: pacijenti sa MEN1 fenokopijom

Grafikon 10. Ukupno preživljavanje u odnosu na postojanje brNET

4.6. Prediktori mutacije u *MEN1* genu

Kao statistički značajni klinički prediktori *MEN1* mutacije izdvojile su sledeće varijable: ženski pol, godine u trenutku dijagnoze, postojanje tumora hipofize, pNET, akromegalije, prolactinoma i poliglandularna bolest paraštitastih žlezda (tabela 17).

Tabela 17. Univarijantna logistička regresiona analiza kliničkih prediktora *MEN1* mutacije

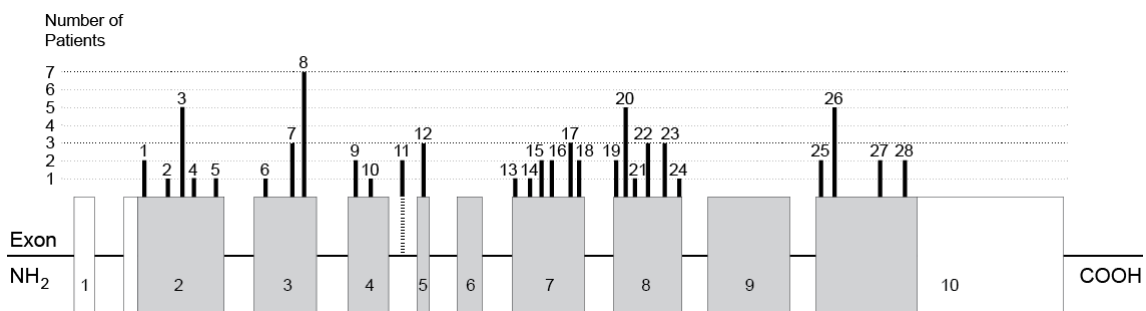
Model	B (SE)	ExpB (95%CI)	P
<i>Konstanta</i>	0.03 (0.26)		
Ženski pol	1.45 (0.56)	4.26 (1.43 – 12.7)	0.01
<i>Konstanta</i>	4.75 (1.03)		
Starost	-0.09 (0.02)	0.91 (0.88 - 0.95)	0.00
<i>Konstanta</i>	1.34 (0.46)		
PA	-1.31 (0.53)	0.27 (0.10 – 0.76)	0.01
<i>Konstanta</i>	-0.09 (0.26)		
pNET	2.18 (0.67)	8.83 (2.40 – 32.43)	0.00
<i>Konstanta</i>	0.67 (0.26)		
brNET	-1.08 (0.52)	0.34 (0.12 – 0.95)	0.04
<i>Konstanta</i>	0.53 (0.31)		
Akromegalija	-3.02 (1.09)	0.05 (0.01 – 0.41)	0.01
<i>Konstanta</i>	-0.36 (0.32)		
Prolaktinom	1.21 (0.59)	3.35 (1.06 – 10.59)	0.04
<i>Konstanta</i>	-0.51 (0.52)		
Poliglandularni PHPT	3.69 (1.14)	40 (4.25 – 376.43)	0.00

PA – pituitarni adenoma, pNET – neuroendokrini tumor pankreasa, brNET – neuroendokrini tumor bronha, PHPT – primarni hiperparatiroidizam

4.7. Mutacije u *MEN1* genu

Ukupno je identifikovano 28 različitih tačkastih mutacija duž kodirajućeg dela *MEN1* gena, jedna intronska mutacija i jedna velika delecija 8. egzona (tabela 18). Mutacije su nađene kod članova 31 različite *MEN1* porodice, što govori o odsustvu interfamilijarnih veza.

Devetnaest (65,5%) mutacija je za efekat imalo skraćenje proteina. Identifikovano je 11 (37,9%) *frameshift*, 9 (31%) *missense*, 6 (20,7%) *nonsense*, 1 (3,5%) *in-frame* delecija i 1 (3,5%) *splice-site* mutacija. Mutacije su raspoređene duž čitavog kodirajućeg regiona *MEN1* gena, bez formiranja “*hot-spotova*” (slika 6).



Egzoni su obeleženi brojevima 1 – 10. Zasenčeni deo gena predstavlja kodirajući region, netranslatirani delovi su prikazani belim pravougaonicima. Germinativne mutacije su prikazane vertikalnim linijama, a skala sa leve strane predstavlja broj afektiranih pacijenata. Brojevi pored vertikalnih linija predstavljaju mutacije na sledeći način: 1- M1V; 2- Y77X; 3- 359_362del4; 4- 247delC; 5- H139R; 6- C165Y; 7- A176S; 8- P188L; 9- W220G; 10- 865del4; 11- IVS4as -1G→A; 12- 794_802del9; 13- 941delG; 14- H317Y; 15- 960delG; 16- 1088_1095del7; 17- 979delT; 18- W341X; 19- E392X; 20- E358X; 21- R355W; 22- Q395X; 23- Y351H; 24- 1184_1185insA; 25- 1473_1483del10; 26- 1546_1547insC; 27- R527X; 28- 1602_1618del17. Velika delecija 8 egzona (*MEN1ex8del*) nije prikazana na grafikonu

Slika 6. Identifikovane mutacije, frekvencija i pozicija u *MEN1* genu

Tabela 18. Mutacije i efekti mutacija identifikovanih u *MEN1* genu

	Mutacija	Egzon	Kodon	Pozicija	Bazni parovi	Tip mutacije	Efekat mutacije
1	960delG	7	321	1072delG	AT(G)	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
2	1088_1095del7	7	326	978_985delCTGTCGC	CA(CTGTCGC)A AC	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
3	1473_1483del10	10	455	1363_1373delGTGCGC ATAG	AAG(GTGCGCA TAG)TGAGC	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
4	359_362del4	2	83	249_252delGTCT	CT(GTCT)ATC	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
5	979delT	7	327	1089delT	(T)AC	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
6	1546_1547insC	10	516	1650insC	CCCCCCC(/C)GG	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
7	941delG	7	314	1051delG	TATC(G)GGAT	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
8	1602_1618del17	10	534	1712delGGCTCAGGTG CCAGCAC	AGCAC(GGCTC AGGTGCCAGCA C)CC	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
9	247delC	2	83	358delC	GAC(C)TGTCT	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
10	1184_1185insA	8	395	1285insA	AGCCA(/A)G	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
11	865del4	4	252	756_759delCTCG	ACCGA(CTCG)C TG	<i>Frameshift</i>	skraćen protein
12	MEN1ex8del	8			ne zna se pozicija	<i>in-frame</i>	velika del. egzona

13	794_802del9	5	265	789delGGCTGCTCT	T(GGCTGCTCT) AT	delecija <i>in-frame</i> delecija	8 skraćen protein
14	W220G	4	220	Trp220Gly	TGG→GGG	<i>Missense</i>	zamena aminokiselina
15	Y351H	8	351	Tyr351His	TAC→CAC	<i>Missense</i>	zamena aminokiselina
16	P188L	3	188	Pro188Leu	CCC→CTC	<i>Missense</i>	zamena aminokiselina
17	H139R	2	139	His139Arg	CAC→CGC	<i>Missense</i>	zamena aminokiselina
18	R355W	8	355	Arg355Trp	CGG→TGG	<i>Missense</i>	zamena aminokiselina
19	H317Y	7	317	His317Tyr	CAC→TAC	<i>Missense</i>	zamena aminokiselina
20	A176S	3	176	Ala176Ser	GCC→TCC	<i>Missense</i>	zamena aminokiselina
21	C165Y	3	165	Cys165Tyr	TGC→TAC	<i>Missense</i>	zamena aminokiselina
22	M1V	2	1	Met1Val	ATG→GTG	<i>Missense</i>	zamena

							aminokiselina
23	E392X	8	392	Glu393Term	GAG→TAG	<i>Nonsense</i>	skraćen protein
24	Y77X	2	77	Tyr77Term	TAC→TAA	<i>Nonsense</i>	skraćen protein
25	E358X	8	358	Glu358Term	GAG→TAG	<i>Nonsense</i>	skraćen protein
26	W341X	7	341	Trp341Term	TGG→TAG	<i>Nonsense</i>	skraćen protein
27	Q395X	8	395	Gln395Term	CAG→TAG	<i>Nonsense</i>	skraćen protein
28	R527X	10	527	Arg527Term	CGA→UGA	<i>Nonsense</i>	skraćen protein
29	IVS4 as -1G→A	intron 4	262	784-1G→A	TAG→TAA	<i>splice site</i>	skraćen protein

Šest mutacija je po prvi put opisano, do sada nisu prijavljene u svetskoj bazi podataka (*Humane Gene Mutation Database, HGMD*). Njihove karakteristike i kosegregirajući fenotip prikazani su u tabeli 19.

Tabela 19. Karakteristike 6 novooktivenih mutacija i velike delecije 8. egzona

Mutacija	Egzon	Zamena nukleotida	Tip	Fenotip (starost)
W220G	4	TGG→GGG	<i>Missense</i>	IS: PHPT (52), AA (52) ČP: pNET (30)
941delG	7	TATC(G)GGAT	<i>Frameshift</i>	IS: PA (28), pNET (29)
1088_1095del7	7	CA(CTGTCGC)AAC	<i>Frameshift</i>	IS: pNET (31), PHPT (52), tNET (54) ČP: Asimpt. (19)
1184_1185insA	8	AGCCA(/A)G	<i>Frameshift</i>	IS: PA (61), PHPT (63)
1473_1483del10	10	AAG(GTGCGCATAG)TG AGC	<i>Frameshift</i>	IS: pNET (51), PHPT (51), AA (51), PA (52) ČP: pNET (30)
1602_1618del17	10	AGCAC(GGCTCAGGTGC CAGCAC)CC	<i>Frameshift</i>	IS: PHPT (25) ČP: PHPT (50), brNET (52), AA (52)
MEN1ex8del*	8	Precizna pozicija i broj deletiranih parova nije poznat	<i>In-frame delecija</i>	IS: PA (19), PHPT (22)

IS – indeksni slučaj, ČP – član porodice, brNET – bronhijalni neuroendokrini tumor, PA – pituitarni adenom, Asimpt – asimptomatski, PHPT – primarni hiperparatiroidizam, AA – adrenalni adenom, pNET – pankreasni neuroendokrini tumor, tNET – neuroendokrini tumor timusa

Najčešća mutacija je bila P188L misens mutacija identifikovana kod 5 (7.9%) indeksnih slučajeva. Svi pacijenti su imali prisutan samo tumor hipofize, bez drugih komponenti MEN1 sindroma, dok su članovi njihovih porodica bili asimptomatski nosioci. Uprkos tome, P188L mutacija nije bila prediktivna za nastanak tumora hipofize ($p=0.07$).

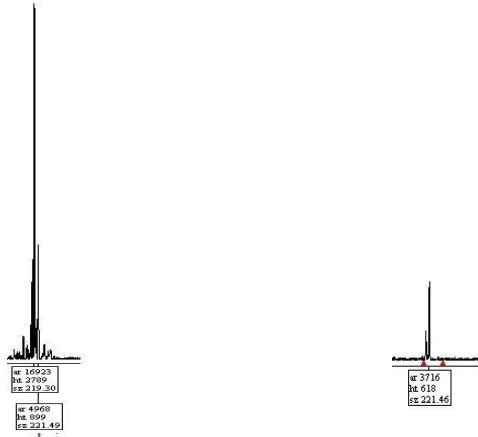
Nije nađena korelacija između pozicije (egzon) ili tipa mutacije sa fenotipom i starošću kada je tumor dijagnostikovao ($p > 0,05$). Mutacije koje dovode do skraćanja proteina su nađene značajno češće kod pacijenata sa pNET nego kod pacijenata bez pNET (20 (83.3%) odn. 4 (16.7%), $p= 0.003$; OR=5.8, 95% CI 1.7 – 19.7%). Većina ovih mutacija nalazila se u egzonima 7, 8 i 10 (kodoni 314 – 527). Tip pankreasnog neuroendokrinog tumora nije korelirao sa efektom mutacije ($p > 0.05$). Mutacije koje dovode do skraćanja proteina su bile značajno češće i kod pacijenata sa primarnim hiperparatiroidizmom (31 (72.1%) kod pacijenata sa PHPT i 12 (27.9%) bez PHPT, $p=0.006$; OR= 4.3, 95% CI 1.5 – 12.4%), raspoređenje duž čitavog kodirajućeg regiona *MEN1* gena. Nije bilo razlike u postojanju mutacija koje dovode do skraćanja proteina u odnosu na postojanje tumora hipofize, brNET ili tumora nadbubrega ($p > 0.05$).

4.8. Gubitak heterozigotnosti 11q13 lokusa u tumorima

Ukupno je analizirano 42 tumorska tkiva, ali je izolacija DNK i analiza gubitka heterozigotnosti 11q13 bila uspešna u 34 tkiva. Analizirano je 9 uzoraka neuroendokrinih tumora pankreasa, uključujući i dva uzorka sa nezidioblastozom, 11 uzoraka adenoma/hiperplazije paraštitastih žlezda, 2 uzorka tumora nadbubrega, 1 uzorak karcinoma dojke, 1 uzorak papilarnog karcinoma, 1 uzorak lipoma, 2 uzorka tumora nadbubrega, 1 uzorak neuroendokrinog tumora timusa, 2 uzorka neuroendokrinog tumora pluća, 3 uzorka adenoma hipofize, 1 uzorak neuroendokrinog tumora duodenuma. Primer gubitka heterozigotnosti lokusa 11q13 u tkivu insulinoma jednog od ispitanika prikazan je na slici 7. Rezultati analize tkiva za sve pacijente prikazani su u tabeli 20.

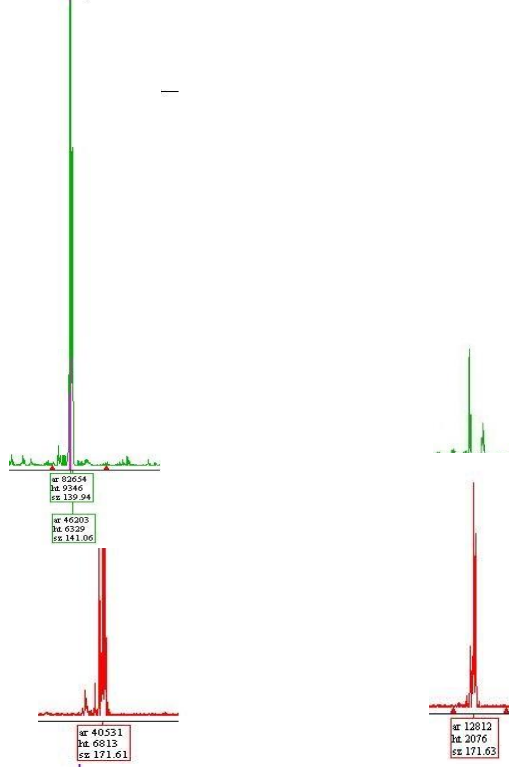
Marker	Zdrava kontrola	Tumorsko tkivo
D11S480 AIR = 0,9	<p> m/z 21469 Rel. 3,592 Rel. 106,39 m/z 13770 Rel. 26,10 Rel. 193,99 </p>	<p> m/z 6105 Rel. 997 Rel. 193,04 m/z 5907 Rel. 1004 Rel. 196,53 </p>
D11S1883 AIR = 1,1	<p> m/z 34172 Rel. 6443 Rel. 102,09 m/z 33911 Rel. 3996 Rel. 214,96 </p>	<p> m/z 17044 Rel. 2007 Rel. 253,23 m/z 16807 Rel. 1497 Rel. 255,00 </p>
PYGM AIR = 1,4	<p> m/z 44356 Rel. 3024 Rel. 102,04 m/z 44097 Rel. 4002 Rel. 171,79 </p>	<p> m/z 36978 Rel. 4000 Rel. 162,03 m/z 36719 Rel. 1823 Rel. 171,09 </p>
D11S449 Homozigot	<p> m/z 4170 Rel. 184,03 </p>	<p> m/z 40307 Rel. 4024 Rel. 124,78 </p>

D11S913
GH

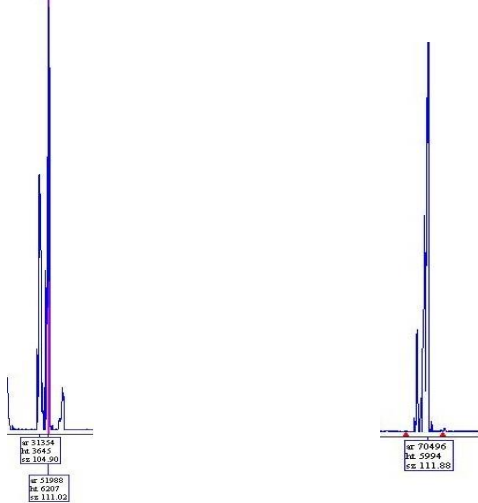


D11S4936
AIR = 0,5

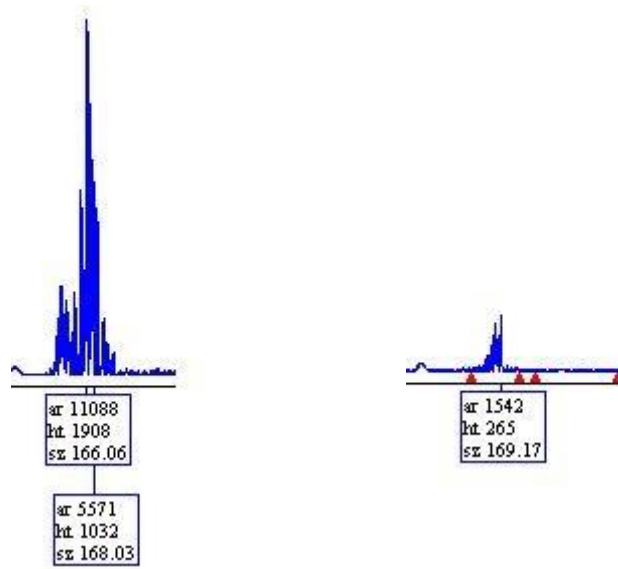
D11S599
Homozigot



D11S4907
GH



D11S4908
GH



Slika 7. Gubitak heterozigotnosti 11q13 u tkivu insulinoma

Tabela 20. Rezultati gubitka heterozigotnosti 11q13 za sva analizirana tkiva

Pacijent	Tkivo	D11S4907	D11S4908	D11S913	D11S599	D11S480	D11S1883	PYGM	D11S449	D11S4936
Pacijent 1		Homo								
1	Insulinoma	◆	◆	◆	NI	◇	◇	◇	NI	◆
2	Nezidioblastoza	◆	◇	◇	◇	◇	◇	◇	NI	◇
3	Tu nadbubrega	◆	◇	◇	NI	◇	◇	◇	NI	◇
4	NF-dNET	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	NI	◇
Pacijent 2		Homo								
5	PT hiperplazija	◆	◆	NI	◆	◆	NI	◆	NI	NI
6	NF-pNET	◆	-	NI	◆	-	NI	◆	NI	NI
Pacijent 3		Homo								
7	PT adenoma	◇	-	◇	NI	◆	◇	◇	◇	NI
Pacijent 4		Homo								
8	PT hiperplazija	◇	◇	◇	NI	◇	◇	◇	◇	◆
9	NF-pNET	◆	◆	◆	NI	◆	◇	◇	◆	◇

	10	PTC	◆	◇	◇	NI	-	-	◇	◇	◆
	11	Tu nadbubrega	◆	◇	NI	NI	◇	◆	◇	◆	NI
Pacijent 5				Homo	Homo						Homo
	12	tNET	◇	NI	NI	◆	◇	◇	◆	NI	NI
	13	Glukagonom	◆	NI	NI	◆	◆	◆	NI	NI	NI
	14	Vipom	◆	NI	NI	◇	NI	◆	◇	NI	NI
	15	PT adenoma	◆	◇	NI	◇	◆	◆	◆	NI	NI
Pacijent 6				Homo	Homo	Homo		Homo			
	16	PT adenoma	◇	◇	NI	◇	◇	NI	◇	NI	◇
	17	NF-pNET	◇	NI	NI	NI	◇	◇	◇	NI	◆
	18	Insulinoma	◇	NI	◇	◇	◇	NI	◆	NI	◆
	19	Nezidioblastoza	◇	◆	◇	◇	◇	NI	◇	NI	◇
	20	Tu hipofize	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇
Pacijent 7							Homo				
	21	PT hiperplazija	◇	-	◇	NI	-	◆	-	◇	◇

22	PT adenoma	◆	◇	◇	◇	NI	NI	◇	◇	◇
23	Tu hipofize	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇
Pacijent 8										
24	PT adenoma	◇	◇	◇	◇	◇	NI	◇	◇	◇
25	br NET1	◇	◇	◇	NI	◇	◇	◇	◇	◇
26	brNET2	NI	◇	◇	◇	◇	◇	NI	◇	◇
Pacijent 9										
27	AdenoCa dojke	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◆
28	PT adenoma	◇	NI	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◆
29	Lipoma	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇
Pacijent 10										
30	Tu hipofize	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇	◇

◆ - GH, ◇ - retencija genetskog materijala, NI – nije informativno, - nije dostupan rezultat

Na samom početku diskusije treba istaći da se ova studija razlikuje od svih drugih po tome što je uključila i pacijente koji formalno ne zadovoljavaju važeće kliničke kriterijume za MEN1 sindrom - tzv. "3P" kriterijume. Pored klasičnih tumora iz 3P grupe, MEN1 sindrom odlikuje izrazita fenotipska varijabilnost uzrokovana pojavom preko 20 različitih kombinacija endokrinih i ne-endokrinih tumora [112]. Zbog ovako izražene fenotipske varijabilnosti multitumorskog sindroma, u studiju je uključeno i 17 indeksnih pacijenata koji formalno nisu zadovoljili 3P kriterijume, ali su imali udruženu pojavu 3P tumora sa nekim drugim neuroendokrinim tumorom, ili solitarni "non-3P" tumor dijagnostikovao kod mladog pacijenta – tzv. atipični MEN1 sindrom.

Sam pojam atipičnog MEN1 sindroma je loše definisan. U važećem vodiču za dijagnozu i lečenje MEN1 sindroma pod atipičnim MEN1 sindromom podrazumeva se udružena pojava klasičnog MEN1-tumora (3P tumora) i tumora netipičnog za sindrom, poput kombinacije primarnog hiperparatiroidizma i tumora nadbubrega [35]. U literaturi postoji samo jedna studija koja se bavi karakterizacijom pacijenata sa atipičnim MEN1 sindromom, ali i ova studija je analizirala pacijente koji su uglavnom imali dva od tri klasična MEN1-tumora i pridružen netipični tumor [113]. Praktično ne postoji nijedna studija koja je za inkluzioni kriterijum odabrala i atipični MEN1.

U našoj seriji, 41.2% pacijenata koji su se incijalno prezentovali atipičnom formom bolesti, je imalo mutaciju u *MEN1* genu. Uključenjem ovih pacijenata broj indeksnih slučajeva sa mutacijom u *MEN1* genu povećan je za više od 20%, nego da su regrutovani pacijenti sa striktno zadovoljenim 3P kriterijumima. Na ovaj način se i broj asimptomatskih nosilaca mutacije povećao za skoro 30%. Ovo je sa jedne strane omogućilo pravovremeno i adekvatno praćenje i lečenje ovih pacijenata, ali je uticalo i na ukupan broj MEN1 pacijenata.

Činjenica da je Klinika za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma jedina ustanova u kojoj je moguće sprovesti analizu *MEN1* gena, omogućila je izračunavanje prevalencije MEN1 sindroma u našoj zemlji. Prevalencija genetski dokazanog MEN1 sindroma iznosi 0,85 obolelih na 100.000 stanovnika. Ovaj broj je nešto manji nego u literaturi i razlog verovatno leži u činjenici da genetsko testiranje pacijenata nije obavezno, te da određeni broj članova porodice odbija da se testira. Članovi MEN1 porodica dijagnostikovanih u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma podležu periodičnom skriningu i proveru iako su odbili testiranje, tako da se verovatno radi o određenom broju pre svega asimptomatskih nosilaca mutacije. Sa druge strane, budući da se radi o retkoj bolesti na koju se najčešće ne misli, moguće da je deo pacijenata ostao neprepoznat, a da se leče pod dijagnozama pojedinačnih tumorskih komponenti sindroma.

Ukoliko se gleda prevalencija po polu, nešto je izraženija među ženama i ovo odgovara literaturnim podacima. Najveći broj pacijenata nalazio se u starosnoj grupi od 30 – 39 godina, što odgovara podacima u literaturi kada se dijagnoza MEN1 najčešće i postavlja.

Među analiziranim pacijentima, mutacija u *MEN1* genu nađena je kod 53,3% indeksnih slučajeva, a u 65,7% kod ukupnog broja pacijenata. To praktično znači da je u 40,3% pacijenata sa mutacijom u *MEN1* genu bolest otkrivena zahvaljujući skriningu porodice. Nešto više od polovine članova porodice (51,9%) nije imalo ispoljenu bolest u trenutku dijagnoze, što je omogućilo blagovremeno planiranje početka i načina praćenja asimptomatskih pacijenata. Ovi pacijenti su bili značajno mlađi nego pacijenti sa klinički ispoljenim tumorima ($16,5 \pm 13,6$ odn. $44,9 \pm 16,3$ godine), što znači da je genetska dijagnoza MEN1 sindroma u našoj kohorti prosečno predhodila kliničkoj za 28,4 godine.

Studije su nesumnjivo pokazale da rani skrining usled pravovremenog lečenja omogućava bolji dugoročni ishod bolesti [114,115]. Biohemijski skrining omogućava detekciju MEN1-tumora dve ili tri dekade pre nego što se bolest klinički ispolji [112,116]. Sa druge strane, za očekivati bi bilo da je i mortalitet niži, ipak, ne postoje studije koje su eksplicitno pokazale da rana diagnostika dovodi do smanjenja ukupnog mortaliteta MEN1 pacijenata [114,117,35]. Jedna od prvih studija koje su se bavile

efektom ranog skrininga na ukupni morbiditet i mortalitet u MEN1 pacijenata bila je studija Skogsajda i sar. 1998. godine. Rana dijagnoza tumora jasno je smanjila morbiditet od određenih bolesti ali efekat rane dijagnostike na ukupni mortalitet nije ni potvrđen ni opovrgnut [114]. Ipak, druge retrospektivne studije su pokazale da se najveći benefit od ranog skrininga ogleda u profilaksi nastanka pojedinih tumora, što se najbolje vidi na primeru profilaktičke timektomije koja redukuje učestalost najmalignijeg među MEN1 tumorima, karcinoida timusa [118]. Takođe je pokazano da odlaganje hirurgije nefunkcijskih pNET za godinu dana povećava verovatnoću za nastanak metastaza za 6%, što je u direktnoj vezi sa pravovremenom dijagnozom pNET i kasnijom prognozom bolesti [36].

Prosečna starost u trenutku dijagnoze MEN1 sindroma kod naših pacijenata u skladu je sa ranije objavljenim podacima [41,13,112]. Naizgled je paradoksalan rezultat da je starost u trenutku postavljanja dijagnoze niža od starosti u trenutku početka bolesti. Ovakav nalaz uslovljen je direktnim uticajem relativno velikog broja asimptomatskih pacijenata kod kojih je genetska dijagnoza bolesti postavljena vrlo rano (prosečno 16.5 godina). Najmlađi pacijent sa ispoljenom kliničkom slikom imao je 13 godina, a inicijalni tumor je bio nefunkcijski tumor hipofize. I ovo je u skladu sa literaturnim podacima, budući da tumori hipofize predstavljaju najraniju manifestaciju MEN1 sindroma, što je verovatno i razlog zbog kojeg je period do dijagnoze drugog MEN1-tumora značajno duži kada je inicijalna lezija tumor hipofize, nego kada su inicijalne lezije PHPT ili pNET [46]. Najmlađi ikada opisan pacijent sa MEN1 sindromom je upravo pacijent sa tumorm hipofize [47].

Kao i u drugim studijama, i mi smo pokazali da se MEN1 sindrom nešto češće javlja kod žena nego kod muškaraca, 69% prema 31% u našoj kohorti [119,112,13]. Ovakav nalaz nije u skladu sa činjenicom da se MEN1 nasleđuje autozomno-dominantno, te da je za očekivati da su oba pola podjednako zastupljena. Sličan odnos je zabeležen i u grupi asimptomatskih pacijenata (71% prema 29%), što znači da nije uslovljen polnom predilekcijom za postojanje određenih vrsta tumora, poput tumora hipofize koji se češće javljaju kod žena. Međutim, komparativna analiza pacijenata sa i bez mutacije moguća nam je da po prvi put uočimo da je odnos žena prema muškarcima u grupi pacijenata bez mutacije, odn. u MEN1 fenokopijama, značajno

drugačiji, 86% prema 14% u korist žena. Ovakav rezultat u grupi MEN1 fenokopija verovatno je uslovljen distribucijom polova u našoj populaciji, a da upravo postojanje autozomno-dominantne mutacije dovodi do atenuacije ovog odnosa. Ranije je pokazano da pol ima značajnu ulogu u fenotipskoj ekspresiji MEN1 sindroma. Žene imaju veću verovatnoću da obole od tumora hipofize a muškarci od Colinger-Elisonovog sindroma, oba pola nose isti rizik da obole od PHPT, dok je rizik za pNET veći kod muškaraca [119]. Karcinidi timusa se gotovo isključivo javljaju kod muškaraca, brNET su podjednako zastupljeni u oba pola, ali je vreme udvostručavanja tumora dvostruko kraće kod žena [13].

Klinički manifestna bolest je pokazana u 86,3% pacijenata. Ukupno je identifikovano 13 raličitih MEN1 fenotipova. Najčešći fenotipovi su bili PA/PHPT i to dominantno na račun MEN1 fenokopija, potom PA/PHPT/dpNET koji se isključivo javljao kod nosilaca mutacije, PA/dpNET, solitarni PHPT i PHPT/brNET.

Glavne MEN1 komponente su se javljale sa sličnom učestalošću kao u literaturi, s tim da su tumori hipofize u našoj kohorti bili znatno češći nego u drugim studijama: Verže i sar. 42%, O Brajan i sar. 43%, Oberg i sar. 42%, Skogsajd i sar. 20% [46,120-122]. Sa druge strane, naš rezultat je u skladu sa prevalencijom tumora hipofize od 65% u autopsijskoj studiji na MEN1 pacijentima [123].

Najčešći neklasičan MEN1-tumor bio je brNET, koji je dijagnostikovao u 23% pacijenata. BrNET je bio značajan uzrok smrti kod naših pacijenata (30% uzroka) ali nije uticao na ukupno preživljavanje pacijenata. Sličan podatak pokazan je i u do sada najvećoj studiji koja je ispitala učestalost brNET na 1023 MEN1 pacijenata, s tim da je učestalost brNET bila daleko manja nego u našoj studiji (15,1% među nosiocima mutacije u našoj studiji i 4,8% u GTE studiji) [54]. Razlog ovome leži u selekciji pacijenata koja je podrazumevala pacijente sa isključivo zadovoljenim 3P kriterijumima, za razliku od naše studije. Sa druge strane, brNET su značajno skratili preživljavanje MEN1 fenokopija, verovatno usled većeg broja SCLNEC čije je prosečno preživljavanje 7 meseci od postavljanja dijagnoze [124].

Tumori nadbubrega su se javljali sa učestalošću od 17% pacijenata i najčešće su bili udruženi sa PA/PHPT/dpNET fenotipom. Učestalost tumora nadbubrega u MEN1

varira među studijama od 9 do 73% usled korišćenja različitih dijagnostičkih metoda i različitih kriterijuma za uvećanje nadbubrega. Kao što je opisano u uvodnom delu ove teze, MEN1 tumori nadbubrega se razlikuju od sporadičnih tumora nadbubrega i u pogledu sekrecije i u pogledu malignog potencijala, te je moguće da se ipak radi o dva odvojena entiteta [51]. Ipak, nedostaju studije gubitka heterozigotnosti na tumorima nadbubrega koje bi ovo i potvrdile.

U ostale retke tumore dijagnostikovane među našim pacijentima spadaju i ekstra-adrenalni paragangliom i *DIPNECH*. I ekstraadrenalni paragangliom i *DIPNECH* predstavljaju izuzetno retku pojavu u MEN1 sindromu i do su sada opisani samo u po jednog pacijenta [125,126]. Ni u jednom od ova dva slučaja nisu sprovedene studije gubitka heterozigotnosti, koje bi potvrdile da je gubitak funkcije menina odgovoran za inicijaciju tumorigeneze.

Velike studije o prevalenciji ne-endokrinih tumora u MEN1 sindromu ne postoje. Izuzetak je za sada najveća studija sprovedena od strane Internacionalne grupe za izučavanje karcinoma dojke u MEN1, kojom je pokazano da relativni rizik za nastanak karcinoma dojke u MEN1 pacijentkinja iznosi 2,83 ($p < 0,001$). Prosečna starost u trenutku dijagnoze iznosila je 48.0 ± 8.8 godina, što je značajno niže u poređenju sa pojavom karcinoma dojke u opštoj populaciji (60 – 65 godina) [127]. Karcinom dojke je u našoj kohorti bio zastupljen sa 4.5%, što odgovara podacima u gore navedenoj studiji (6,5%). Najčešći ne-endokrini karcinom kod naših pacijenata bio je papilarni karcinom štitaste žlezde (6,8%). Njegova pojava u MEN1 je opisana kroz sporadične slučajeve, ali pojedinačne i malobrojne studije GH nisu potvrdile da menin učestvuje u tumorigenezi papilarnog karcinoma štitnjače [128,129]. Za razliku od literaturnih podataka koji govore o patognomoničnoj, pojavi angiofibroma i kolagenoma, zastupljenost ovih tumora u našoj populaciji je bila mala [10].

Atipičnom formom bolesti se manifestovalo 19,3% pacijenta sa klinički ispoljenim MEN1 sindromom. Ne postoje literaturni podaci o ovoj grupi pacijenata. Da li je tzv. atipični MEN1 samo deo kontinuuma fenotipa MEN1 sindroma ili njegova posebna forma, ostaje da se vidi u većim, prospektivnim studijama. U našoj studiji dva nosioca mutacije su se incijalno prezentovala atipičnim formama bolesti, ali su tokom perioda praćenja ispoljili klasičan fenotip. Obrnuto, u grupi MEN1 fenokopija dva

pacijenta su se incijalno prezentovala tipičnom formom bolesti ali su kasnije stekli i netipičan tumor, iako je mutacija u *MEN1* genu isključena. Osim kod pacijenta sa ekstra-adrenalnim paragangliomom, brNET je dijagnostikovao kod svih pacijenata sa atipičnim *MEN1*. Osim u dva slučaja kada su dijagnostikovani kao solitarni tumori, u većini slučajeva su bili asocirani sa nekim od 3P tumora. Solitarni brNET su zabeleženi kod dva pacijenta, kod kojih je dijagnoza postavljena pre 30. godine. U prvom slučaju brNET (atipični karcinoid) je bio i ostao jedina manifestacija bolesti tokom perioda praćenja od 26 godina, dok se u drugom radilo o SCLNEC, ali je period praćenja bio 12 meseci.

BrNET su bili najčešći uzrok smrti u našoj grupi pacijenata (58,8%) što je posledica proširenja inkluzionih kriterijuma koji su, opravdano, obuhvatili i SCLNEC, budući da su ovi tumori i ranije opisani u *MEN1* sindromu [54]. Interesantan je podatak da su maligni ne-endokrini karcinomi bili drugi najčešći uzrok smrti kod naših pacijenata. Ovaj podatak postoji i u literaturi i uglavnom je vezan za postojanje karcinoma dojke, iako se smatra da broj smrti izazavan karcinomom dojke ne odstupa bitnije od opšte populacije [38]. Iako je broj *MEN1*-asociranih smrti u našoj grupi pacijenata bio mali, literaturni podaci pokazuju da je najveći broj smrti u *MEN1* direktno ili indirektno vezan za sam sindrom [38,130]. Ukupno preživljavanje naših pacijenata procenjeno je na 28,4 godine od trenutka dijagnoze.

Broj pacijenata kod kojih nije pokazano postojanje mutacije u *MEN1* genu iznosio je 34% od ukupnog broja pacijenata odn. 47% među indeksnim pacijentima. Ovaj broj značajno varira u literaturi, 10 – 60% među indeksnim pacijentima, ali su svi ispitanici strogo ispunjavali 3P kriterijume [112,13,41,131]. Budući da su naši *MEN1* negativni pacijenti sa atipičnom prezentacijom oslikavali skoro 20% *MEN1* fenotipa (PHPT/brNET, PA/brNET, PA/SCLNEC, PHPT/SCLNEC, PA/PHPT/brNET i PA/dpNET/brNET fenotip), ovi pacijenti su uključeni u analizu kao *MEN1* fenokopije. S obzirom da se drugi 3P tumori mogu pojaviti tokom života, što je i pokazano kod naših pacijenata, ovi pacijenti zalužuju istu kliničku pažnju kao i klasične *MEN1* fenokopije.

Prva i za sada jedina studija koja je poredila karakteristike *MEN1* pacijenata sa i bez mutacije u *MEN1* genu objavljena je 2016. godine [13]. Studijom je pokazano da se

MEN1 pozitivni pacijenti razlikuju od *MEN1* negativnih u broju, penetrantnosti tumora i ukupnom preživljavanju. Niko od *MEN1* negativnih pacijenata nije imao više od dva glavna *MEN1* tumora, tumori su se javljali u starijem dobu a tok bolesti je bio blaži nego kod *MEN1* pozitivnih pacijenata. Autori su zaključili da se najverovatnije radi o udruženosti sporadičnih tumora, pre nego o nekoj drugoj naslednoj bolesti, budući da je kod svih osim jednog pacijenta isključena mutacija u *CDKN1b* genu.

Naša studija je prva koja se bavi kliničkim i patohistološkim razilkama između *MEN1* pozitivnih i *MEN1* negativnih pacijenata. Kao i u pomenutoj studiji, niko od *MEN1* negativnih pacijenata nije imao više od dva glavna *MEN1* tumora, ali su dva pacijenta imala pridružen drugi neuroendokrini tumor, brNET. Svi tumori, uključujući i brNET i tumore nadbubrega, su se javljali u značajno starijem dobu nego kod *MEN1* pozitivnih pacijenata, a period između prvog i drugog tumora je bio značajno duži nego kod *MEN1* pozitivnih pacijenata. Razlog ovome verovatno leži u činjenici da su nosioci mutacije skloniji nastanku tumora budući da je jedan alel već inaktiviran germinativnom mutacijom. Iako se doprinos slabije penetrantnih mutacija u drugim genima ne može isključiti (p27, p15, p18), verujemo da se zaista radi o slučajnoj udruženosti sporadičnih neuroendokrinih tumora.

Zastupljenost glavnih *MEN1* komponenti među *MEN1* pozitivnim pacijentima se nije bitnije razlikovala u odnosu na podatke u literaturi [112,10]. Sa druge strane, najčešći tumor među *MEN1* negativnim tumorima je bio tumor hipofize (85%), sa akromegalijom kao najčešćom manifestacijom. Akromegalija je bila negativan prediktor postojanja mutacije u *MEN1* genu. Ovakav nalaz takođe upućuje na sporadičnu formu bolesti, koja je izazvana drugačijim genetskim mehanizmima u kojim učestvuju drugi signalni putevi, poput cAMP, kalcijumskih kanalića i kohezionih puteva [132,133].

Neuroendokrini tumori pankresa su se gotovo isključivo javljali kod *MEN1* pozitivnih pacijenata a pNET su bili pozitivan klinički prediktor mutacije u *MEN1* genu. Ovo se može objasniti generalno malom učestalošću pNET u opštoj populaciji, pa je sporadična pojava sa drugim retkim tumorima, poput PHPT ili tumora hipofize, manje verovatna. I ovde, kao i kod drugih tumora, veća verovatnoća za “*second hit*” odn. drugu inaktivaciju preostalog alela omogućava da se ovakve fenotipske asocijacije dogode [134].

Dok je PHPT slično zastupljen među *MEN1* pozitivnim i negativnim pacijentima, poliglandularna polest paraštitastih žlezda je bila glavna karakteristika *MEN1* pozitivnih pacijenata. Naši podaci pokazuju da samo patohistološke ali ne i kliničke i biohemijske karakteristike bolesti, imaju prediktivnu vrednost za postojanje *MEN1* mutacije. Sa druge strane, malo je verovatno da sama hiperplazija ili multipli paratiroidni adenomi predstavljaju specifičan morfološki korelat *MEN1* onkogeneze. I druge paratiroidne lezije, poput hiperplazije u sekundarnom hiperparatiroidizmu usled bubrežne slabosti, predstavljaju monoklone, poliglandularne lezije. Gubitak alela na *MEN1* lokusu hormozoma 11q13 nađen je u 25 – 40% sporadičnih paratiroidnih adenoma, a somatska homozigotna mutacija u *MEN1* genu u skoro 50% ovih tumora [135-137]. Pozitivna prediktivna vrednost poliglandularne bolesti verovatno je i ovde bazirana na većoj verovatnoći za nastanak tumora u nosilaca mutacije.

Sa druge strane, prevalencija brNET je bila češća kod *MEN1* negativnih nego kod *MEN1* pozitivnih pacijenata. Kao i u PHPT, nekoliko studija baziranih na tehnikama komparativne genomske hibridizacije i studija gubitka heterozigonosti su pokazale čest gubitak 11q13 materijala u sporadičnim tipičnim i atipičnim karcinoidima, ali u patogenezi ovih tumora učestvuju i brojni drugi genetski mehanizmi [138,139]. Jasno je pokazano da verovatnoća za nastanak brNET raste sa starošću *MEN1* pacijenata [56,54]. Naši rezultati pokazuju da se i brNET ranije javljaju kod *MEN1* pozitivnih nego kod *MEN1* negativnih pacijenata, ali i da se brNET mogu javiti udruženo i sa sporadičnim i sa *MEN1* tumorima.

Ukratko, pokazali smo da se *MEN1* fenokopije razlikuju od nosilaca *MEN1* mutacije po asocijaciji ne više od dva solitarna, klasična *MEN1* tumora koji se javljaju kasnije u životu, predominaciji ženskog pola, čestoj akromegaliji i retkim pNET. Ovo sve zajedno ukazuje da *MEN1* fenokopije po svemu sudeći predstavljaju sporadičnu pojavu dva neuroendokrina tumora, pre nego drugi nasledni, multitumorski sindrom. Izgleda da kod pacijenata sa fenokopijom *MEN1* sindroma, drugi, ne-nasledni faktori učestvuju u inicijaciji i razvoju koegzistirajućih, multiplih neuroendokrinih tumora.

Identifikacija 28 različitih mutacija kod pacijenata koji su pripadali trideset jednoj različitoj porodici govori protiv konsangviniteta među porodicama. Kao i u drugim studijama, najveći broj mutacija predstavljale su *frameshift* i *missense* mutacije.

Sve ranije identifikovane *missense* mutacije su predhodno okarakterisane kao patološke ili verovatno patološke, budući da segregiraju sa MEN1 fenotipom [5,140]. Kao i u drugim studijama, mutacije su bile raspoređene duž čitavog kodirajućeg regiona *MEN1* gena, bez uočljivih “hot-spotova”, a identifikovana je jedna intronska mutacija (784-1G→A) i jedna velika delecija 8. egzona (MEN1ex8del).

Identifikovano je 6 novih mutacija u egzonima 4, 7, 8 i 10 koje do sada nisu prijavljene u svetskoj bazi podataka. Ovako veliki broj novootkrivenih mutacija (21,4%) u skladu je sa ranije objavljenim podacima u velikoj učestalosti novoopisanih mutacija u pacijenata sa MEN1 sindromom [141,142]. Mutacija W220G u egzonu 4 koja dovodi do supstitucije triptofana glicinom (TGG→GGG) u kodonu 220, klasifikovana je kao *missense* mutacija. Iako *missense* mutacije nisu u stanju da predvide očiglednu inaktivaciju menina, verovatno se radi o patogenoj mutaciji budući da segregira sa MEN1 fenotipom u porodici. Njihovu pravu patološku prirodu moguće je proveriti jedino praćenjem pojave bolesti kroz više generacija u porodici [81]. Sve druge novootkrivene mutacije dovodile su do promene okvira čitanja i do prevmene pojave stop kodona na ranije naznačenim aminokiselinama. Svi pacijenti sa ovim mutacijama imali su najmanje dva glavna MEN1-tumora kao i obolele članove porodice.

Naša studija je pokazala da mutacije koje dovode do skraćanja proteina dovode do povećanog rizika za nastanak pankreasnih NET, ali nije primećena razlika u učestalosti ovih mutacija u odnosu na tip pNET, kao u predhodnim studijama [143] [15,144]. Takođe je pokazano da mutacije koje dovode do skraćanja proteina dovode do češće pojave PHPT, što ranije nije pokazano. Naprotiv, pokazano je da je većina mutacija u pacijenata sa familijarnim hiperparatiroidizmom upravo *missense*, i njihova zastupljenost je značajno veća nego kod ostalih MEN1 pacijenata [5]. Presek literature vezan za korelaciju genotipa i fenotipa detaljnije je dat u uvodnom delu ove teze.

Iako je analizirano 30 različitih tumorskih uzoraka, ova studije predstavlja jednu od većih kada je u pitanju analiza gubitka heterozigotnosti 11q13. Gubitak heterozigotnosti je nađen kod 100% pNET, uključujući i dva uzorka nezidioblastoze, 77,8% paratiroidnih lezija (adenoma i hiperplazije), ni u jednom od uzoraka pituitarnih adenoma (3/3) i bronhijalnih NET (2/2), u dva uzorka tumora nadbubrega, jednom uzorku adenokarcinoma dojke, NET timusa i papilarnom karcinomu štitnjače (100%).

Ovakva zastupljenost GH govori u prilog izražene tkivne uslovljenosti, čak i u klasičnim MEN1 tumorima. Veća zastupljenost GH u tumorima paraštitastih žlezdi i pNET u odnosu na pituitarne tumore u skladu je sa ranije objavljenim podacima, ali i dalje ostaje nejasno na koji način tkivni milje utiče na mehanizam inaktivacije MEN1 gena. Razlike postoje i interindividualno, što takođe govori u prilog tkivne predilekcije odn. uslovljenosti lokalnim miljeom.

Istovremeno postojanje germinativne *MEN1* mutacije i gubitka heterozigotnosti koji uključuje region 11q13 u MEN1 tumorskim tkivima pokazatelj je jasne tumor-supresorske uloge menina u onkogenezi neuroendokrinih tumora. Uprkos očekivanom za tumor-supresorski gen, oko 10% pacijenata sa MEN1 tumorima ne pokazuje GH u tumorskom tkivu, što ukazuje na neki drugi vid inaktivacije gena koji uključuje manje delecije ili tačkaste mutacije, a koje su retko opisivane u MEN1 tumorima [145]. Shodno Knudsonovoj hipotezi o dvostepenoj inaktivaciji, ove somatske mutacije zahvataju alel koji nije predhodno pogođen germinativnom mutacijom i ovo je pokazano na manjim studijama kod pacijenata sa MEN1 asociranim insulinomima i adenomima paraštitastih žlezda [146,147]. Ipak, sve ove studije su sprovedene na malom broju uzoraka, te nema podataka u literaturi koji broj GH negativnih MEN1 tumora zaista pokazuje postojanje somatskih mutacija u *MEN1* genu. U svim gore pomenutim studijama deo tumora nije pokazivao postojanje tačkaste mutacije iako se radilo o MEN1 tumorima. U moguća objašnjenja spadaju postojanje mutacije u nekodirajućim delovima gena ili promoteru, ali i epigenetsko utišavanje tumor-supresorskog *MEN1* gena brojnim mehanizmima metilacije i histonske modifikacije [148]. Uprkos identifikaciji gena davne 1997. godine i napretku molekularnih tehnika koje bi trebalo da prevaziđu problem detekcije mutacija u nekodirajućim delovima gena, ovi mehanizmi inaktivacije *MEN1* gena su i dalje nepoznati.

Iako je menin široko eksprimiran u tkivima, za MEN1 sindrom je karakteristična visoka tkivna specifičnost i predilekcija za endokrine organe. Ipak, ni svi endokrini organi nemaju istu predispoziciju za nastanak MEN1 asociranih tumora. Sa jedne strane gotovo svi pacijenti obole od prim. hiperparatiroidizma, dok sa druge samo mali broj pacijenata oboli od NET pluća ili feohromocitoma. Razlog za ovako visoku tkivnu specifičnost još uvek nije poznat. Izgleda da tkivna specifičnost nije vezana za ekspresiju samog menina u tkivima, već ekspresiju njegovih proteinskih partnera, u

prvom redu MLL, p27^{kip1} i p18^{ink4c} čija je ekspresija daleko snažnija u endokrinim nego u ne-endokrinim organima, dok je menin podjednako ekspimiran u svim tkivima [149]. Ova dva proteina predstavljaju ciklin-zavisne kinazne inhibitore koji imaju važnu ulogu u inhibiciji onkogeneze brojnih malignih i benignih tumora. Haploinsuficijencija MLL u modelu miša, koja može biti izazvana i postojanjem GH *MEN1* gena, dovodi do redukcije ovih CDKI što dovodi do tumorigeneze u endokrinim tkivima [149].

Heterogenost među tumorima u pogledu inaktivacije *MEN1* gena prvi put je pokazana tek nedavno, 2017. godine tehnikom sekvenciranja celog egzoma (engl. *whole exome sequencing* – *WES*) kod pacijenta sa *MEN1* sindromom. U konstitutivnoj krvi detektovana je *frameshift* delecija u *MEN1* genu, GH 11q13 je detektovan u sva tri tumora paraštitastih žlezdi dok u tkivu insulinoma nije nađen ni GH niti tačkaste mutacije u *MEN1* genu [150]. Druge mutacije koje bi potencijalno doprinele tumorigenezi nisu otkrivene. Ovakva heterogenost među tumorima kod jednog istog pacijenta mogla bi upućivati na poliklonalnu tumorigenezu uprkos predispoziciji za nastanak tumora na terenu germinativne mutacije [150].

Sa druge strane, i sporadični *MEN1* tumori pokazuju gubitak 11q materijala ili postojnje somatskih *MEN1* mutacija. Gubitak alela na *MEN1* lokusu hormozoma 11q13 nađen je u čak 25 – 40% sporadičnih paratiroidnih adenoma, a somatska homozigotna mutacija u *MEN1* genu u skoro 50% ovih tumora [135]. Gubitak heterozigornosti 11q ili somatska *MEN1* mutacija nađena je u 46% sporadičnih pNET, bez obzira na stadijum tumora, što čini menin značajnim faktorom u incijaciji sporadičnih pNET [151,152]. Za razliku od paratiroidnih adenoma i pNET, somatske mutacije se retko nalaze u pituitarnim tumorima (1/69, 0/45 u različitim studijama), dok se GH 11q viđa u oko 20% pituitarnih tumora [153-155]. Za bolje razumevanje ovog kompleksnog mehanizma neophodne su veće studije na veće broju tumorskih tkiva, koje uključuju ispitivanje celog egzoma.

Najveće ograničenje studije jeste relativno mali broj ispitanika. Relativno, imajući u vidu da se radi o studiji jednog centra, ali i činjenici da je *MEN1* retka bolest. Multicentrične studije koje bi obuhvatile veći broj centara omogućile bi bolji uvid u kliničke karakteristike, a naročito u postojanje eventualnih korelacija između genotipa i fenotipa *MEN1* sindroma.

Drugo ograničenje jeste retrospektivni karakter studije. Iako u literaturi nema prospektivnih studija, njihovo postojanje omogućilo bi praćenje ovih pacijenata, što je naročito važno za pacijente sa atipičnim MEN1 sindromom, kao i za pacijente sa MEN1 fenokopijama, za koje i dalje nije jasan mehanizam nastanka i nema konsenzusa za praćenje tokom života.

1. Prevalencija MEN1 sindroma

Prevalencija MEN1 sindroma u Republici Srbiji iznosi 8,6 obolelih na 1,000,000 stanovnika. Najveća uzrastno specifična prevalencija MEN1 sindroma nalazi se u grupi od 30 – 39 godina, što je u skladu sa literaturnim podacima.

2. Kliničke karakteristike pacijenata sa MEN1 sindromom

Osnovne kliničke karakteristike pacijenata multiple endokrine neoplazije tip 1 ne odstupaju značajno od podataka u literaturi:

- i) Primarni hiperparatiroidizam prisutan je kod 79,5%, tumor hipofize kod 67%, pNET kod 30.7%. Prosečna starost pacijenata sa MEN1 sindromom iznosila je $41,1 \pm 18,7$ godina, u rasponu od 3 do 72 godine. Većina pacijenata je bila ženskog pola, uprkos autozomalno dominantnom načinu nasleđivanja. Neuroendokrini tumori bili su najčešći uzrok smrti MEN1 pacijenata
- ii) Kao statistički značajni klinički prediktori *MEN1* mutacije izdvojile su sledeće karakteristike: ženski pol, godine u trenutku dijagnoze, postojanje tumora hipofize, pNET, akromegalija, prolaktinom i poliglandularna bolest paraštitastih žlezda.

Studija je po prvi put opisala kategoriju pacijenata sa atipičnim MEN1 sindromom:

- ii) Atipični MEN1 dijagnostikovao je kod 19,3% pacijenata, odn. kod 22.7% indeksnih pacijenata. Mutacija u *MEN1* genu je nađena kod 41,2% pacijenata sa atipičnim MEN1, iz čega proističe zaključak o obaveznom testiranju pacijenata sa dva ili više neuroendokrinih tumora nezavisno od lokalizacije. Najčešći tumor kod pacijenata sa atipičnim MEN1 sindromom bio je brNET a najčešći fenotip bio je brNET/PHPT. Bronhijalni NET bio je najčešći uzrok smrti ovih pacijenata.

Studija je po prvi put ustanovila kliničke i patohistološke razlike između nosilaca MEN1 mutacije i MEN1 fenokopija:

i) Pacijenti sa MEN1 fenokopijom imaju najviše dva klasična MEN1 tumora, za razliku od nosilaca mutacije kod kojih je zabeleženo dva ili više koegzistentnih MEN1 tumora. Najčešći fenotip pacijenata sa MEN1 fenokopijom bio je PHPT/PA a nosilaca mutacije PHPT/PA/pNET. Akromegalija je gotovo isključivo dijagnostikovana kod pacijenata sa MEN1 fenokopijom, a pNET kod nosilaca MEN1 mutacije. Tumori pacijenata sa MEN1 fenokopijom su uvek solitarni, za razliku od nosilaca mutacije kod kojih su tumori dominantno multipli. Svi tumori pacijenata sa MEN1 fenokopijama javljaju se značajno kasnije nego tumori nosilaca mutacije.

ii) MEN1 fenokopije se značajno češće dijagnostikuju kod žena, a pojava mutacije u MEN1 genu dovela je do atenuacije odnosa polova. Nije bilo razlike u starosti u trenutku smrti i ukupnom preživljavanju između nosilaca mutacije i pacijenata sa MEN1 fenokopijom. Postojanje brNET značajno je uticalo na skraćenje životnog veka MEN1 fenokopija, dok postojanje brNET nije imalo uticaja na preživljavanje nosilaca mutacije

Iz svega navedenog proizilazi zaključak da MEN1 fenokopije po svemu sudeći odgovaraju koegzistentnoj pojavi dva sporadična MEN1-asocirana tumora, ali se ne može isključiti ni postojanje manje penetrantnih mutacija u drugim, za sada neotkrivenim genima

3. Analiza mutacija u *MEN1* genu konstitutivne DNK i korelacija sa kliničkom slikom

i) MEN1 mutacija identifikovana je kod 65,7% pacijenata, najčešće kao *frameshift* i *missense* mutacije. Identifikovano je 6 novih mutacija koje do sada nisu opisane u *Humane Gene Mutation Database, HGMD*: W220G, 941delG, 1088_1095del7, 1184_1185insA, 1473_1483del10, 1602_1618del1.

ii) Nije zabeleženo postojanje opšte korelacije genotipa odn. vrste i pozicije mutacije sa kliničkom slikom. Mutacije koje dovode do skraćenja proteina nose povećan rizik za nastanak pNET i PHPT.

4. Analiza mehanizma inaktivacije *MEN1* gena u *MEN1* tumorima endokrinog i van endokrinog sistema

i) Gubitak 11q13 materijala nađen je u 100% pNET, uključujući i dva uzorka nezidioblastoze, 77,8% paratiroidnih lezija (adenoma i hiperplazije), ni u jednom od uzoraka pituitarnih adenoma i bronhijalnih NET. Inaktivacija *MEN1* gena je visoko tkivno specifična i podrazmeva postojanje drugih mehanizama inaktivacije osim gubitka heterozgotnosti koji je očekivan za tumor-supresorski gen. Gubitak heterozgotnosti u u dva uzorka tumora nadbubrega govori u prilog meninom indukovane tumorigeneze.

ii) Postojanje gubitka heterozgotnosti u neendokrinim tumorima - adenokarcinomu dojke koje je predhodno pokazano u literaturi i u papilarnom karcinomu štitaste žlezde što je sada po prvi put pokazano, govori u prilog šire tumor-supresorke uloge menina koja izlazi iz okvira endokrinog sistema.

1. Erdheim, J.: Zur normalen und pathologischen Histologie der Glandula thyreoidea, parathyreoidea und Hypophysis. *Beitr Pathol Anat* **33**, 158-236 (1903).
2. Wermer, P.: Endocrine adenomatosis and peptic ulcer in a large kindred. Inherited multiple tumors and mosaic pleiotropism in man. *Am J Med* **35**, 205-212 (1963).
3. Chandrasekharappa, S.C., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Collins, F.S., Emmert-Buck, M.R., Debelenko, L.V., Zhuang, Z., Lubensky, I.A., Liotta, L.A., Crabtree, J.S., Wang, Y., Roe, B.A., Weisemann, J., Boguski, M.S., Agarwal, S.K., Kester, M.B., Kim, Y.S., Heppner, C., Dong, Q., Spiegel, A.M., Burns, A.L., Marx, S.J.: Positional cloning of the gene for multiple endocrine neoplasia-type 1. *Science* **276**(5311), 404-407 (1997).
4. Lemmens, I., Van de Ven, W.J., Kas, K., Zhang, C.X., Giraud, S., Wautot, V., Buisson, N., De Witte, K., Salandre, J., Lenoir, G., Pugeat, M., Calender, A., Parente, F., Quincey, D., Gaudray, P., De Wit, M.J., Lips, C.J., Hoppener, J.W., Khodaei, S., Grant, A.L., Weber, G., Kytola, S., Teh, B.T., Farnebo, F., Thakker, R.V., et al.: Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Hum Mol Genet* **6**(7), 1177-1183 (1997).
5. Lemos, M.C., Thakker, R.V.: Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): analysis of 1336 mutations reported in the first decade following identification of the gene. *Hum Mutat* **29**(1), 22-32 (2008).
6. Thevenon, J., Bourredjem, A., Faivre, L., Cardot-Bauters, C., Calender, A., Murat, A., Giraud, S., Niccoli, P., Odou, M.F., Borson-Chazot, F., Barlier, A., Lombard-Bohas, C., Clauser, E., Tabarin, A., Parfait, B., Chabre, O., Castermans, E., Beckers, A., Ruzsiewski, P., Le Bras, M., Delemer, B., Bouchard, P., Guilhem, I., Rohmer, V., Goichot, B., Caron, P., Baudin, E., Chanson, P., Groussin, L., Du Boullay, H., Weryha, G., Lecomte, P., Penfornis, A., Bihan, H., Archambeaud, F., Kerlan, V., Duron, F., Kuhn, J.M., Verges, B., Rodier, M., Renard, M., Sadoul, J.L., Binquet, C., Goudet, P.: Higher risk of death among MEN1 patients with mutations in the JunD interacting domain: a Groupe d'etude des Tumeurs Endocrines (GTE) cohort study. *Hum Mol Genet* **22**(10), 1940-1948 (2013).

7. Bertolino, P., Tong, W.M., Herrera, P.L., Casse, H., Zhang, C.X., Wang, Z.Q.: Pancreatic beta-cell-specific ablation of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene causes full penetrance of insulinoma development in mice. *Cancer research* **63**(16), 4836-4841 (2003).
8. Harding, B., Lemos, M.C., Reed, A.A., Walls, G.V., Jeyabalan, J., Bowl, M.R., Tateossian, H., Sullivan, N., Hough, T., Fraser, W.D., Ansorge, O., Cheeseman, M.T., Thakker, R.V.: Multiple endocrine neoplasia type 1 knockout mice develop parathyroid, pancreatic, pituitary and adrenal tumours with hypercalcaemia, hypophosphataemia and hypercorticozonaemia. *Endocr Relat Cancer* **16**(4), 1313-1327 (2009).
9. Marini, F., Falchetti, A., Luzi, E., Tonelli, F., Maria Luisa, B.: Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 (MEN1) Syndrome. In: Riegert-Johnson, D.L., Boardman, L.A., Hefferon, T., Roberts, M. (eds.) *Cancer Syndromes*. National Center for Biotechnology Information (US), Bethesda (MD) (2009)
10. Thakker, R.V.: Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) and type 4 (MEN4). *Mol Cell Endocrinol* **386**(1-2), 2-15 (2014).
11. Bassett, J.H., Forbes, S.A., Pannett, A.A., Lloyd, S.E., Christie, P.T., Wooding, C., Harding, B., Besser, G.M., Edwards, C.R., Monson, J.P., Sampson, J., Wass, J.A., Wheeler, M.H., Thakker, R.V.: Characterization of mutations in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Am J Hum Genet* **62**(2), 232-244 (1998).
12. Machens, A., Schaaf, L., Karges, W., Frank-Raue, K., Bartsch, D.K., Rothmund, M., Schneyer, U., Goretzki, P., Raue, F., Dralle, H.: Age-related penetrance of endocrine tumours in multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): a multicentre study of 258 gene carriers. *Clinical endocrinology* **67**(4), 613-622 (2007).
13. de Laat, J.M., van der Luijt, R.B., Pieterman, C.R., Oostveen, M.P., Hermus, A.R., Dekkers, O.M., de Herder, W.W., van der Horst-Schrivers, A.N., Drent, M.L., Bisschop, P.H., Havekes, B., Vriens, M.R., Valk, G.D.: MEN1 redefined, a clinical comparison of mutation-positive and mutation-negative patients. *BMC medicine* **14**(1), 182 (2016).

14. Farid, N.R., Buehler, S., Russell, N.A., Maroun, F.B., Allerdice, P., Smyth, H.S.: Prolactinomas in familial multiple endocrine neoplasia syndrome type I. Relationship to HLA and carcinoid tumors. *Am J Med* **69**(6), 874-880 (1980).
15. Olufemi, S.E., Green, J.S., Manickam, P., Guru, S.C., Agarwal, S.K., Kester, M.B., Dong, Q., Burns, A.L., Spiegel, A.M., Marx, S.J., Collins, F.S., Chandrasekharappa, S.C.: Common ancestral mutation in the MEN1 gene is likely responsible for the prolactinoma variant of MEN1 (MEN1Burin) in four kindreds from Newfoundland. *Hum Mutat* **11**(4), 264-269 (1998).
16. Hao, W., Skarulis, M.C., Simonds, W.F., Weinstein, L.S., Agarwal, S.K., Mateo, C., James-Newton, L., Hobbs, G.R., Gibril, F., Jensen, R.T., Marx, S.J.: Multiple endocrine neoplasia type 1 variant with frequent prolactinoma and rare gastrinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **89**(8), 3776-3784 (2004).
17. Burgess, J.R., Greenaway, T.M., Shepherd, J.J.: Expression of the MEN-1 gene in a large kindred with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Intern Med* **243**(6), 465-470 (1998).
18. Lourenco, D.M., Jr., Toledo, R.A., Mackowiak, II, Coutinho, F.L., Cavalcanti, M.G., Correia-Deur, J.E., Montenegro, F., Siqueira, S.A., Margarido, L.C., Machado, M.C., Toledo, S.P.: Multiple endocrine neoplasia type 1 in Brazil: MEN1 founding mutation, clinical features, and bone mineral density profile. *Eur J Endocrinol* **159**(3), 259-274 (2008).
19. Dreijerink, K.M., Goudet, P., Burgess, J.R., Valk, G.D.: Breast-cancer predisposition in multiple endocrine neoplasia type 1. *N Engl J Med* **371**(6), 583-584 (2014).
20. Cuevas-Ocampo, A.K., Bollen, A.W., Goode, B., Pajtler, K.W., Chavez, L., Sharma, T., Dai, S.C., McDermott, M., Perry, A., Korshunov, A., Solomon, D.A.: Genetic confirmation that ependymoma can arise as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) syndrome. *Acta neuropathologica* **133**(4), 661-663 (2017).
21. Asgharian, B., Chen, Y.J., Patronas, N.J., Peghini, P.L., Reynolds, J.C., Vortmeyer, A., Zhuang, Z., Venzon, D.J., Gibril, F., Jensen, R.T.: Meningiomas may be a component tumor of multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinical cancer*

- research : an official journal of the American Association for Cancer Research **10**(3), 869-880 (2004).
22. Falchetti, A., Marini, F., Luzi, E., Giusti, F., Cavalli, L., Cavalli, T., Brandi, M.L.: Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): not only inherited endocrine tumors. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* **11**(12), 825-835 (2009).
 23. Vannucci, L., Marini, F., Giusti, F., Ciuffi, S., Tonelli, F., Brandi, M.L.: MEN1 in children and adolescents: Data from patients of a regional referral center for hereditary endocrine tumors. *Endocrine* (2017).
 24. Carling, T.: Molecular pathology of parathyroid tumors. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **12**(2), 53-58 (2001).
 25. Lourenço, D.M., Coutinho, F.L., Toledo, R.A., Gonçalves, T.D., Montenegro, F.L.M., Toledo, S.P.A.: Biochemical, bone and renal patterns in hyperparathyroidism associated with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* **67**(Suppl 1), 99-108 (2012).
 26. Giusti, F., Tonelli, F., Brandi, M.L.: Primary hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 1: when to perform surgery? *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* **67**(Suppl 1), 141-144 (2012).
 27. Giusti, F., Cianferotti, L., Gronchi, G., Cioppi, F., Masi, L., Faggiano, A., Colao, A., Ferolla, P., Brandi, M.L.: Cinacalcet therapy in patients affected by primary hyperparathyroidism associated to Multiple Endocrine Neoplasia Syndrome type 1 (MEN1). *Endocrine* **52**(3), 495-506 (2016).
 28. Thakker, R.V., Newey, P.J., Walls, G.V., Bilezikian, J., Dralle, H., Ebeling, P.R., Melmed, S., Sakurai, A., Tonelli, F., Brandi, M.L.: Clinical practice guidelines for multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *J Clin Endocrinol Metab* **97**(9), 2990-3011 (2012).
 29. Tonelli, F., Giudici, F., Cavalli, T., Brandi, M.L.: Surgical approach in patients with hyperparathyroidism in multiple endocrine neoplasia type 1: total versus partial parathyroidectomy. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)* **67 Suppl 1**, 155-160 (2012).
 30. Pieterman, C.R., Conemans, E.B., Dreijerink, K.M., de Laat, J.M., Timmers, H.T., Vriens, M.R., Valk, G.D.: Thoracic and duodenopancreatic neuroendocrine

- tumors in multiple endocrine neoplasia type 1: natural history and function of menin in tumorigenesis. *Endocr Relat Cancer* **21**(3), R121-142 (2014).
31. Hoffmann, K.M., Furukawa, M., Jensen, R.T.: Duodenal neuroendocrine tumors: Classification, functional syndromes, diagnosis and medical treatment. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **19**(5), 675-697 (2005).
 32. Anlauf, M., Perren, A., Meyer, C.L., Schmid, S., Saremaslani, P., Kruse, M.L., Weihe, E., Komminoth, P., Heitz, P.U., Kloppel, G.: Precursor lesions in patients with multiple endocrine neoplasia type 1-associated duodenal gastrinomas. *Gastroenterology* **128**(5), 1187-1198 (2005).
 33. Brown, C.K., Bartlett, D.L., Doppman, J.L., Gorden, P., Libutti, S.K., Fraker, D.L., Shawker, T.H., Skarulis, M.C., Alexander, H.R.: Intraarterial calcium stimulation and intraoperative ultrasonography in the localization and resection of insulinomas. *Surgery* **122**(6), 1189-1193; discussion 1193-1184 (1997).
 34. Thomas-Marques, L., Murat, A., Delemer, B., Penforis, A., Cardot-Bauters, C., Baudin, E., Niccoli-Sire, P., Levoir, D., Choplin Hdu, B., Chabre, O., Jovenin, N., Cadiot, G.: Prospective endoscopic ultrasonographic evaluation of the frequency of nonfunctioning pancreaticoduodenal endocrine tumors in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *The American journal of gastroenterology* **101**(2), 266-273 (2006).
 35. Brandi, M.L., Gagel, R.F., Angeli, A., Bilezikian, J.P., Beck-Peccoz, P., Bordi, C., Conte-Devolx, B., Falchetti, A., Gheri, R.G., Libroia, A., Lips, C.J., Lombardi, G., Mannelli, M., Pacini, F., Ponder, B.A., Raue, F., Skogseid, B., Tamburrano, G., Thakker, R.V., Thompson, N.W., Tomassetti, P., Tonelli, F., Wells, S.A., Jr., Marx, S.J.: Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(12), 5658-5671 (2001).
 36. Donegan, D., Singh Ospina, N., Rodriguez-Gutierrez, R., Al-Hilli, Z., Thompson, G.B., Clarke, B.L., Young, W.F., Jr.: Long-term outcomes in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 and pancreaticoduodenal neuroendocrine tumours. *Clinical endocrinology* **86**(2), 199-206 (2017).
 37. Triponez, F., Sadowski, S.M., Pattou, F., Cardot-Bauters, C., Mirallie, E., Le Bras, M., Sebag, F., Niccoli, P., Deguelte, S., Cadiot, G., Poncet, G., Lifante, J.C., Borson-Chazot, F., Chaffanjon, P., Chabre, O., Menegaux, F., Baudin, E.,

- Ruszniewski, P., Du Boullay, H., Goudet, P.: Long-term Follow-up of MEN1 Patients Who Do Not Have Initial Surgery for Small ≤ 2 cm Nonfunctioning Pancreatic Neuroendocrine Tumors, an AFCE and GTE Study: Association Francophone de Chirurgie Endocrinienne & Groupe d'Etude des Tumeurs Endocrines. *Ann Surg* (2017).
38. Goudet, P., Murat, A., Binquet, C., Cardot-Bauters, C., Costa, A., Ruszniewski, P., Niccoli, P., Ménégau, F., Chabrier, G., Borson-Chazot, F., Tabarin, A., Bouchard, P., Delemer, B., Beckers, A., Bonithon-Kopp, C.: Risk Factors and Causes of Death in MEN1 Disease. A GTE (Groupe d'Etude des Tumeurs Endocrines) Cohort Study Among 758 Patients. *World journal of surgery* **34**(2), 249-255 (2010).
39. Levy-Bohbot, N., Merle, C., Goudet, P., Delemer, B., Calender, A., Jolly, D., Thieffn, G., Cadiot, G.: Prevalence, characteristics and prognosis of MEN 1-associated glucagonomas, VIPomas, and somatostatinomas: study from the GTE (Groupe des Tumeurs Endocrines) registry. *Gastroenterologie clinique et biologique* **28**(11), 1075-1081 (2004).
40. Falconi, M., Eriksson, B., Kaltsas, G., Bartsch, D.K., Capdevila, J., Caplin, M., Kos-Kudla, B., Kwekkeboom, D., Rindi, G., Kloppel, G., Reed, N., Kianmanesh, R., Jensen, R.T.: ENETS Consensus Guidelines Update for the Management of Patients with Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Non-Functional Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Neuroendocrinology* **103**(2), 153-171 (2016).
41. Marx, S., Spiegel, A.M., Skarulis, M.C., Doppman, J.L., Collins, F.S., Liotta, L.A.: Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic topics. *Annals of internal medicine* **129**(6), 484-494 (1998).
42. Scheithauer, B.W., Laws, E.R., Jr., Kovacs, K., Horvath, E., Randall, R.V., Carney, J.A.: Pituitary adenomas of the multiple endocrine neoplasia type I syndrome. *Seminars in diagnostic pathology* **4**(3), 205-211 (1987).
43. Carty, S.E., Helm, A.K., Amico, J.A., Clarke, M.R., Foley, T.P., Watson, C.G., Mulvihill, J.J.: The variable penetrance and spectrum of manifestations of multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery* **124**(6), 1106-1113; discussion 1113-1104 (1998).

44. de Laat, J.M., Dekkers, O.M., Pieterman, C.R., Kluijfhout, W.P., Hermus, A.R., Pereira, A.M., van der Horst-Schrivers, A.N., Drent, M.L., Bisschop, P.H., Havekes, B., de Herder, W.W., Valk, G.D.: Long-Term Natural Course of Pituitary Tumors in Patients With MEN1: Results From the DutchMEN1 Study Group (DMSG). *J Clin Endocrinol Metab* **100**(9), 3288-3296 (2015).
45. Trouillas, J., Labat-Moleur, F., Sturm, N., Kujas, M., Heymann, M.F., Figarella-Branger, D., Patey, M., Mazucca, M., Decullier, E., Verges, B., Chabre, O., Calender, A.: Pituitary tumors and hyperplasia in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome (MEN1): a case-control study in a series of 77 patients versus 2509 non-MEN1 patients. *The American journal of surgical pathology* **32**(4), 534-543 (2008).
46. Verges, B., Boureille, F., Goudet, P., Murat, A., Beckers, A., Sassolas, G., Cougard, P., Chambe, B., Montvernay, C., Calender, A.: Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1): data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* **87**(2), 457-465 (2002).
47. Stratakis, C.A., Schussheim, D.H., Freedman, S.M., Keil, M.F., Pack, S.D., Agarwal, S.K., Skarulis, M.C., Weil, R.J., Lubensky, I.A., Zhuang, Z., Oldfield, E.H., Marx, S.J.: Pituitary macroadenoma in a 5-year-old: an early expression of multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab* **85**(12), 4776-4780 (2000).
48. Petrossians, P., de Herder, W., Kwekkeboom, D., Lamberigts, G., Stevenaert, A., Beckers, A.: Malignant prolactinoma discovered by D2 receptor imaging. *J Clin Endocrinol Metab* **85**(1), 398-401 (2000).
49. Beckers, A., Betea, D., Valdes Socin, H., Stevenaert, A.: The treatment of sporadic versus MEN1-related pituitary adenomas. *J Intern Med* **253**(6), 599-605 (2003).
50. Langer, P., Cupisti, K., Bartsch, D.K., Nies, C., Goretzki, P.E., Rothmund, M., Roher, H.D.: Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1. *World journal of surgery* **26**(8), 891-896 (2002).
51. Gatta-Cherifi, B., Chabre, O., Murat, A., Niccoli, P., Cardot-Bauters, C., Rohmer, V., Young, J., Delemer, B., Du Boullay, H., Verger, M.F., Kuhn, J.M., Sadoul, J.L., Ruzsiewicz, P., Beckers, A., Monsaingeon, M., Baudin, E., Goudet, P., Tabarin, A.: Adrenal involvement in MEN1. Analysis of 715 cases from the

- Groupe d'etude des Tumeurs Endocrines database. *Eur J Endocrinol* **166**(2), 269-279 (2012).
52. Skogseid, B., Rastad, J., Gobl, A., Larsson, C., Backlin, K., Juhlin, C., Akerstrom, G., Oberg, K.: Adrenal lesion in multiple endocrine neoplasia type 1. *Surgery* **118**(6), 1077-1082 (1995).
53. Waldmann, J., Bartsch, D.K., Kann, P.H., Fendrich, V., Rothmund, M., Langer, P.: Adrenal involvement in multiple endocrine neoplasia type 1: results of 7 years prospective screening. *Langenbeck's archives of surgery* **392**(4), 437-443 (2007).
54. Lecomte, P., Binquet, C., Le Bras, M., Tabarin, A., Cardot-Bauters, C., Borson-Chazot, F., Lombard-Bohas, C., Baudin, E., Delemer, B., Klein, M., Verges, B., Aparicio, T., Cosson, E., Beckers, A., Caron, P., Chabre, O., Chanson, P., Du Boullay, H., Guilhem, I., Niccoli, P., Rohmer, V., Guigay, J., Vulpoi, C., Scoazec, J.Y., Goudet, P.: Histologically Proven Bronchial Neuroendocrine Tumors in MEN1: A GTE 51-Case Cohort Study. *World journal of surgery* (2017).
55. Sachithanandan, N., Harle, R.A., Burgess, J.R.: Bronchopulmonary carcinoid in multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer* **103**(3), 509-515 (2005).
56. de Laat, J.M., Pieterman, C.R., van den Broek, M.F., Twisk, J.W., Hermus, A.R., Dekkers, O.M., de Herder, W.W., van der Horst-Schrivers, A.N., Drent, M.L., Bisschop, P.H., Havekes, B., Vriens, M.R., Valk, G.D.: Natural course and survival of neuroendocrine tumors of thymus and lung in MEN1 patients. *J Clin Endocrinol Metab* **99**(9), 3325-3333 (2014).
57. Fessler, M.B., Cool, C.D., Miller, Y.E., Schwarz, M.I., Brown, K.K.: Idiopathic diffuse hyperplasia of pulmonary neuroendocrine cells in a patient with acromegaly. *Respirology (Carlton, Vic.)* **9**(2), 274-277 (2004).
58. Gibril, F., Chen, Y.J., Schrupp, D.S., Vortmeyer, A., Zhuang, Z., Lubensky, I.A., Reynolds, J.C., Louie, A., Entsuah, L.K., Huang, K., Asgharian, B., Jensen, R.T.: Prospective study of thymic carcinoids in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab* **88**(3), 1066-1081 (2003).
59. Yano, M., Fukai, I., Kobayashi, Y., Mizuno, K., Konishi, A., Haneda, H., Suzuki, E., Endo, K., Fujii, Y.: ACTH-secreting thymic carcinoid associated with

- multiple endocrine neoplasia type 1. *The Annals of thoracic surgery* **81**(1), 366-368 (2006).
60. Burgess, J.R., Giles, N., Shepherd, J.J.: Malignant thymic carcinoid is not prevented by transcervical thymectomy in multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinical endocrinology* **55**(5), 689-693 (2001).
61. Dias, A.R., Azevedo, B.C., Alban, L.B.V., Yagi, O.K., Ramos, M., Jacob, C.E., Barchi, L.C., Ceconello, I., Ribeiro-Jr, U., Zilberstein, B.: Gastric Neuroendocrine Tumor: Review and Update. *Arq Bras Cir Dig.* 2017 Apr-Jun;30(2):150-4.
62. Debelenko, L.V., Emmert-Buck, M.R., Zhuang, Z., Epshteyn, E., Moskaluk, C.A., Jensen, R.T., Liotta, L.A., Lubensky, I.A.: The multiple endocrine neoplasia type I gene locus is involved in the pathogenesis of type II gastric carcinoids. *Gastroenterology* **113** (1997).
63. Plockinger, U., Rindi, G., Arnold, R., Eriksson, B., Krenning, E.P., de Herder, W.W., Goede, A., Caplin, M., Oberg, K., Reubi, J.C., Nilsson, O., Delle Fave, G., Ruzsniwski, P., Ahlman, H., Wiedenmann, B.: Guidelines for the diagnosis and treatment of neuroendocrine gastrointestinal tumours. A consensus statement on behalf of the European Neuroendocrine Tumour Society (ENETS). *Neuroendocrinology* **80**(6), 394-424 (2004).
64. Darling, T.N., Skarulis, M.C., Steinberg, S.M., Marx, S.J., Spiegel, A.M., Turner, M.: Multiple facial angiofibromas and collagenomas in patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Arch Dermatol* **133**(7), 853-857 (1997).
65. Pack, S., Turner, M.L., Zhuang, Z., Vortmeyer, A.O., Boni, R., Skarulis, M., Marx, S.J., Darling, T.N.: Cutaneous tumors in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 show allelic deletion of the MEN1 gene. *J Invest Dermatol* **110**(4), 438-440 (1998).
66. McKeeby, J.L., Li, X., Zhuang, Z., Vortmeyer, A.O., Huang, S., Pirner, M., Skarulis, M.C., James-Newton, L., Marx, S.J., Lubensky, I.A.: Multiple leiomyomas of the esophagus, lung, and uterus in multiple endocrine neoplasia type 1. *The American journal of pathology* **159**(3), 1121-1127 (2001).
67. Pellegata, N.S., Quintanilla-Martinez, L., Siggelkow, H., Samson, E., Bink, K., Hofler, H., Fend, F., Graw, J., Atkinson, M.J.: Germ-line mutations in p27Kip1

- cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(42), 15558-15563 (2006).
68. Alrezk, R., Hannah-Shmouni, F., Stratakis, C.A.: MEN4 and CDKN1B mutations: the latest of the MEN syndromes. *Endocr Relat Cancer* **24**(10), T195-t208 (2017).
69. Georgitsi, M., Raitila, A., Karhu, A., van der Luijt, R.B., Aalfs, C.M., Sane, T., Vierimaa, O., Makinen, M.J., Tuppurainen, K., Paschke, R., Gimm, O., Koch, C.A., Gundogdu, S., Lucassen, A., Tischkowitz, M., Izatt, L., Aylwin, S., Bano, G., Hodgson, S., De Menis, E., Launonen, V., Vahteristo, P., Aaltonen, L.A.: Germline CDKN1B/p27Kip1 mutation in multiple endocrine neoplasia. *J Clin Endocrinol Metab* **92**(8), 3321-3325 (2007).
70. Beckers, A., Lodish, M.B., Trivellin, G., Rostomyan, L., Lee, M., Faucz, F.R., Yuan, B., Choong, C.S., Caberg, J.H., Verrua, E., Naves, L.A., Cheetham, T.D., Young, J., Lysy, P.A., Petrossians, P., Cotterill, A., Shah, N.S., Metzger, D., Castermans, E., Ambrosio, M.R., Villa, C., Strebkova, N., Mazerkina, N., Gaillard, S., Barra, G.B., Casulari, L.A., Neggers, S.J., Salvatori, R., Jaffrain-Rea, M.L., Zacharin, M., Santamaria, B.L., Zacharieva, S., Lim, E.M., Mantovani, G., Zatelli, M.C., Collins, M.T., Bonneville, J.F., Quezado, M., Chittiboina, P., Oldfield, E.H., Bours, V., Liu, P., W, W.d.H., Pellegata, N., Lupski, J.R., Daly, A.F., Stratakis, C.A.: X-linked acrogigantism syndrome: clinical profile and therapeutic responses. *Endocr Relat Cancer* **22**(3), 353-367 (2015).
71. Agarwal, S.K., Mateo, C.M., Marx, S.J.: Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. *J Clin Endocrinol Metab* **94**(5), 1826-1834 (2009).
72. Oberg, K., Skogseid, B.: The ultimate biochemical diagnosis of endocrine pancreatic tumours in MEN-1. *J Intern Med* **243**(6), 471-476 (1998).
73. Doherty, G.M., Olson, J.A., Frisella, M.M., Lairmore, T.C., Wells, S.A., Jr., Norton, J.A.: Lethality of multiple endocrine neoplasia type I. *World journal of surgery* **22**(6), 581-586; discussion 586-587 (1998).

74. Wilkinson, S., Teh, B.T., Davey, K.R., McArdle, J.P., Young, M., Shepherd, J.J.: Cause of death in multiple endocrine neoplasia type 1. *Arch Surg* **128**(6), 683-690 (1993).
75. Huang, S.C., Zhuang, Z., Weil, R.J., Pack, S., Wang, C., Krutzsch, H.C., Pham, T.A., Lubensky, I.A.: Nuclear/cytoplasmic localization of the multiple endocrine neoplasia type 1 gene product, menin. *Lab Invest* **79**(3), 301-310 (1999).
76. Wu, T., Hua, X.: Menin represses tumorigenesis via repressing cell proliferation. *American journal of cancer research* **1**(6), 726-739 (2011).
77. Chandrasekharappa, S.C., Teh, B.T.: Functional studies of the MEN1 gene. *J Intern Med* **253**(6), 606-615 (2003).
78. Thakker, R.V.: Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism* **24**(3), 355-370 (2010).
79. Canaff, L., Vanbellinghen, J.-F., Kanazawa, I., Kwak, H., Garfield, N., Vautour, L., Hendy, G.N.: Menin Missense Mutants Encoded by the MEN1 Gene that Are Targeted to the Proteasome: Restoration of Expression and Activity by CHIP siRNA. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **97**(2), E282-E291 (2012).
80. Chen, Y.X., Yan, J., Keeshan, K., Tubbs, A.T., Wang, H., Silva, A., Brown, E.J., Hess, J.L., Pear, W.S., Hua, X.: The tumor suppressor menin regulates hematopoiesis and myeloid transformation by influencing Hox gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(4), 1018-1023 (2006).
81. Agarwal, S.K.: The future: genetics advances in MEN1 therapeutic approaches and management strategies. *Endocr Relat Cancer* **24**(10), T119-t134 (2017).
82. Huang, J., Gurung, B., Wan, B., Matkar, S., Veniaminova, N.A., Wan, K., Merchant, J.L., Hua, X., Lei, M.: The same pocket in menin binds both MLL and JUND but has opposite effects on transcription. *Nature* **482**(7386), 542-546 (2012).
83. Yang, Y., Hua, X.: In search of tumor suppressing functions of menin. *Mol Cell Endocrinol* **265-266**, 34-41 (2007).
84. Lin, W., Cao, J., Liu, J., Beshiri, M.L., Fujiwara, Y., Francis, J., Cherniack, A.D., Geisen, C., Blair, L.P., Zou, M.R., Shen, X., Kawamori, D., Liu, Z., Grisanzio,

- C., Watanabe, H., Minamishima, Y.A., Zhang, Q., Kulkarni, R.N., Signoretti, S., Rodig, S.J., Bronson, R.T., Orkin, S.H., Tuck, D.P., Benevolenskaya, E.V., Meyerson, M., Kaelin, W.G., Jr., Yan, Q.: Loss of the retinoblastoma binding protein 2 (RBP2) histone demethylase suppresses tumorigenesis in mice lacking Rb1 or Men1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(33), 13379-13386 (2011).
85. Agarwal, S.K., Jothi, R.: Genome-wide characterization of menin-dependent H3K4me3 reveals a specific role for menin in the regulation of genes implicated in MEN1-like tumors. *PloS one* **7**(5), e37952 (2012).
86. Yokoyama, A., Somervaille, T.C., Smith, K.S., Rozenblatt-Rosen, O., Meyerson, M., Cleary, M.L.: The menin tumor suppressor protein is an essential oncogenic cofactor for MLL-associated leukemogenesis. *Cell* **123**(2), 207-218 (2005).
87. Agarwal, S.K., Novotny, E.A., Crabtree, J.S., Weitzman, J.B., Yaniv, M., Burns, A.L., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., Marx, S.J.: Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(19), 10770-10775 (2003).
88. Heppner, C., Bilimoria, K.Y., Agarwal, S.K., Kester, M., Whitty, L.J., Guru, S.C., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., Marx, S.J., Burns, A.L.: The tumor suppressor protein menin interacts with NF-kappaB proteins and inhibits NF-kappaB-mediated transactivation. *Oncogene* **20**(36), 4917-4925 (2001).
89. Luzi, E., Marini, F., Tognarini, I., Galli, G., Falchetti, A., Brandi, M.L.: The regulatory network menin-microRNA 26a as a possible target for RNA-based therapy of bone diseases. *Nucleic acid therapeutics* **22**(2), 103-108 (2012).
90. Imachi, H., Murao, K., Dobashi, H., Bhuyan, M.M., Cao, X., Kontani, K., Niki, S., Murazawa, C., Nakajima, H., Kohno, N., Yamashita, H., Iwase, H., Hayashi, S., Ishida, T., Yamauchi, A.: Menin, a product of the MEN1 gene, binds to estrogen receptor to enhance its activity in breast cancer cells: possibility of a novel predictive factor for tamoxifen resistance. *Breast cancer research and treatment* **122**(2), 395-407 (2010).

91. Wu, Y., Feng, Z.J., Gao, S.B., Matkar, S., Xu, B., Duan, H.B., Lin, X., Li, S.H., Hua, X., Jin, G.H.: Interplay between Menin and K-Ras in Regulating Lung Adenocarcinoma. *The Journal of Biological Chemistry* **287**(47), 40003-40011 (2012).
92. Gurung, B., Feng, Z., Iwamoto, D.V., Thiel, A., Jin, G., Fan, C.M., Ng, J.M., Curran, T., Hua, X.: Menin Epigenetically Represses Hedgehog signaling in MEN1 Tumor Syndrome. *Cancer research* **73**(8), 2650-2658 (2013).
93. Falchetti, A.: Genetics of multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome: what's new and what's old. *F1000Research* **6** (2017).
94. Concolino, P., Costella, A., Capoluongo, E.: Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): An update of 208 new germline variants reported in the last nine years. *Cancer genetics* **209**(1-2), 36-41 (2016).
95. Tsukada, T., Nagamura, Y., Ohkura, N.: MEN1 gene and its mutations: basic and clinical implications. *Cancer science* **100**(2), 209-215 (2009).
96. De Carlo, E., Pilon, C., Zatelli, M.C., Degli Uberti, E.C., Fallo, F.: Isolated R171Q amino acid change in MEN1 gene: polymorphism or mutation? *Clinical endocrinology* **69**(3), 511-511 (2008).
97. Lim, L.C., Tan, M.H., Eng, C., Teh, B.T., Rajasoorya, R.C.: Thymic carcinoid in multiple endocrine neoplasia 1: genotype-phenotype correlation and prevention. *J Intern Med* **259**(4), 428-432 (2006).
98. Kouvaraki, M.A., Lee, J.E., Shapiro, S.E., Gagel, R.F., Sherman, S.I., Sellin, R.V., Cote, G.J., Evans, D.B.: Genotype-phenotype analysis in multiple endocrine neoplasia type 1. *Arch Surg* **137**(6), 641-647 (2002).
99. Wilhelm, S.M., Wang, T.S., Ruan, D.T., et al.: The american association of endocrine surgeons guidelines for definitive management of primary hyperparathyroidism. *JAMA Surgery* **151**(10), 959-968 (2016).
100. Öberg, K., Knigge, U., Kwekkeboom, D., Perren, A.: Neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* **23**(suppl_7), vii124-vii130 (2012).
101. Melmed, S., Casanueva, F.F., Hoffman, A.R., Kleinberg, D.L., Montori, V.M., Schlechte, J.A., Wass, J.A.: Diagnosis and treatment of hyperprolactinemia: an

- Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **96**(2), 273-288 (2011).
102. Melmed, S., Casanueva, F.F., Klibanski, A., Bronstein, M.D., Chanson, P., Lamberts, S.W., Strasburger, C.J., Wass, J.A., Giustina, A.: A consensus on the diagnosis and treatment of acromegaly complications. *Pituitary* **16**(3), 294-302 (2013).
103. Nieman, L.K., Biller, B.M., Findling, J.W., Murad, M.H., Newell-Price, J., Savage, M.O., Tabarin, A.: Treatment of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* **100**(8), 2807-2831 (2015).
104. Ntali, G., Capatina, C., Grossman, A., Karavitaki, N.: Clinical review: Functioning gonadotroph adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **99**(12), 4423-4433 (2014).
105. Lenders, J.W.M., Duh, Q.-Y., Eisenhofer, G., Gimenez-Roqueplo, A.-P., Grebe, S.K.G., Murad, M.H., Naruse, M., Pacak, K., Young, J.W.F.: Pheochromocytoma and Paraganglioma: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **99**(6), 1915-1942 (2014).
106. 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* **175**(2), G1-g34 (2016).
107. Öberg, K., Hellman, P., Ferolla, P., Papotti, M.: Neuroendocrine bronchial and thymic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Annals of Oncology* **23**(suppl_7), vii120-vii123 (2012).
108. Mansour, A., Chatila, R., Bejjani, N., Dagher, C., Faour, W.H.: A novel xylene-free deparaffinization method for the extraction of proteins from human derived formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) archival tissue blocks. *MethodsX* **1**, 90-95 (2014).
109. Howland, J.L.: Short protocols in molecular biology, third edition: Edited by F Ausubel, R Brent, R E Kingston, D D Moore, J G Seidman, J A Smith and K Struhl. P 836. John Wiley & Sons, New York. 1995. \$74.95. ISBN 0-471-13781-2. *Biochemical Education* **24**(1), 68-68 (1996).

110. Manickam, P., Guru, S.C., Debelenko, L.V., Agarwal, S.K., Olufemi, S.E., Weisemann, J.M., Boguski, M.S., Crabtree, J.S., Wang, Y., Roe, B.A., Lubensky, I.A., Zhuang, Z., Kester, M.B., Burns, A.L., Spiegel, A.M., Marx, S.J., Liotta, L.A., Emmert-Buck, M.R., Collins, F.S., Chandrasekharappa, S.C.: Eighteen new polymorphic markers in the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) region. *Human genetics* **101**(1), 102-108 (1997).
111. Debelenko, L.V., Emmert-Buck, M.R., Manickam, P., Kester, M., Guru, S.C., DiFranco, E.M., Olufemi, S.E., Agarwal, S., Lubensky, I.A., Zhuang, Z., Burns, A.L., Spiegel, A.M., Liotta, L.A., Collins, F.S., Marx, S.J., Chandrasekharappa, S.C.: Haplotype analysis defines a minimal interval for the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. *Cancer research* **57**(6), 1039-1042 (1997).
112. Giusti, F., Cianferotti, L., Boaretto, F., Cetani, F., Cioppi, F., Colao, A., Davi, M.V., Faggiano, A., Fanciulli, G., Ferolla, P., Ferone, D., Fossi, C., Giudici, F., Gronchi, G., Loli, P., Mantero, F., Marcocci, C., Marini, F., Masi, L., Opocher, G., Beck-Peccoz, P., Persani, L., Scillitani, A., Sciortino, G., Spada, A., Tomassetti, P., Tonelli, F., Brandi, M.L.: Multiple endocrine neoplasia syndrome type 1: institution, management, and data analysis of a nationwide multicenter patient database. *Endocrine* (2017).
113. Dackiw, A.P., Cote, G.J., Fleming, J.B., Schultz, P.N., Stanford, P., Vassilopoulou-Sellin, R., Evans, D.B., Gagel, R.F., Lee, J.E.: Screening for MEN1 mutations in patients with atypical endocrine neoplasia. *Surgery* **126**(6), 1097-1103; discussion 1103-1094 (1999).
114. Skogseid, B., Rastad, J., Oberg, K.: Multiple endocrine neoplasia type 1. Clinical features and screening. *Endocrinology and metabolism clinics of North America* **23**(1), 1-18 (1994).
115. Kopp, I., Bartsch, D., Wild, A., Schilling, T., Nies, C., Bergenfelz, A., Rieder, H., Simon, B., Rothmund, M.: Predictive genetic screening and clinical findings in multiple endocrine neoplasia type I families. *World journal of surgery* **25**(5), 610-616 (2001).
116. Waldmann, J., Fendrich, V., Habbe, N., Bartsch, D.K., Slater, E.P., Kann, P.H., Rothmund, M., Langer, P.: Screening of patients with multiple endocrine

- neoplasia type 1 (MEN-1): a critical analysis of its value. *World journal of surgery* **33**(6), 1208-1218 (2009).
117. Clerici, T., Schmid, C., Komminoth, P., Lange, J., Spinass, G.A., Brandle, M.: 10 Swiss kindreds with multiple endocrine neoplasia type 1: assessment of screening methods. *Swiss medical weekly* **131**(25-26), 381-386 (2001).
118. Teh, B.T., Zedenius, J., Kytölä, S., Skogseid, B., Trotter, J., Choplin, H., Twigg, S., Farnebo, F., Giraud, S., Cameron, D., Robinson, B., Calender, A., Larsson, C., Salmela, P.: Thymic carcinoids in multiple endocrine neoplasia type 1. *Ann Surg* **228**(1), 99-105 (1998).
119. Goudet, P., Bonithon-Kopp, C., Murat, A., Ruzniewski, P., Niccoli, P., Menegaux, F., Chabrier, G., Borson-Chazot, F., Tabarin, A., Bouchard, P., Cadiot, G., Beckers, A., Guilhem, I., Chabre, O., Caron, P., Du Boullay, H., Verges, B., Cardot-Bauters, C.: Gender-related differences in MEN1 lesion occurrence and diagnosis: a cohort study of 734 cases from the Groupe d'etude des Tumeurs Endocrines. *Eur J Endocrinol* **165**(1), 97-105 (2011).
120. O'Brien, T., O'Riordan, D.S., Gharib, H., Scheithauer, B.W., Ebersold, M.J., van Heerden, J.A.: Results of treatment of pituitary disease in multiple endocrine neoplasia, type I. *Neurosurgery* **39**(2), 273-278; discussion 278-279 (1996).
121. Oberg, K., Skogseid, B., Eriksson, B.: Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1). Clinical, biochemical and genetical investigations. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* **28**(3), 383-387 (1989).
122. Skogseid, B., Eriksson, B., Lundqvist, G., Lorelius, L.E., Rastad, J., Wide, L., Akerstrom, G., Oberg, K.: Multiple endocrine neoplasia type 1: a 10-year prospective screening study in four kindreds. *J Clin Endocrinol Metab* **73**(2), 281-287 (1991).
123. Ballard, H.S., Fame, B., Hartsock, R.J.: FAMILIAL MULTIPLE ENDOCRINE ADENOMA-PEPTIC ULCER COMPLEX. *Medicine (Baltimore)* **43**, 481-516 (1964).
124. Wang, S., Tang, J., Sun, T., Zheng, X., Li, J., Sun, H., Zhou, X., Zhou, C., Zhang, H., Cheng, Z., Ma, H., Sun, H.: Survival changes in patients with small cell lung cancer and disparities between different sexes, socioeconomic statuses and ages. *Scientific Reports* **7**(1), 1339 (2017).

125. Jamilloux, Y., Favier, J., Pertuit, M., Delage-Corre, M., Lopez, S., Teissier, M.P., Mathonnet, M., Galinat, S., Barlier, A., Archambeaud, F.: A MEN1 syndrome with a paraganglioma. *European journal of human genetics : EJHG* **22**(2), 283-285 (2014).
126. Davies, S.J., Gosney, J.R., Hansell, D.M., Wells, A.U., du Bois, R.M., Burke, M.M., Sheppard, M.N., Nicholson, A.G.: Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia: an under-recognised spectrum of disease. *Thorax* **62**(3), 248-252 (2007).
127. Dreijerink , K.M.A., Goudet , P., Burgess , J.R., Valk , G.D.: Breast-Cancer Predisposition in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *New England Journal of Medicine* **371**(6), 583-584 (2014).
128. Kim, H.J., Park, J.S., Kim, C.S., Kang, E.S., Cha, B.S., Lim, S.K., Kim, K.R., Lee, H.C., Ahn, C.W.: A Case of Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 Combined with Papillary Thyroid Carcinoma. *Yonsei medical journal* **49**(3), 503-506 (2008).
129. Desai, D., McPherson, L.A., Higgins, J.P., Weigel, R.J.: Genetic analysis of a papillary thyroid carcinoma in a patient with MEN1. *Annals of surgical oncology* **8**(4), 342-346 (2001).
130. Ito, T., Igarashi, H., Uehara, H., Berna, M.J., Jensen, R.T.: Causes of death and prognostic factors in multiple endocrine neoplasia type 1: a prospective study: comparison of 106 MEN1/Zollinger-Ellison syndrome patients with 1613 literature MEN1 patients with or without pancreatic endocrine tumors. *Medicine (Baltimore)* **92**(3), 135-181 (2013).
131. Tham, E., Grandell, U., Lindgren, E., Toss, G., Skogseid, B., Nordenskjold, M.: Clinical testing for mutations in the MEN1 gene in Sweden: a report on 200 unrelated cases. *J Clin Endocrinol Metab* **92**(9), 3389-3395 (2007).
132. Gadelha, M.R., Kasuki, L., Korbonits, M.: The genetic background of acromegaly. *Pituitary* **20**(1), 10-21 (2017).
133. Ronchi, C.L., Peverelli, E., Herterich, S., Weigand, I., Mantovani, G., Schwarzmayer, T., Sbiera, S., Allolio, B., Honegger, J., Appenzeller, S., Lania, A.G., Reincke, M., Calebiro, D., Spada, A., Buchfelder, M., Flitsch, J., Strom,

- T.M., Fassnacht, M.: Landscape of somatic mutations in sporadic GH-secreting pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol* **174**(3), 363-372 (2016).
134. Pea, A., Hruban, R.H., Wood, L.D.: Genetics of pancreatic neuroendocrine tumors: implications for the clinic. *Expert review of gastroenterology & hepatology* **9**(11), 1407-1419 (2015)
135. Heppner, C., Kester, M.B., Agarwal, S.K., Debelenko, L.V., Emmert-Buck, M.R., Guru, S.C., Manickam, P., Olufemi, S.E., Skarulis, M.C., Doppman, J.L., Alexander, R.H., Kim, Y.S., Saggar, S.K., Lubensky, I.A., Zhuang, Z., Liotta, L.A., Chandrasekharappa, S.C., Collins, F.S., Spiegel, A.M., Burns, A.L., Marx, S.J.: Somatic mutation of the MEN1 gene in parathyroid tumours. *Nature genetics* **16**(4), 375-378 (1997).
136. Carling, T., Correa, P., Hessman, O., Hedberg, J., Skogseid, B., Lindberg, D., Rastad, J., Westin, G., Akerstrom, G.: Parathyroid MEN1 gene mutations in relation to clinical characteristics of nonfamilial primary hyperparathyroidism. *J Clin Endocrinol Metab* **83**(8), 2960-2963 (1998).
137. Farnebo, F., Teh, B.T., Kytola, S., Svensson, A., Phelan, C., Sandelin, K., Thompson, N.W., Hoog, A., Weber, G., Farnebo, L.O., Larsson, C.: Alterations of the MEN1 gene in sporadic parathyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **83**(8), 2627-2630 (1998).
138. Walch, A.K., Zitzelsberger, H.F., Aubele, M.M., Mattis, A.E., Bauchinger, M., Candidus, S., Prauer, H.W., Werner, M., Hofler, H.: Typical and atypical carcinoid tumors of the lung are characterized by 11q deletions as detected by comparative genomic hybridization. *The American journal of pathology* **153**(4), 1089-1098 (1998).
139. Rossi, G., Bertero, L., Marchio, C., Papotti, M.: Molecular alterations of neuroendocrine tumours of the lung. *Histopathology* **72**(1), 142-152 (2018).
140. Corbo, V., Dalai, I., Scardoni, M., Barbi, S., Beghelli, S., Bersani, S., Albarello, L., Doglioni, C., Schott, C., Capelli, P., Chilosi, M., Boninsegna, L., Becker, K.-F., Falconi, M., Scarpa, A.: MEN1 in pancreatic endocrine tumors: analysis of gene and protein status in 169 sporadic neoplasms reveals alterations in the vast majority of cases. *Endocrine-Related Cancer* **17**(3), 771-783 (2010).

141. Balogh, K., Hunyady, L., Patocs, A., Gergics, P., Valkusz, Z., Toth, M., Racz, K.: MEN1 gene mutations in Hungarian patients with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinical endocrinology* **67**(5), 727-734 (2007).
142. Peppas, M., Boutati, E., Kamakari, S., Pikounis, V., Peros, G., Koutsodontis, G., Metaxa-Mariatou, V., Economopoulos, T., Raptis, S.A., Hadjidakis, D.: Novel germline mutations of the MEN1 gene in Greek families with multiple endocrine neoplasia type 1. *Clinical endocrinology* **70**(1), 75-81 (2009).
143. Vierimaa, O., Ebeling, T.M.L., Kytölä, S., Bloigu, R., Eloranta, E., Salmi, J., Korpi-Hyövälti, E., Niskanen, L., Orvola, A., Elovaara, E., Gynther, A., Sane, T., Välimäki, M., Ignatius, J., Leisti, J., Salmela, P.I.: Multiple endocrine neoplasia type 1 in Northern Finland; clinical features and genotype–phenotype correlation. *European Journal of Endocrinology* **157**(3), 285-294 (2007).
144. Hao, W., Skarulis, M.C., Simonds, W.F., Weinstein, L.S., Agarwal, S.K., Mateo, C., James-Newton, L., Hobbs, G.R., Gibril, F., Jensen, R.T., Marx, S.J.: Multiple endocrine neoplasia type 1 variant with frequent prolactinoma and rare gastrinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **89** (2004).
145. Pannett, A.A., Thakker, R.V.: Somatic mutations in MEN type 1 tumors, consistent with the Knudson "two-hit" hypothesis. *J Clin Endocrinol Metab* **86**(9), 4371-4374 (2001).
146. Larsson, C., Skogseid, B., Oberg, K., Nakamura, Y., Nordenskjöld, M.: Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature* **332**(6159), 85-87 (1988).
147. Thakker, R.V., Bouloux, P., Wooding, C., Chotai, K., Broad, P.M., Spurr, N.K., Besser, G.M., O'Riordan, J.L.: Association of parathyroid tumors in multiple endocrine neoplasia type 1 with loss of alleles on chromosome 11. *N Engl J Med* **321**(4), 218-224 (1989).
148. Tycko, B.: Epigenetic gene silencing in cancer. *Journal of Clinical Investigation* **105**(4), 401-407 (2000).
149. Taguchi, R., Yamada, M., Horiguchi, K., Tomaru, T., Ozawa, A., Shibusawa, N., Hashimoto, K., Okada, S., Satoh, T., Mori, M.: Haploinsufficient and predominant expression of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1)-related

- genes, MLL, p27Kip1 and p18Ink4C in endocrine organs. *Biochem Biophys Res Commun* **415**(2), 378-383 (2011).
150. Kim, B.Y., Park, M.H., Woo, H.M., Jo, H.Y., Kim, J.H., Choi, H.J., Koo, S.K.: Genetic analysis of parathyroid and pancreatic tumors in a patient with multiple endocrine neoplasia type 1 using whole-exome sequencing. *BMC Medical Genetics* **18** (2017).
151. Shan, L., Nakamura, Y., Nakamura, M., Yokoi, T., Tsujimoto, M., Arima, R., Kameya, T., Kakudo, K.: Somatic mutations of multiple endocrine neoplasia type 1 gene in the sporadic endocrine tumors. *Lab Invest* **78**(4), 471-475 (1998).
152. Oberg, K.: Genetics and molecular pathology of neuroendocrine gastrointestinal and pancreatic tumors (gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors). *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* **16**(1), 72-78 (2009).
153. Schmidt, M.C., Henke, R.T., Stangl, A.P., Meyer-Puttlitz, B., Stoffel-Wagner, B., Schramm, J., von Deimling, A.: Analysis of the MEN1 gene in sporadic pituitary adenomas. *The Journal of pathology* **188**(2), 168-173 (1999).
154. Prezant, T.R., Levine, J., Melmed, S.: Molecular characterization of the men1 tumor suppressor gene in sporadic pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **83**(4), 1388-1391 (1998).
155. Evans, C.O., Brown, M.R., Parks, J.S., Oyesiku, N.M.: Screening for MEN1 tumor suppressor gene mutations in sporadic pituitary tumors. *Journal of endocrinological investigation* **23**(5), 304-309 (2000).

SKRAĆENICE

5-FU	5-fluorouracil
ACTH	adrenokortikotropni hormone
AIP	<i>Aryl hydrocarbon receptor interacting protein</i>
AK	Atipični karcinoid
ATP	Adenozin trifosfat
brNET	Bronhijalni neuroendokrini tumor
CDK	Ciklin zavisna kinaza
CDKI	Ciklin-zavisnih kinazni inhibitori
CDKN1a	Ciklin zavisna kinaza N1a
CDKN1b	Ciklin zavisna kinaza N1B
CDKN2b	Ciklin zavisna kinaza N2B
CDKN2c	Ciklin zavisna kinaza N2c
CT	Kompjuterizovana tomografija
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dpNET	Duodenopankreatični neuroendokrini tumor
ECL-oma	<i>Enterochromaffine-like cells tumor</i>
EDTA	Etilendiamintetrasirćetna kiselina
ENETS	<i>European Neuroendocrine Tumor Society</i>
Era	Estrogeni receptor alfa
ERK	<i>Extracellular Signal-regulated Kinase-1</i>
EUZ	Endoskopski ultrazvuk
FANCD2	<i>Fanconi anemia group D2 protein</i>
GEP NET	Gastroentero-pankreatični neuroendokrini tumor
GFR	<i>Glomerular filtration rate</i>
GPR101	<i>G Protein-Coupled Receptor 101</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTE	<i>Groupe d'Etude des Tumeurs Endocrines</i>
GVS	Glukagonom/vipom/somatostatinom
H3K4	Histon H3 lizin 4 metiltransferaza

HB9 Hlxb9	Homeoboks 9
HDAC1/2	Histon deacetilaza 1/2
Hh	Hedžhog
HHM	Humoralna hiperkalcemija u malignitetu
HOX	Homeobox
HR	<i>Hazard ratio</i>
HR	Hormon rasteња
Jun-D	Transkripcijski faktor Jun-D
LOH	<i>Loss of heterozigocity</i>
MAH	Makronodularna hiperplazija
MEN1	Multipla endokrina neoplazija tip 1
MEN2	Multipla endokrina neoplazija tip 2
MEN4	Multipla endokrina neoplazija tip 4
MENX	Multipla endokrina neoplazija tip X
MiNEN	Miksna neuroendokrina – neneuroendokrina neoplazma
MLL 1-2	<i>Mixed lineage leukemia proteins 1-2</i>
MLPA	Multiplex ligation-dependent probe amplification
MML1-FP	MML1- fuzioni protein
NET	Neuroendokrini tumor
NF-pNET	Nefunkcijski pankreasni neuroendokrini tumor
NK-kB	Nuklearni faktor kapa B
NLS	Nuklearni lokalizacioni signal
NMR	Nuklearna magnetna rezonancija
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	<i>Odds ratio</i>
Pem	<i>Protein-energy malnutrition</i>
Pgl	Paragangliom
PHPT	Primarni hiperparatiroidizam
pNET	Pankreasni neuroendokrini tumor
PP	Pankreasni polipeptid
PPARg	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PRL	Prolaktin

PRMT5	Protein arginin metiltransferaza 5
PRRT	<i>Peptide receptor radiotherapy</i>
PTH	Parathormon
PTK	Papilarni tiroidni karcinom
RET	<i>Rearranged during transfection</i>
RNK	Ribonukleinska kiselina
RPA2	<i>Replication Protein A 2</i>
RunX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SAD	Sjedinjene Američke Države
SCLNEC	Sitnoćelijski neuroendokrini karcinom pluća
Smad3	Signalni protein Smad3
SOS1	<i>Son of sevenless 1 protein</i>
sPHPT	Sporadični primarni hiperparatiroidizam
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TK	Tipični karcinoid
tNET	Timusni neuroendokrini tumor
VIP	Vazoaktivni intestinalni peptid
WES	<i>Whole exome sequencing</i>
XLAG	<i>X-linked acrogigantism</i>

BIOGRAFIJA

Dr Tatjana Isailović rođena 1976. godine, diplomirala je na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu 2003. godine sa prosečnom ocenom 9,0. Opšti lekarski staž obavila je u Kliničkom centru Srbije, stručni ispit položila 2004. godine, a od 2006. godine je u stalnom radnom odnosu u Klinici za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije, na Odeljenju za neuroendokrine tumore i nasledne kancerske sindrome. Poslediplomske magistarske studije iz oblasti endokrinologije upisala je 2004. godine, usmeni magistarski ispit položila 2009. godine sa ocenom 10 (deset) a magistarsku tezu pod nazivom: “Uloga *Bcl1* polimorfizma gena za glukokortikoidni receptor u nastanku metaboličkog sindroma i koronarne bolesti” odbranila je 2010. godine. Specijalizaciju iz Interne medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu završila je 2012. godine sa najvišom ocenom. U zvanje kliničkog asistenta na Medicinskom fakultetu u Beogradu iz oblasti Interne medicine imenovana je 2016. godine. Veće naučnih oblasti medicinskih nauka Univerziteta u Beogradu je 12.07.2016. godine dr Tatjani Isailović dalo saglasnost za izradu doktorske disertacije sa temom: „Kliničke i epidemiološke karakteristike sindroma multiple endokrine neoplazije tip 1 i mehanizmi inaktivacije *MEN1* gena u tumorskim tkivima endokrinog i van endokrinog sistema“ pod mentorstvom Prof. dr Svetozara Damjanovića.

Član je Evropskog društva za endokrinologiju (ESE) od 2008. godine. U periodu od 2015 – 2018. godine bila je član Glavnog odbora EYES (*European Young Endocrine Scientists*) pod patronatom ESE. Od 2018. godine član je ESE fokusne grupe za oblast adrenalnih i neuroendokrinih tumora. Predstavljala je radove na više endokrinoloških kongresa i učestvovala kao predavač po pozivu na više međunarodnih poslediplomskih kurseva i kontinuirane edukacije u oblasti endokrinologije. Autor i koautor je u više publikacija objavljenih u domaćim i stranim časopisima i međunarodnim kongresima. Dobitnik je nagrade na Kongresu mladih endokrinologa centralne Evrope 2013. godine u Vroclavu, Poljska, sa radom pod nazivom: „*MEN1 and pituitary adenomas in children and young adults*”.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani-a Tatiana Isailović

broj upisa _____

Izjavljujem

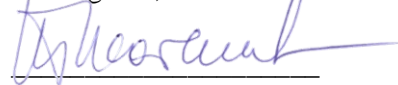
da je doktorska disertacija pod naslovom:

„ Kliničke i epidemiološke karakteristike sindroma multiple endokrine neoplazije tip 1 i mehanizmi inaktivacije MEN1 gena u tumorskim tkivima endokrinog i van endokrinog sistema “

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio/la autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.04.2018.



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Tatjana Isailović

Broj upisa _____

Studijski program _____

Naslov rada : „ Kliničke i epidemiološke karakteristike sindroma multiple endokrine neoplazije tip 1 i mehanizmi inaktivacije MEN1 gena u tumorskim tkivima endokrinog i van endokrinog sistema “

Mentor Prof. dr Svetozar Damjanović

Potpisani Tatjana Isailović

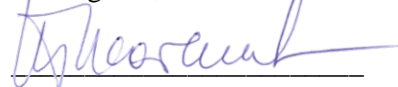
izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.04.2018.



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

„ Kliničke i epidemiološke karakteristike sindroma multiple endokrine neoplazije tip 1 i mehanizmi inaktivacije MEN1 gena u tumorskim tkivima endokrinog i van endokrinog sistema “

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

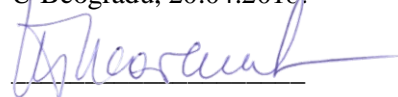
Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo - nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 20.04.2018.



1. Autorstvo - Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.

2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

3. Autorstvo - nekomercijalno – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.

4. Autorstvo - nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

5. Autorstvo – bez prerade. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.

6. Autorstvo - deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada. Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.