

**Uniwersytet Jagielloński**

**Collegium Medicum**

**Anna Kurzyńska**

**Wykorzystanie badań genetycznych w wybranych rzadkich  
chorobach endokrynologicznych**

**Genetic testing in selected rare endocrine disorders**

*Praca doktorska*

**Promotor: dr hab. n. med. Elwira Przybylik-Mazurek**

**Pracę wykonano w Katedrze i Klinice Endokrynologii Collegium Medicum UJ**

**Kierownik jednostki: prof. dr hab. n. med. Alicja Hubalewska-Dydejczyk**

**Kraków, 2022 rok**

## **Podziękowania**

*Składam serdeczne podziękowania  
Pani dr hab. n. med. Elwirze Przybylik-Mazurek,  
za promotorską opiekę i życzliwość  
od początku mojej pracy w Klinice Endokrynologii.*

*Dziękuję Kierownikowi Kliniki, Pani prof. dr hab. n. med. Alicji Hubalewskiej-Dydejczyk,  
za umożliwienie rozwoju naukowego i nieustanną inspirację.*

*Dziękuję Pani prof. dr hab. n. med. Dorocie Pach, za pomoc w realizacji badań  
oraz dr n. med. Annie Skalniak, za pomoc w opracowaniu wyników.*

*Rodzicom, za zaszczepienie we mnie pasji do medycyny.*

*Moim Najbliższym, Mężowi i Dzieciom, za wiarę we mnie, wsparcie i wyrozumiałość.*

## Spis treści

1.	Wykaz publikacji stanowiących rozprawę .....	4
2.	Wykaz skrótów .....	5
3.	Wstęp i uzasadnienie podjęcia badań .....	6
3.1	Wrodzony przerost nadnerczy – podłoże genetyczne oraz korelacja genotyp – fenotyp .....	6
3.2	Nowotwory neuroendokrynne – genetyka i rola polimorfizmów.....	7
3.3	Przyzwojaki – czy rodzaj zaburzenia genetycznego warunkuje przebieg kliniczny i dziedziczenie?.....	8
4.	Cele pracy .....	9
5.	Publikacje .....	10
5.1	Publikacja 1: <b>Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland – experience of a clinical center.</b> Kurzyńska A, Skalniak A, Franson K, Bistika V, Hubalewska-Dydejczyk A, Przybylik-Mazurek E. <i>Hormones (Athens)</i> . 2022 Jun;21(2):241-249. doi: 10.1007/s42000-022-00348-z. Epub 2022 Jan 26. PMID: 35079965; PMCID: PMC9130175	
5.2	Publikacja 2: <b>Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors – potential Clinical Relevance.</b> Kurzyńska A, Pach D, Skalniak AE, Stefańska A, Opalińska M, Przybylik-Mazurek E, Hubalewska-Dydejczyk A. <i>J Clin Med</i> . 2022 Sep 21;11(19):5536. doi: 10.3390/jcm11195536. PMID: 36233401; PMCID: PMC9573749	
5.3	Publikacja 3: <b>A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in <i>SDHD</i>.</b> Kurzyńska A, Przybylik-Mazurek E, Skalniak A, Buziak-Bereza M, Brzozowska-Czarnek A, Tomaszewska R, Hubalewska-Dydejczyk A. <i>Endokrynol Pol</i> . 2021;72(4):403. doi: 10.5603/EP.a2021.0050. Epub 2021 May 19. PMID: 34010450	
6.	Podsumowanie wyników i wnioski.....	35
7.	Streszczenie pracy doktorskiej w języku polskim .....	40
8.	Streszczenie pracy doktorskiej w języku angielskim .....	43
9.	Piśmiennictwo .....	46
10.	Oświadczenia współautorów prac .....	49

## 1. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę

Niniejsza rozprawa doktorska pt.: "**Wykorzystanie badań genetycznych w wybranych rzadkich chorobach endokrynologicznych**", powstała w oparciu o cykl trzech artykułów (2 artykułów oryginalnych i 1 opisu przypadku) opublikowanych w międzynarodowych czasopismach naukowych indeksowanych w bazie PubMed oraz znajdujących się na liście Journal Citation Reports (Thomson Reuters, Clarivate Analytics).

1. Kurzyńska A, Skalniak A, Franson K, Bistika V, Hubalewska-Dydejczyk A, Przybylik-Mazurek E. **Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland – experience of a clinical center.** Hormones (Athens). 2022 Jun;21(2):241-249. doi: 10.1007/s42000-022-00348-z. Epub 2022 Jan 26. PMID: 35079965; PMCID: PMC9130175  
punkty MNiSW: 70  
impact factor: 3.419
2. Kurzyńska A, Pach D, Skalniak AE, Stefańska A, Opalińska M, Przybylik-Mazurek E, Hubalewska-Dydejczyk A. **Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors – Potential Clinical Relevance.** J Clin Med. 2022 Sep 21;11(19):5536. doi: 10.3390/jcm11195536. PMID: 36233401; PMCID: PMC9573749  
punkty MNiSW: 140  
impact factor: 4.964
3. Kurzyńska A, Przybylik-Mazurek E, Skalniak A, Buziak-Bereza M, Brzozowska-Czarnek A, Tomaszewska R, Hubalewska-Dydejczyk A. **A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in *SDHD*.** Endokrynol Pol. 2021;72(4):403. doi: 10.5603/EP.a2021.0050. Epub 2021 May 19. PMID: 34010450  
punkty MNiSW: 70  
impact factor: 1.569

Sumaryczna liczba punktów MNiSW: 280

Sumaryczny impact factor: 9.952



## 2. Wykaz skrótów

21OHD – 21-hydroksylaza

DES – rozlany system endokryny (ang. *diffuse endocrine system*)

GEP NEN – nowotwór neuroendokryny żołądkowo-jelitowo-trzustkowy (ang. *gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasm*)

MEN – zespół mnogich nowotworów gruczołów wydzielania wewnętrznego (ang. *multiple endocrine neoplasia*)

MLPA – zależna od ligacji multipleksowa amplifikacja sond (ang. *multiplex ligation-dependent probe amplification*)

NEC – rak neuroendokryny (ang. *neuroendocrine carcinoma*)

NEN – nowotwór neuroendokryny (ang. *neuroendocrine neoplasm*)

NET – guz neuroendokryny (ang. *neuroendocrine tumour*)

NF1 – neurofibromatoza typu 1

PPV – pozytywna wartość predykcyjna (ang. *positive predictive value*)

SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. *single nucleotide polymorphism*)

SV – wirylizacja prosta (ang. *simple virilization*)

SW – postać z utratą soli (ang. *salt wasting*)

TSC – zespół stwardnienia guzowatego (ang. *tuberous sclerosis complex*)

VHL – zespół *von Hippel-Lindau*

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. *World Health Organisation*)

WPN – wrodzony przerost nadnerczy

### **3. Wstęp i uzasadnienie podjęcia badań**

Badania molekularne stanowią jedną z kluczowych i dynamicznie rozwijających się metod diagnostycznych współczesnej endokrynologii. Poszukiwanie zmian genetycznych pozwala nie tylko na ustalenie prawidłowego rozpoznania czy przewidywanie przebiegu klinicznego danej jednostki chorobowej, ale może również wpływać na dobór optymalnej sekwencji leczenia, co płynnie wpisuje się w nowoczesne koncepcje rozwoju onkologii endokrynologicznej, takie jak medycyna spersonalizowana.

Założeniem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie zagadnień związanych z wykorzystaniem badań genetycznych w wybranych rzadkich zaburzeniach endokrynologicznych: klasycznej postaci wrodzonego przerostu nadnerczy, guzach neuroendokrynnych oraz przyzwojakach.

#### **3.1 Wrodzony przerost nadnerczy – podłoże genetyczne oraz korelacja genotyp-fenotyp**

Wrodzony przerost nadnerczy (WPN) to dziedziczne autosomalnie recesywnie zaburzenie wywołane zmianami molekularnymi w jednym z genów kodujących enzymy szlaku sterydogenezy nadnerczowej [1]. Około 90% do 95% przypadków WPN jest spowodowanych niedoborem 21-hydroksylazy (21OHD) wynikającym z nieprawidłowości molekularnych w genie *CYP21A* [2]. W zależności od stopnia upośledzenia aktywności enzymu 21OHD, WPN może przybierać różne formy kliniczne – cięższą formę klasyczną oraz formę nieklasyczną, z łagodniej wyrażonymi objawami klinicznymi. Częstość występowania formy klasycznej ocenia się na od 1 : 14 000 do 1 : 18 000 urodzeń, natomiast formy nieklasycznej na 1 : 1000 osób i jest ona znacznie większa w niektórych grupach etnicznych (np. u Eskimosów Yupik czy wśród mieszkańców rejonu basenu Morza Śródziemnego) [2, 3].

Postać klasyczną dodatkowo można podzielić na formę przebiegającą z utratą soli (SW) oraz wirylizację prostą (SV). W postaci SW resztkowa aktywność 21OHD jest niewielka lub nie ma jej wcale, co skutkuje ciężkim niedoborem kortyzolu i aldosteronu oraz nadmiarem androgenów, a objawy kliniczne pojawiają się już w pierwszych dniach lub tygodniach życia. Postać SV cechuje się znacznym niedoborem kortyzolu i nadmiarem androgenów, ale bez istotnego ograniczenia syntezy aldosteronu, i zwykle jest rozpoznawana we wczesnym dzieciństwie.

Szerokie spektrum fenotypów WPN jest związane z różnymi typami zaburzeń molekularnych w obrębie genu *CYP21A2*, które mogą skutkować częściową lub całkowitą utratą aktywności 21OHD. W literaturze opisano ponad 200 wariantów patogennych genu *CYP21A2* [4, 5]. Wyniki dotychczasowych badań wykazały, że korelacja pomiędzy genotypem a fenotypem występuje w około 80–100% przypadków [6, 7]. Badania prowadzone przez New i wsp. pokazały jednak, że związek pomiędzy genotypem a fenotypem może być znacznie mniejszy i wynosić jedynie 50% [8]. Co więcej, częstości występowania poszczególnych genotypów *CYP21A2* wykazują zróżnicowanie etniczne. Do tej pory nie publikowano badań charakteryzujących genotypy WPN oraz określających korelację genotyp-fenotyp w grupie polskich pacjentów.

### **3.2 Nowotwory neuroendokrynne – genetyka i rola polimorfizmów**

Nowotwory neuroendokrynne (NEN) stanowią heterogenną grupę nowotworów wywodzących się z komórek endokrynych rozproszonych w całym organizmie i tworzących rozlany system endokryny (DES). Około 70% nowotworów neuroendokrynych wywodzi się z przewodu pokarmowego (GEP NEN), co stanowi około 2% wszystkich nowotworów układu pokarmowego [9]. Cechą charakterystyczną NEN jest zdolność do produkcji, wydzielania i magazynowania hormonów peptydowych i amin biogennych. Guzy te mogą wykazywać czynność hormonalną, dając charakterystyczny obraz kliniczny (np. zespołu rakowiaka), jednak znaczna ich część jest hormonalnie nieczynna, co istotnie opóźnia rozpoznanie.

Według klasyfikacji histopatologicznej WHO z 2019 roku GEP NEN obejmują zarówno wysokozróżnicowane guzy neuroendokrynne (NETs), klasyfikowane jako G1, G2, G3, jak również niskozróżnicowane raki neuroendokrynne (NECs) [10]. Podłoże genetyczne NEN, pomimo wielu badań, nie zostało w pełni wyjaśnione. Większość ma charakter sporadyczny, a jedynie niewielki odsetek występuje w przebiegu zespołów genetycznych, takich jak zespół mnogich nowotworów gruczołów wydzielania wewnętrznego typu 1 (MEN1), zespół mnogich nowotworów gruczołów wydzielania wewnętrznego typu 4 (MEN4), zespół von Hippel-Lindau (VHL), neurofibromatoza typu 1 (NF1), czy zespół stwardnienia guzowatego (TSC) [11]. Ponieważ częstość występowania NEN stale rośnie (wskaźnik zapadalności skorygowany o wiek dla GEP-NET wzrósł 6,4 razy z 1,09 na 100 000 w 1973 r. do 6,98 na 100 000 w 2012 r.) [12], kluczowe jest lepsze zrozumienie zmian molekularnych leżących u podłoża NET, co może się przełożyć na poprawę możliwości diagnostyczno-terapeutycznych. Niemniej, rzadsze

w stosunku do innych nowotworów złośliwych występowanie NET stanowiło istotne ograniczenie jeśli chodzi o prowadzenie badań populacyjnych dotyczących polimorfizmów genetycznych w NET. Do tej pory opublikowano niewiele danych na ten temat. Istnieją natomiast doniesienia, że polimorfizmy pojedynczych nukleotydów mogą w przyszłości stanowić marker przydatny w przewidywaniu odpowiedzi na terapię radioizotopową i prognozowaniu jej toksyczności [13].

### **3.3 Przyzwojaki – czy rodzaj zaburzenia genetycznego warunkuje przebieg kliniczny i dziedziczenie?**

Pryzwojak (paraganglioma) to rzadki nowotwór neuroendokryny wywodzący się z ciałek przyzwojowych układu przywspółczulnego (pryzwojaki niechromochłonne) i układu współczulnego (pryzwojaki chromochłonne). Paraganglioma mogą być związane z dziedzicznymi autosomalnie dominująco zmianami genetycznymi w obrębie genu kodującego dehydrogenazę bursztynianową (*SDHD*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHAF2*), jak również mogą występować w zespołach uwarunkowanych genetycznie, takich jak MEN 2A i 2B, NF1, VHL oraz zespole Carneya. W większości przypadków nie udaje się jednak ustalić podłoża genetycznego, paraganglioma, chociaż przyjmuje się, że około 40% z nich jest uwarunkowana genetycznie [14]. Stale oczekujemy na wyniki dalszych badań genetycznych, które miałyby wartość predykcyjną. Według aktualnie obowiązującej klasyfikacji WHO wszystkie przyzwojaki mają potencjał przerzutowania, ale markery pozwalające przewidzieć przebieg kliniczny wciąż nie są znane [15, 16].

### **Podsumowanie**

Badania genetyczne stanowią jedno z podstawowych narzędzi diagnostycznych współczesnej endokrynologii.

1. W przypadku WPN badania genetyczne pozwalają na ustalenie rozpoznania i przewidywanie przebiegu klinicznego. Konieczne jest oszacowanie częstości występowania poszczególnych genotypów *CYP21A2* w grupie pacjentów z WPN w różnych grupach etnicznych.
2. Dane literaturowe dotyczące roli polimorfizmów w nowotworach neuroendokryny są ograniczone. Analiza wybranych polimorfizmów pojedynczych nukleotydów może w przyszłości pozwolić na ocenę agresywności i odpowiedzi na leczenie.

3. Badania genetyczne dotyczące przyzwojaków umożliwiają przewidywanie przebiegu klinicznego oraz dziedziczenia. Stratyfikacja ryzyka złośliwości umożliwi optymalizację wyboru diagnostycznych metod obrazowych oraz personalizację leczenia.

## **4. Cele pracy**

### **Cele ogólne**

Niniejsza praca dotyczy wykazania roli badań genetycznych w wybranych rzadkich chorobach endokrynologicznych. Dane z piśmiennictwa podkreślają istotne znaczenie badań genetycznych w chorobach endokrynych.

Praca była próbą odpowiedzi na pytania czy na podstawie wykonanych badań genetycznych można lepiej przewidzieć fenotyp oraz przebieg kliniczny choroby. W przypadku chorób onkologicznych podjęto próbę weryfikacji dotychczasowych danych dotyczących zależności zmian genetycznych i potencjału przerzutowania NEN.

### **Cele szczegółowe obejmowały:**

1. Określenie korelacji pomiędzy genotypem a fenotypem u pacjentów z klasyczną postacią wrodzonego przerostu nadnerczy, wywołaną niedoborem 21-hydroksylazy w populacji pacjentów klinicznego ośrodka endokrynologicznego w Polsce południowej.
2. Ocenę wpływu wybranych wariantów genetycznych pojedynczych nukleotydów na ryzyko zachorowania oraz przebieg kliniczny guzów neuroendokrynych.
3. Powiązanie nietypowego przebiegu klinicznego agresywnego, dziedzicznego paraganglioma z patogennym wariantem w genie *SDHD*.

## 5. Publikacje

## 5.1

### **Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland – experience of a clinical center**

Kurzyńska A, Skalniak A, Franson K, Bistika V, Hubalewska-Dydejczyk A, Przybylik-Mazurek E.

Hormones (Athens). 2022 Jun;21(2):241-249. doi: 10.1007/s42000-022-00348-z. Epub 2022 Jan 26. PMID: 35079965; PMCID: PMC9130175

punkty MNiSW: 70

impact factor: 3.419



## Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland — experience of a clinical center

Anna Kurzyńska<sup>1</sup> · Anna Skalniak<sup>1</sup> · Kim Franson<sup>2</sup> · Viola Bistika<sup>3</sup> · Alicja Hubalewska-Dydejczyk<sup>1</sup> · Elwira Przybylik-Mazurek<sup>1</sup>

Received: 12 March 2021 / Accepted: 30 December 2021 / Published online: 26 January 2022  
© The Author(s) 2022

### Abstract

**Purpose** The prevalence of *CYP21A2* gene variants and genotype-phenotype correlations are variable among populations. The aim of this study was to characterize *CYP21A2* gene variants in adult patients with classical congenital adrenal hyperplasia (CAHA) from southern Poland and to analyze genotype-phenotype correlations.

**Materials/Methods** A total of 48 patients (30 women and 18 men) with CAHA were included in the study. Patients were divided into two clinical subgroups, namely, salt-wasting (SW) — 38 patients and simple virilizing (SV) — 10 patients. A genetic analysis MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) was performed in all of them. In dubious cases, the analysis was complemented by Sanger sequencing. Genotypes were classified into five groups (depending on the residual in vitro enzymatic activity), namely, *null*, A, B, C, and D, and correlated with the clinical picture.

**Results** Molecular defects were investigated and identified in 48 patients. The most common variant in the studied group was I2G, followed by whole or partial gene copy deletion, and I172N. One novel variant c.[878G>T] (p.Gly293Val) was found. In nine patients, a non-concordance between genotype and phenotype was observed. Genotype-phenotype correlations measured by positive predictive value (PPV) were as follows: 100% in group *null*, 90.5% in group A, and 66.7% in group B.

**Conclusions** *CYP21A2* variants in the studied cohort were similar to values previously reported in other countries of the region. There was a good correlation between genotype and phenotype in the *null* and A groups, the correlation being considerably lower in group B.

**Keywords** Congenital adrenal hyperplasia · *CYP21A2* · Genotype-phenotype correlation · 21-hydroxylase deficiency

### Introduction

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is an endocrine disorder caused by mutations of genes coding for the synthesis of enzymes involved in adrenal steroidogenesis. Based on the type of enzyme block, several CAH types can be distinguished. The most common type (which accounts for about 95–99% of cases) is related to mutation in the *CYP21A2* gene, encoding 21-hydroxylase, and may result

in different clinical forms, namely, classical, including salt-wasting (SW) and simple virilizing (SV), and nonclassical (NCAHA), the latter manifesting at a later age and characterized by milder symptoms [1–3]. The incidence of CAH is estimated at about 1:15,000 and differs among populations [4]. In some ethnic groups, the reported prevalence is higher (for example, in the population of La Réunion, it is 1:2141 [5], and among Yupik Eskimos, it is 1:280 [6]). In the Caucasian population, the prevalence of the disease varies from 1 in 5000 to 1 in 23,000 live births [7]. According to the latest data, in the USA, the incidence of CAH varies from 1:9941 to 1:28,661 live births [8]. The *CYP21A2* gene is located on the short arm of chromosome 6 (6p21.3) [9]. The inactive pseudogene, *CYP21A1P*, is 98% homologous compared to the active form of *CYP21A2* and contains variants which, when incorporated in the active gene, can lead to the loss of its functions. The majority of pathogenic variants

✉ Elwira Przybylik-Mazurek  
elwira.przybylik-mazurek@uj.edu.pl

<sup>1</sup> Clinical Department of Endocrinology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>2</sup> Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

<sup>3</sup> Faculty of Medicine, Hacettepe University, Ankara, Turkey



(about 90–95%) occurring within *CYP21A2* originate from this pseudogene. Within the active gene, there are also de novo variants causing only a small portion of inherited cases of CAH [10]. Different variants in the *CYP21A2* gene can lead to a variable degree of loss of 21-hydroxylase activity, which can result in various clinical presentations. To date, over 200 variants with a pathogenic role have been described [11, 12]. The majority of pathogenic variants in the *CYP21A2* gene are large conversions, large deletions, or one of nine small variants, as follows: p.Gly111Valfs\*21 (classically designated as “del8bp” or “Δ8bp”), exon 6 (“E6”) cluster (p.[Ile237Asn; Val238Glu; Met240Lys]), p.Leu308Phefs\*6 (“F306+T”), p.Gln319Ter (“Q318X”), p.Arg357Trp (“R356W”), p.Ile173Asn (“I172N”), p.Pro31Leu, p.Val282Leu, p.Pro454Ser, and c.293-13A/C>G (“I2G”) [13]. Molecular defects in Polish patients with CAH have not so far been analyzed. Therefore, the aim of our study was to identify the spectrum of variants in adult patients from southern Poland with classical congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency and to analyze genotype-phenotype correlations.

## Materials and methods

### Study population

Forty-eight adult patients diagnosed with CCAH due to 21-hydroxylase deficiency, treated at the Department of Endocrinology, University Hospital Medical College, Krakow, Poland, between 2015 and 2019 were enrolled in this study. In the study group, there were 30 women aged 28.20 (± 12.12) years and 18 men aged 27.70 (± 8.97) years. In total, 38 patients (79.17%) had the SW form and 10 (20.83%) the SV form. The CCAH diagnosis was made based on the clinical and physical examination and retrospective analysis of the patients’ medical history. Data such as age at onset of the disease, electrolyte disturbances, genital appearance, previous urological surgery, evidence of hyperandrogenism, hormonal data including 17-hydroxyprogesterone (17-OHP), ACTH, plasma renin activity (PRA), aldosterone levels, and treatment scheme were taken into consideration. Patients who presented symptoms of adrenal crisis as neonates were classified in the SW group. Patients diagnosed in early childhood, but without salt-wasting form symptoms, were assigned to the SV group.

This study is in compliance with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All patients signed an informed consent for participation in the study; an additional informed consent for the genetic analysis was also obtained. The study was approved by the Ethics Committee of the Jagiellonian University Medical College: KBET/225/B/2013.

### Statistical analysis

Continuous data with normal distribution are presented as mean value and standard deviation (SD), and non-normal variables are reported as median and interquartile range (IQR) (Me [Q1;Q3]). Categorical data are presented as percentages. Due to the small size of the groups, continuous data were compared using the Kruskal-Wallis test. Categorical data were compared using the chi-square test. A *P*-value below 0.05 was considered statistically significant. To obtain a visual representation of global patterns within the data, correspondence analysis was implemented. Data were analyzed using Statistica 13.0.

### Molecular analysis

DNA was extracted from peripheral blood samples using the NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel Inc.), according to the manufacturer’s protocol. Genetic analysis based on MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), with the use of the probemix SALSA MLPA P050 CAH from MRC Holland, was performed according to the manufacturer’s recommendations, using 50 ng of the isolated DNA per sample. The SALSA MLPA Probemix from MRC Holland, which enables detection of large rearrangements and seven of the most common point mutations in one reaction mix at the same time, was used as the first step of molecular testing of our studied group. In dubious cases, it was complemented by Sanger sequencing, based on the method published by Xu et al. [14]. For the long-range PCR reaction, Amplus polymerase (EurX Sp. z o.o.) was used according to the manufacturer’s recommendations, with 200 ng DNA per 25 µl reaction volume and betaine (Sigma-Aldrich) added to the reaction mixture at a final concentration of 1M. The reaction was performed on an Eppendorf Mastercycler realplex thermocycler with an annealing temperature of 61°C and 20 sec added to each elongation step beginning from cycle 21. After agarose gel verification, the remaining reaction mixture was purified with NucleoSpin PCR Clean-up (Macherey-Nagel). The sequencing PCR reaction was performed with Big-Dye Terminator v3.1 (ThermoFisher Applied Biosystems) and 120 ng of the purified PCR product in 10 µl reaction volume. The sequencing conditions were in accordance with the manufacturer’s recommendations, with an annealing temperature of 55 °C. Products were purified by ethanol precipitation, and pellets were resuspended in 20 µl nuclease-free water for capillary electrophoresis (ABI 3500, Applied Biosystems).

Four patients were excluded from further analysis because it was not possible to determine the distribution

of variants on individual alleles without performing molecular analysis of the patients' parents, who were not available for testing. Genotypes were categorized into five groups (according to the published residual *in vitro* activity of 21-hydroxylase, based on literature data [15, 16]), namely, groups *null*, A, B, C, and D, and then compared with the clinical presentation (excepting group C, which was excluded from further analyses). Group *null*, with 0% residual enzyme function, included patients with alterations found in both alleles of *CYP21A2*, causing a total absence of enzymatic activity (deletions, gene conversions, F306+T, del8bp, cluster E6, R356W, and Q318X). Group A (0–1% residual 21-hydroxylase activity) comprised patients who were I2G homozygotes or heterozygotes consisting of I2G and another variant, with minimal enzymatic activity (0–1%). Homozygous patients with the variant I172N (approximately 2% of residual 21-hydroxylase enzyme activity) or heterozygotes with the *null*, A, or B group variants were assigned to group B, with 1–2% residual enzyme activity. Genotype group C (patients with moderately impaired 21-hydroxylase activity and with about 20–60% preserved residual enzymatic function) were homozygotes or heterozygotes of the milder variants. Patients who were carriers of variants of unknown *in vitro* impact on residual enzymatic activity were assigned to genotype group D. The global representation of these classes with different *CYP21A2* variants is depicted in Fig. 1. The presented variants are numbered according

to reference sequences NM\_000500.9 (at DNA level) and NP\_000491.4 (at protein level). Additionally, common genetic variants are referred to in accordance with classically used designations to maintain coherence with other literature sources.

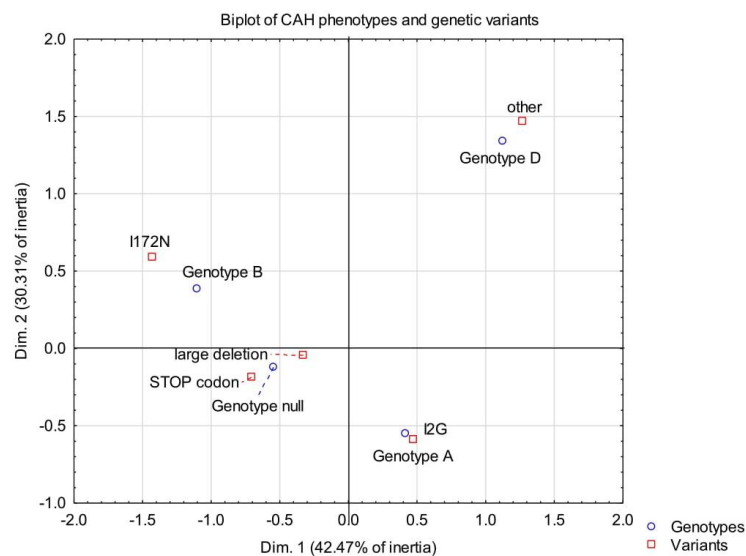
## Results

Among the group of 44 patients with CCAH (88 alleles), *CYP21A2* gene mutations were detected in all of them. A total of 100% of the analyzed 88 alleles revealed a mutation of the *CYP21A2* gene. The *CYP21A2* gene variants found in our study group are shown in Fig. 2.

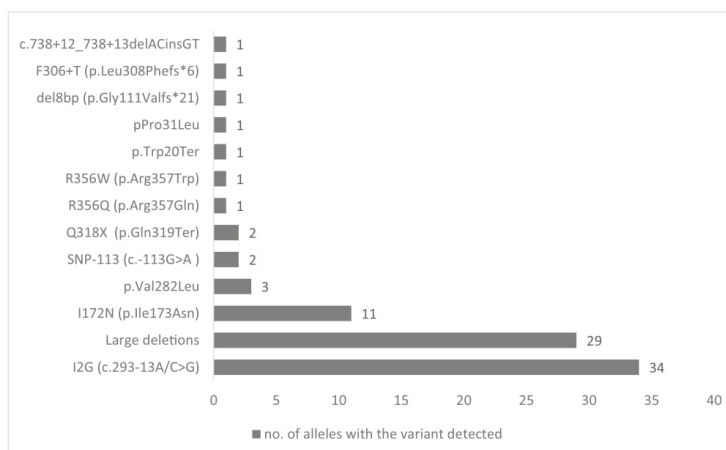
The most common alteration in CCAH patients was the I2G (c.293-13A/C>G) variant with an allele frequency of 38.63%, followed by large deletions and I172N (p.Ile173Asn) (32.95% and 12.5% of all alleles, respectively). Other detected variants, from the most to the least prevalent, were as follows: p.Val282Leu, SNP-113 (c.-113G>A), Q318X (p.Gln319Ter), R356Q (p.Arg357Gln), R356W (p.Arg357Trp), p.Trp20Ter, p.Pro31Leu, del8bp (p.Gly111Valfs\*21), F306+T (p.Leu308Phefs\*6), and c.738+12\_738+13delACinsGT.

Genetic variant distribution among the 88 alleles according to genotype groups *null*, A, B, and D is presented in Table 1.

**Fig. 1** *CYP21A2* variants found in 44 patients (88 alleles) with CCAH



**Fig. 2** Visual representation of data profiles — CAH genotypes and genetic variants



**Table 1** Genetic variants among 88 alleles

Genetic variants distribution among 88 alleles

	Genotype <i>null</i> <i>n</i> = 12	Genotype A <i>n</i> = 42	Genotype B <i>n</i> = 22	Genotype D <i>n</i> = 12	<i>p</i>
del	9 (75.0)	10 (23.8)	8 (36.4)	2 (16.7)	< 0.001
I172N	0	0	12 (54.5)	0	< 0.001
I2G	0	30 (71.4)	2 (9.1)	2 (16.7)	< 0.001
STOP codon	3 (25.0)	0	0	0	< 0.001
other	0	2 (4.8)	0	8 (66.7)	< 0.001

Categorical data were compared with the chi-square test

### Genotype-phenotype correlations

All genotypes were classified into four groups, as follows: *null*, group A, group B, and group D. Six patients were assigned to group *null*, 21 patients presented genotype A, and 11 had genotype B, while six patients were classified as genotype D.

Patients assigned to groups *null* and A were assumed to present a SW phenotype. Patients in genotype group B (with suspected sufficient residual 21-hydroxylase activity) were predicted to have the SV phenotype. Patients in group C were hypothesized to have the NCCAH clinical manifestation (but they were excluded from the study). Severe genotypes (*null* and A) demonstrated a good correlation with the expected phenotype, with positive predictive value (PPV) of 100 and 90.5%, respectively, whereas the less severe genotype B demonstrated a lower correlation (with PPV 66.7%). Nine patients presented a different phenotype from what had been expected (seven in the SW group and two in SV).

There were no differences in anthropometric data among the groups. In our study, patients with genotypes *null*, A,

and B were overweight, with a BMI of  $27.2 \pm 8.0$ ,  $27.3 \pm 5.9$ , and  $28.3 \pm 6.8$  kg/m<sup>2</sup>, respectively. Age at menarche was also comparable. Blood glucose values were higher in group A, with a trend towards statistical significance (*P*-value 0.056). The clinical and molecular data according to genotypes are illustrated in Table 2.

### Novel variant

One novel variant was found in one allele in the study group, namely, c.[878G>T] (p.Gly293Val). This variant has not yet been described in the literature. However, another variant at this position, c.878G>A (p.Gly293Asp), has been associated with CCAH and shown to result in residual enzyme activity of < 1% [17].

We used bioinformatics tools to predict the effect of the variant detected in our study on protein function. The identified variant, c.[878G>T], has been predicted to be deleterious by PROVEAN (scored  $-8.38$  at a cutoff of  $-2.5$ ) [18] and damaging by SIFT (scored 0.000 at a cutoff of 0.05) [19]. Also according to the Bayes classifier applied in



**Table 2** Clinical and molecular data according to genotypes

	Genotype <i>null</i> <i>n</i> = 6	Genotype A <i>n</i> = 21	Genotype B <i>n</i> = 11	Genotype D <i>n</i> = 6	<i>p</i>
Male sex (N [%])	2 (33.3)	7 (33.3)	3 (36.4)	1 (16.7)	0.861
CCAH type (N [%]):					0.010
SV	0 (0.0)	2 (9.5)	4 (36.4)	4 (66.7)	
SW	6 (100.0)	19 (90.5)	7 (63.6)	2 (33.3)	
Age of inclusion in the study (years)(Me [Q1; Q3])	20.5(19.0; 26.0)	28.0 (20.0; 31.0)	23.0 (20.0; 48.0)	24.0 (20.0; 28.0)	0.756
Menarche (years) (Me [Q1; Q3])	13.5 (12.5; 17.0)	13.0 (12.0; 14.5)	12.5 (11.0; 14.0)	12.0 (11.0; 14.0)	0.582
Height (cm)( $\bar{x} \pm$ SD)	161.3 $\pm$ 11.7	159.4 $\pm$ 11.9	161.6 $\pm$ 4.9	160.2 $\pm$ 10.2	0.978
BMI (kg/m <sup>2</sup> ) ( $\bar{x} \pm$ SD)	27.2 $\pm$ 8.0	27.3 $\pm$ 5.9	28.3 $\pm$ 6.8	22.0 $\pm$ 3.0	0.187
17-OHP serum concentration (nmol/L) (Me [Q1; Q3])	24.5 (6.0; 43.9)	28.7 (8.8; 60.5)	18.8 (14.2; 60.5)	14.2 (4.8; 33.0)	0.874
Fasting glucose (mmol/l) ( $\pm$ SD)	4.5 $\pm$ 0.2	4.8 $\pm$ 0.5	4.4 $\pm$ 0.6	4.4 $\pm$ 0.4	0.056
Expected effect(N [%]):					0.164
Full blown	6 (100.0)	18 (85.7)	11 (100.0)	4 (66.7)	
Carrier	0 (0.0)	3 (14.3)	0 (0.0)	2 (33.3)	
Maximal residual enzyme activity:					< 0.001
0%	6 (100)	1 (4.8)	0	0	
< 1%	0	18 (85.7)	0	0	
1%	0	2 (9.5)	0	0	
2–11%	0	0	11 (100)	0	
Unknown	0	0	0	6 (100)	
Treatment					
Hydrocortisone (N [%])	6 (100.0)	19 (90.5)	10 (90.9)	5 (83.3)	0.802
Dexamethasone (N [%])	6 (100.0)	15 (71.4)	7 (63.6)	2 (33.3)	0.101
Prednisone (N [%])	0 (0.0)	7 (33.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	0.031
Fludrocortisone (N [%])	6 (100.0)	17 (81.0)	8 (72.7)	3 (50.0)	0.213

CCAH, classical congenital adrenal hyperplasia; SV, simple virilizing; SW, salt-wasting; 17-OHP, 17-hydroxyprogesterone. Continuous data were compared using the Kruskal-Wallis. Categorical data were compared with the chi-square test

MutationTaster, the identified variant has been predicted to be disease-causing [20].

The clinical severity of the new variant could be deduced from the patient's phenotype since he had a severe alteration (deletion of most of the gene) of the other allele.

## Discussion

This study identifies the spectrum and frequencies of *CYP21A2* variants as well as genotype-phenotype correlations in a group of 48 adult patients with CCAH due to 21-hydroxylase deficiency treated in the Department of Endocrinology at the University Hospital in Krakow, Poland. To the best of our knowledge, our study is the first published report on the spectrum and frequency of *CYP21A2* genetic alterations in the Polish population. As the distribution of *CYP21A2* variants differs between individual populations, the results of the study may be a valuable tool in genetic counseling not only in Polish patients with CCAH but also in populations of the entire European area.

The most common genetic variant in the studied group was I2G, followed by whole or partial gene copy deletion. In a study of 155 CAH patients from southern Germany (92 SW and 52 SV), I2G was also mentioned as the most common genetic variant [13]. A high frequency of this alteration was also observed by authors from Croatia [21], Turkey [22], India [23], Cuba [24], and China [25, 26]. In previous studies from Latin American countries (Argentina [27], Brazil [28]), and Portugal [29]), p.Val282Leu, which is the most frequent variant in NCCAH, was defined as the most common genetic alteration. Because only CCAH patients were enrolled in the present study, the latter variant accounted for only 3.41% of cases. It is believed that these differences in genotype frequencies in different countries may result from the heterogeneity/homogeneity of the studied population and different proportions of particular types of CAH in published series. The most common genetic alterations reported in several previous studies are summed up in Table 3.

In our study group, a good correlation between genotype and phenotype was observed in group *null* (patients with alterations in both alleles resulting in 0% residual enzyme

**Table 3** Most common genetic alterations reported in several previous studies

Country	Study (first author)	Year of publication	Centers included in the study	Total CAH cases (CCA and NCAH)	CCA		Most common genetic alteration	Frequency (%)
					SW	SV		
Germany	Riedl S.	2019	Multicenter	538	386	98	Del/conversions	29.6
Austria								
Germany	Krone N.	2000	Multicenter	155	92	52	I2G	30.3
Croatia	Dumic KK.	2017	Multicenter	93	66	23	I2G	35.5
Turkey	Turan I.	2020	Single center	113	82	24	I2G	38.4
India	Khajuria R.	2017	Single center	55	19	30	I2G	20.0
China	Xu C.	2019	Single center	72	47	11	I2G	33.0
	Wang R.	2016	center	230	142	60	I2G	35.0
			Single center					
Serbia	Milacic I.	2015	Multicenter	61	19	15	I2G	18.5
Cuba	Espinosa Reyes TM.	2020	Single center	31	16	12	I2G	38.7
Argentina	Marino R.	2011	Multicenter	454	162	75	p.Val282Leu	26.2
Brazil	De Carvalho DF.	2016	Single center	480	158	116	p.Val282Leu	26.6
Portugal	Santos-Silva R.	2019	Multicenter	212	61	24	p.Val282Leu	41.3
Cyprus	Neocleous V.	2019	Multicenter	120	11	7	p.Val282Leu	60.0
USA	New MI.	2013	Multicenter	1500	606	187	p.Val282Leu	23.9

activity) and group A (0–1% residual enzyme function). Only in seven patients with SW and in two with SV was there no concordance between genotype and phenotype. Genotype-phenotype correlations measured by PPV were as follows: 100% in group *null*, 90.5% in group A, and 66.7% in group B. Results of previous studies confirm a good correlation between the genotype and the observed CAH phenotype [26, 28, 30–33]. Previous studies reported 100% concordance in *null*, 80–96% in A, and about 50–87% in B genotypes [13, 27, 34, 35]. In a huge cohort study by New et al., based on 1507 families with CAH, a genotype-phenotype non-concordance was observed in 50% of cases [36]. A recent German-Austrian study, which enrolled the largest European cohort of CAH patients from 28 centers (538 CAH cases), has reported a poor correlation in the less severe genotypes B (46%) and C (58%) [37].

In four patients of our study, extensive rearrangements were detected, and numerous pathogenic variants were found. These patients have been excluded from further analysis since it was impossible to determine the allelic distributions of these variants without performing an evaluation of the patients' parents, who were unavailable for genetic testing. In the latter group, one novel variant has been identified.

In our study group, there were more female than male patients. This is in agreement with previous data, according to which a substantial proportion of male patients remain undiagnosed [36]. In our study, adult patients were included in whom the diagnosis of CCAH was made years ago when neonatal screening was not available in Poland. This higher proportion of women is typical for countries where neonatal screening has not been routinely used. We believe that this

trend may be reversed in future given that neonatal screening for CAH was introduced in Poland in 2016 [38].

In all groups *null*, A, B, and D, the patients' BMI was > 25 kg/m<sup>2</sup>. The tendency for obesity in CCAH accords with the data reported in previous studies [39, 40]. Fasting blood glucose concentration was higher in group A, with a trend towards statistical significance. One of the largest studies on cardiometabolic complications also demonstrated higher frequencies of obesity and diabetes (mainly type 2) in CAH patients [41].

One novel variant was found in one allele in the study group, namely, c.[878G>T] (p.Gly293Val). By means of bioinformatics tools, the identified variant has been predicted to be pathogenic.

The patient had a severe alteration (deletion of most of the gene) on another allele. The clinical severity of the new variant could be deduced from the patient's phenotype; the diagnosis of SW in this patient was established in the neonatal period, when he presented symptoms of adrenal crisis and required glucocorticoid and mineralocorticoid therapy.

However, the small study group being a limitation of this study, the observed non-concordance between genotype and phenotype requires further investigation.

Due to the fact that neonatal screening has been widely introduced in most countries, the number of patients diagnosed with CCAH is expected to increase in the future. The results of the present study, and particularly the description of the novel variant, may contribute to a better understanding of the disease. Moreover, the presented data can be useful for the prediction of phenotype based on genotype and may be helpful not only in genetic counseling but also in making

treatment decisions. The practical implication of the data is that special attention must be paid to patients with no or very low 21-hydroxylase activity determined by genotype, in whom in cases of insufficient doses of corticoids or concomitant acute diseases adrenal crisis may occur.

## Conclusions

The majority of cases in our study were characterized by a strong genotype-phenotype correlation. Variant frequencies of affected alleles were similar to those of data previously reported for other countries of the region. The most common genetic variant in the study cohort was I2G, followed by large deletions and I172N. One novel variant, c.[878G>T] (p.Gly293Val), has been identified and characterized by means of bioinformatics tools.

**Funding** This study was supported by funds from the subsidies of the Ministry of Science and Higher Education: No. K/ZDS/004513.

## Declarations

**Ethics approval** The study was approved by the Ethics Committee of the Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland: KBET/225/B/2013.

**Consent to participate** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Merke DP, Auchus RJ (2020) Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *N Engl J Med* 383:1248–1261. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1909786>
- Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, Baskin LS, Conway GS, Merke DP, Meyer-Bahlburg HFL, Miller WL, Murad MH, Oberfield SE, White PC (2018) Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 103:4043–4088. <https://doi.org/10.1210/je.2018-01865>
- El-Maouche D, Arlt W, Merke DP (2017) Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 390(10108):2194–2210. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31431-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31431-9)
- Krone N, Rose IT, Willis DS, Hodson J, Wild SH, Doherty EJ, Hahner S, Parajes S, Stimson RH, Han TS, Carroll PV, Conway GS, Walker BR, MacDonald F, Ross RJ, Arlt W (2013) Genotype-phenotype correlation in 153 adult patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: analysis of the United Kingdom congenital adrenal hyperplasia adult study executive (CaHASE) cohort. *J Clin Endocrinol Metab* 98:346–354. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-3343>
- Trakakis E, Basios G, Trompoukis P, Labos G, Grammatikakis I, Kassanos D (2010) An update to 21-hydroxylase deficient congenital adrenal hyperplasia. *Gynecol Endocrinol* 26:63–71. <https://doi.org/10.3109/09513590903015494>
- Pang S, Murphey W, Levine LS, Spence DA, Leon A, LaFranchi S, Surve AS, New MI (1982) A pilot newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in Alaska. *J Clin Endocrinol Metab* 55:413–420. <https://doi.org/10.1210/jcem-55-3-413>
- Speiser PW, White PC (2003) Congenital adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 349:776–788. <https://doi.org/10.1056/NEJMr021561>
- Speiser PW, Chawla R, Chen M, Diaz-Thomas A, Finlayson C, Rutter MM, Sandberg DE, Shimy K, Talib R, Cerise J, Vilain E, Délot EC (2020) Newborn screening protocols and positive predictive value for congenital adrenal hyperplasia vary across the United States. *Int J Neonatal Screen* 6:37. <https://doi.org/10.3390/ijns6020037>
- White PC, New MI, Dupont B (1986) Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:5111–5115. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.14.5111>
- Parsa AA, New MI (2017) Steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 165:2–11. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.06.015>
- Concolino P, Costella A (2018) Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency: a comprehensive focus on 233 pathogenic variants of CYP21A2 gene. *Mol Diagn Ther* 22:261–280. <https://doi.org/10.1007/s40291-018-0319-y>
- Simonetti L, Bruque C, Fernández C, Benavides-Mori B, Delea M, Kolomenski JE, Espeche LD, Buzzalino ND, Nadra AD, Dain L (2018) CYP21A2 mutation update: comprehensive analysis of databases and published genetic variants. *Hum Mutat* 39:5–22. <https://doi.org/10.1002/humu.23351>
- Krone N, Braun A, Roscher AA, Knorr D, Schwarz HP (2000) Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency. Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *Clin Endocrinol Metab* 52:1059–1065. <https://doi.org/10.1210/jcem.52.3.6441>
- Xu Z, Chen W, Merke DP, McDonnell NB (2013) Comprehensive mutation analysis of the CYP21A2 gene: an efficient multistep approach to the molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *J Mol Diagn* 15:745–753. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.06.001>
- Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, Ritzén EM, Stengler B, Luthman H (1994) Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1145–1152. <https://doi.org/10.1210/jcem.78.5.8175971>
- Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC (1992) Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest* 90:584–595. <https://doi.org/10.1172/JCI115897>



17. Tardy V, Menassa R, Sulmont V, Lienhardt-Roussie A, Lecointre C, Brauner R, David M, Morel Y (2010) Phenotype-genotype correlations of 13 rare CYP21A2 mutations detected in 46 patients affected with 21-hydroxylase deficiency and in one carrier. *J Clin Endocrinol Metab* 95:1288–1300. <https://doi.org/10.1210/jc.2009-1202>
18. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP (2012) Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One* 7(10):e46688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688>
19. Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* 4:1073–1082. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.86>
20. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014) Mutationaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11:361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
21. Dumic KK, Grubic Z, Yuen T, Wilson RC, Kusec V, Barisic I, Stinik K, Sansovic I, Skrabac V, Dumic M, New MI (2017) Molecular genetic analysis in 93 patients and 193 family members with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Croatia. *J Steroid Biochem Mol Biol* 165:51–56. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.03.035>
22. Turan I, Tastan M, Boga DD, Gurbuz F, Kotan LD, Tuli A, Yüksel B (2020) 21-hydroxylase deficiency: mutational spectrum and genotype – phenotype relations analyses by next-generation sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification. *Eur J Med Genet* 63:103782. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2019.103782>
23. Khajuria R, Walia R, Bhansali A, Prasad R (2017) The spectrum of CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia in an Indian cohort. *Clin Chim Acta* 464:189–194. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.11.037>
24. Espinosa Reyes TM, Collazo Mesa T, Lantigua Cruz PA, Agramonte Machado A, Domínguez Alonso E, Falhammar H (2020) Molecular diagnosis of patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *BMC Endocr Disord* 20:1–8. <https://doi.org/10.1186/s12902-020-00643-z>
25. Xu C, Jia W, Cheng X, Ying H, Chen J, Xu J, Guan Q, Zhou X, Zheng D, Li G, Zhao J (2019) Genotype – phenotype correlation study and mutational and hormonal analysis in a Chinese cohort with 21-hydroxylase deficiency. *Mol Genet Genomic Med* 7:e671. <https://doi.org/10.1002/mgg3.671>
26. Wang R, Yu Y, Ye J, Han L, Qiu W, Zhang H, Liang L, Gong Z, Wang L, Gu X (2016) 21-hydroxylase deficiency-induced congenital adrenal hyperplasia in 230 Chinese patients: genotype-phenotype correlation and identification of nine novel mutations. *Steroids* 108:47–55. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2016.01.007>
27. Marino R, Ramirez P, Galeano J, Perez Garrido N, Rocco C, Ciaccio M, Warman DM, Guercio G, Chaler E, Maceiras M, Bergadá I, Gryngarten M, Balbi V, Pardes E, Rivarola MA, Belgorosky A (2011) Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum in 454 Argentinean patients: genotype – phenotype correlation in a large cohort of patients with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol* 75:427–435. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2011.04123.x>
28. de Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, Madureira G, Marccondes JA, Billerbeck AE, Rodrigues AS, Presti PF, Kuperman H, Damiani D, Mendonca BB, Bachega TA (2016) Molecular CYP21A2 diagnosis in 480 Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia before newborn screening introduction. *Eur J Endocrinol* 175:107–116. <https://doi.org/10.1530/EJE-16-0171>
29. Santos-Silva R, Cardoso R, Lopes L, Fonseca M, Espada F, Sampaio L, Brandão C, Antunes A, Bragança G, Coelho R, Bernardo T, Vieira P, Morais R, Leite AL, Ribeiro L, Carvalho B, Grangeira A, Oliveira R, Oliveira MJ et al (2019) CYP21A2 gene pathogenic variants: a multicenter study on genotype – phenotype correlation from a Portuguese pediatric cohort. *Horm Res Paediatr* 91:33–45. <https://doi.org/10.1159/000497485>
30. Narasimhan ML, Khattab A (2019) Genetics of congenital adrenal hyperplasia and genotype-phenotype correlation. *Fertil Steril* 111:24–29. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.11.007>
31. Milacic I, Barac M, Milenkovic T, Ugrin M, Klaassen K, Skakic A, Jasic M, Joksic I, Mitrovic K, Todorovic S, Vujovic S, Pavlovic S, Stojiljkovic M (2015) Molecular genetic study of congenital adrenal hyperplasia in Serbia: novel p.Leu129Pro and p.Ser165Pro CYP21A2 gene mutations. *J Endocrinol Investig* 38:1199–1210. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0366-8>
32. Zhang B, Lu L, Lu Z (2017) Molecular diagnosis of Chinese patients with 21-hydroxylase deficiency and analysis of genotype-phenotype correlations. *J Int Med Res* 45:481–492. <https://doi.org/10.1177/0300060516685204>
33. Neocleous V, Fanis P, Toumba M, Stylianou C, Picolos M, Andreou E, Kyriakou A, Iasonides M, Nicolaou S, Kyriakides TC, Tanteles GA, Skordis N, Phylactou LA (2019) The spectrum of genetic defects in congenital adrenal hyperplasia in the population of Cyprus: a retrospective analysis. *Horm Metab Res* 51:586–594. <https://doi.org/10.1055/a-0957-3297>
34. Dundar A, Bayramov R, Onal MG, Akkus M, Dogan ME, Kenanoglu S, Cerrah Gunes M, Kazimli U, Ozbek MN, Ercan O, Yildirim R, Celmeli G, Parlak M, Dundar I, Hatipoglu N, Unluhizarci K, Akalin H, Ozkul Y, Saatci C, Dundar M (2019) The molecular basis and genotype-phenotype correlations of congenital adrenal hyperplasia (CAH) in Anatolian population. *Mol Biol Rep* 46:3677–3690. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04809-4>
35. Finkelstain GP, Chen W, Mehta SP, Fujimura FK, Hanna RM, Van Ryzin C, McDonnell NB, Merke DP (2011) Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 96:E161–E172. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-0319>
36. New MI, Abraham M, Gonzalez B, Dumic M, Razzaghy-Azar M, Chitayat D, Sun L, Zaidi M, Wilson RC, Yuen T (2013) Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:2611–2516. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300057110> Epub 2013 Jan 28
37. Riedl S, Röhl FW, Bonfig W, Brämwig J, Richter-Unruh A, Fricke-Otto S, Bettendorf M, Riepe F, Kriegshäuser G, Schönau E, Even G, Hauffa B, Dörr HG, Holl RW, Mohnik K, AQUAPE CAH Study Group (2019) Genotype/phenotype correlations in 538 congenital adrenal hyperplasia patients from Germany and Austria: discordances in milder genotypes and in screened versus prescreening patients. *Endocr Connect* 8:86–94. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0281>
38. Ginalska-Malinowska M (2018) Classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency - the next disease included in the neonatal screening program in Poland. *Dev Period Med* 22:197–200
39. Gomes LG, Mendonca BB, Bachega TASS (2020) Long-term cardio-metabolic outcomes in patients with classical congenital adrenal hyperplasia: is the risk real? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 27:155–161. <https://doi.org/10.1097/MED.00000000000000545>
40. Paizoni L, Auer MK, Schmidt H, Hübner A, Bidlingmaier M, Reisch N (2020) Effect of androgen excess and glucocorticoid exposure on metabolic risk profiles in patients with congenital

- adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Steroid Biochem Mol Biol* 197:105540. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105540>
41. Falhammar H, Frisén L, Hirschberg AL, Norrby C, Almqvist C, Nordenskjöld A, Nordenström A (2015) Increased cardiovascular and metabolic morbidity in patients with 21-hydroxylase deficiency: a Swedish Population-Based National Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab* 100:3520–3528. <https://doi.org/10.1210/JC.2015-2093>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



## 5.2

### **Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors – Potential Clinical Relevance**

Kurzyńska A, Pach D, Skalniak AE, Stefańska A, Opalińska M, Przybylik-Mazurek E,  
Hubalewska-Dydejczyk A.




J Clin Med. 2022 Sep 21;11(19):5536. doi: 10.3390/jcm11195536. PMID: 36233401; PMCID:  
PMC9573749

punkty MNiSW: 140

impact factor: 4.964

Article

# Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors—Potential Clinical Relevance

Anna Kurzyńska<sup>1</sup>, Dorota Pach<sup>1</sup>, Anna Elżbieta Skalniak<sup>1</sup> , Agnieszka Stefańska<sup>2</sup>, Marta Opałińska<sup>2,\*</sup> , Elwira Przybylik-Mazurek<sup>1</sup>  and Alicja Hubalewska-Dydejczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Chair and Department of Endocrinology, Jagiellonian University Medical College, 30-688 Kraków, Poland

<sup>2</sup> Department of Endocrinology, Oncological Endocrinology and Nuclear Medicine, University Hospital, 30-688 Kraków, Poland

\* Correspondence: mopalinska@su.krakow.pl; Tel.: +48-12-400-14 66



**Citation:** Kurzyńska, A.; Pach, D.; Skalniak, A.E.; Stefańska, A.; Opałińska, M.; Przybylik-Mazurek, E.; Hubalewska-Dydejczyk, A. Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors—Potential Clinical Relevance. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 5536. <https://doi.org/10.3390/jcm11195536>

Academic Editor: Anna La Salvia

Received: 12 August 2022

Accepted: 19 September 2022

Published: 21 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Introduction: The genetic basis of neuroendocrine tumors (NETs), whose incidence is continuously increasing, is still not fully defined. The majority of NETs are sporadic, and only a small percentage occur as part of hereditary genetic syndromes. However, the associations of multiple genetic variants have been found as clinically relevant in several neoplasms. The aim of this study was to evaluate whether selected, literature-based genetic variants may have a potential role in NET susceptibility and clinical outcome in Polish patients. Materials/methods: A total of 185 patients recruited from one clinical center were enrolled. In the first part of the study, the molecular analysis including four single-nucleotide variants (rs8005354 (*DADI*, NM\_001344 intronic T/C substitution), rs2069762 (T/G substitution in the promoter region of the *IL2* NM\_000586), rs3731198 (*CDKN2A*, NM\_000077 intronic A/G substitution), and rs1800872 (C/A substitution in the promoter region of the *IL10* NM\_000572)) was performed in 107 participants (49 patients with NETs with different primary site NETs and a control group of 58 healthy adult volunteers). In the second stage, the same single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were assessed in 127 patients with NET and analyzed in terms of clinical data (primary site, serum CgA concentration, and metastatic disease). Results: The analysis of homozygotes revealed a statistically significant higher prevalence of TT homozygotes of variant rs3731198 in the control group ( $p = 0.0209$ ). In NET patients, there was a statistically significant higher prevalence of GG homozygotes of variant rs1800872 ( $p = 0.003$ ). There was a statistically significant correlation between the rs3731198 variant and lymph node metastases ( $p = 0.0038$  with Bonferroni correction). Conclusions: Our study indicates that GG homozygotes of variant rs1800872 are more often observed in NET patients, while TT homozygotes of variant rs3731198 are less frequent in this group. The rs3731198 variant may be related to an increased risk of lymph node metastasis. Further, larger multicenter studies are warranted to evaluate the potential genetic factors of sporadic NETs.

**Keywords:** neuroendocrine neoplasms; single-nucleotide polymorphisms; molecular markers

## 1. Introduction

The genetic basis of neuroendocrine tumors (NETs), despite the rapid increase in data in recent years, is still not fully understood. The majority of NETs are sporadic, although there are well-known genetic syndromes coexisting with NETs, such as multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), multiple endocrine neoplasia type 4 (MEN4), von Hippel–Lindau (VHL), neurofibromatosis type 1 (NF1), and tuberous sclerosis complex (TSC), but they constitute merely a small percentage of all NETs. Although a hereditary background should be considered in many types of NETs, especially in pancreatic ones [1,2], only about 10% are associated with inherited genetic syndromes [3].

As the incidence of NETs continues to rise and the age-adjusted incidence rate has increased 6.4 times from 1973 (1.09 per 100,000) to 2012 (6.98 per 100,000) [4], it is crucial to better understand molecular alterations to more precisely assess the risk and predict

the course of disease, which should significantly improve treatment effects and influence overall outcome [5].

To date, the associations of genetic alterations involved in inflammation and apoptosis have been confirmed for many malignancies, e.g., breast or colorectal cancer [6–9]. In the case of NETs, its relatively low incidence has been a certain limitation for population-wide studies on genetic alterations in NETs, but some data from literature show some of them as potentially related to NETs [10–12]. However, in the paper by Bodei et al., SNPs were mentioned as potential candidate factors for PRRT-related toxicity, which suggest that research on SNPs in NETs may have a practical application in the future [13]. For this reason, we analyzed selected genetic variants that may have a potential role in susceptibility for NETs and then we related them to clinical outcomes to find a potentially useful tool for the early diagnosis and optimization of NET treatment.

## 2. Materials and Methods

The study was divided into two parts: an analysis of selected (described below) genetic variants in the study and the control group and an analysis of these polymorphisms in the extended group of patients with NET in order to check whether any of those variants may affect clinical data. The clinical and demographic data of patients and controls were obtained from hospital records. All participants were of Polish origin.

The study involved the analysis of genetic material in terms of linking four germline SNPs, selected on the basis of data from the literature, with NET. The investigated material was DNA isolated from the whole peripheral blood of the participants, collected into EDTA tubes using the NucleoSpin Blood Kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany). All patients were tested for the selected SNPs with the appropriate TaqMan probes and TaqMan Genotyping Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). The reactions were prepared according to the manufacturer's recommendations, read on a Mastercycler Realplex 2 thermocycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) and analyzed using the incorporated data collection and analysis software (Eppendorf, Hamburg, Germany). All genetic tests were carried out in the Genetics Laboratory of the Endocrinology Clinic at the University Hospital in Krakow.

The molecular variants selected on the basis on the data from literature [11–13] included: rs8005354 (*DAD1*, NM\_001344 intronic T/C substitution), rs2069762 (A/C substitution in the promoter region of the *IL2* NM\_000586), rs3731198 (*CDKN2A*, NM\_000077 intronic T/C substitution), and rs1800872 (G/T substitution in the promoter region of the *IL10* NM\_000572). All patients in the control group took part in a detailed interview and physical examination to exclude a history of NET in the participant and their families, as well as other syndromes that may be part of the MEN1 syndrome: hyperparathyroidism, pituitary tumor, adrenal gland tumor; or part of VHL: kidney cancer, pheochromocytoma, or cerebral hemangiomas. Additionally, in this group, abdominal ultrasounds were performed.

In the first part of the study, the associations of the aforementioned variants with neuroendocrine tumors were assessed and compared with those in the control group and, subsequently, with the literature data for the European population. An additional analysis was carried out for homozygotes in order to verify whether the lack of any allele (less frequent or more frequent) is favorable or unfavorable in relation to the disease. The analysis of homozygotes is synonymous with the analysis of the carriers of the other allele, regardless of their zygosity. In the next stage, molecular variants were analyzed according to the primary site, distant metastasis, and OS.

In the second part of the study, the group of patients with NET was extended. The inclusion and exclusion criteria were the same as for the first case–control part of the study. In this extended study group, the same four SNPs were assessed, and all molecular determinations were performed analogously to the procedure described above.

Next, the associations between genetic variants and clinical data (primary site, serum CgA concentration, and metastases) were analyzed.

### 2.1. Ethical Issues

This study was carried out in compliance with the 1964 Helsinki Declaration and its later amendments. All participants signed an informed consent upon enrolment (an additional informed consent was obtained for molecular analysis). The study was approved by the Ethics Committee of the Jagiellonian University Medical College: approval no. 1072.6120.250.2018.

### 2.2. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by use of Statistica v13 (TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA). Continuous data with normal distribution were presented as a mean value and standard deviation (SD). Categorical data were presented as percentages. Appropriate parametric or non-parametric tests were used for comparisons. OS, defined as the time from diagnosis to death due to NET or the last known date alive, was evaluated using the log-rank test. A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant, with Bonferroni corrections applied where appropriate.

## 3. Results

### 3.1. Study Population

A total number of 185 subjects recruited from our clinical center were enrolled in this study.

### 3.2. Case–Control Part of the Study

A total of 107 patients were enrolled in the case–control part of the study. The study group comprised 49 adult Caucasian patients with NET of different primary sites. The patients were selected randomly from a cohort of about 600 NET patients (without other concomitant malignancies, positive family history of GEP NETs, and diagnosed MEN or VHL syndrome) treated or followed up in our center.

The control group consisted of 58 unrelated adult patients (patients of our center, their families and friends, as well as staff and students) with no history of NET in the themselves and their families, as well as other syndromes that may be part of the MEN1 syndrome: hyperparathyroidism, pituitary tumor, adrenal gland tumor; or in the composition of VHL: kidney cancer, pheochromocytoma, or cerebral hemangiomas.

In the NET group, there were 46 patients diagnosed with GEP NET and 3 patients with NET of unknown primary site. The diagnosis of NET was established on the basis of the histopathological report according to the WHO classification (2010, 2017, or 2019) depending on the time of diagnosis. Histopathological findings were confirmed locally by pathologists with NET expertise.

In 49 patients, the primary site, degree of histopathological differentiation, presence of distant metastases, serum chromogranin A (CgA) concentration, and overall survival (OS) were established. The distribution of NETs according to the primary site is presented in Table 1.

**Table 1.** Distribution of primary tumor locations in the group of 49 patients analyzed in the case–control part of the study.

Site	Number (All = 49)	Percent (%)
Small intestine	14	28.6
Pancreas	12	24.5
Large intestine	12	24.5
Stomach	8	16.3
Unknown	3	6.1

The study group of NET patients involved 28 women (57%) aged  $62.89 \pm 9.77$  years, and 21 men (43%) aged  $62.10 \pm 13.31$  years. Distant metastases were observed in 67.34% of the patients, liver metastases were diagnosed in 57.14%, lymph node metastases in 44.9%, bone metastases in 28.5%, and peritoneum metastases in 4.1%. The median serum CgA



concentration was 7.79 nmol/L (IQR = 21.6). The median overall survival (OS) at study time was 10 years (IQR = 6.0 years).

In 27 patients, the degree of histopathological differentiation was known. There were 15 (55.6%) patients with G1 tumors, 10 (37.0%) with G2, 1 case (3.7%) of G3 NET, and 1 case of NEC, which was excluded from further analyses.

The control group consisted of 58 unrelated adult patients—41 women aged 47.00 ± 13.77 years and 17 men aged 42.54 ± 16.53 years.

Of the four variants analyzed, the minor allele of the rs3731198 variant showed a trend toward a higher prevalence in the population of patients with NET, which was, however, not statistically significant,  $p = 0.0587$ . The minor allele of the rs1800872 variant showed a trend toward a lower incidence in NET patients compared to that in the control group,  $p = 0.0869$ . On the basis of the obtained results, for each variant, the minimal number of patients that would be required to obtain a statistically significant result of satisfactory power (minimum 80%) was calculated (Table 2).

**Table 2.** Frequency of alleles in the study group, the control group, and the European population according to the Genome Aggregation Database (gnomAD) v2.1.1 for the European (non-Finnish) population.

Variant	MAF Study Group [%]	MAF Control Group [%]	MAF European Population [%]	<i>p</i> Value	Minimal No. of Patients Required to Obtain a Statistically Significant Result of a Minimum 80% Power
rs8005354 (T > C)	42.86	33.67	37.60	0.1618	220
rs2069762 (A > C)	29.17	22.45	30.08	0.2615	333
rs3731198 (T > C)	15.08	7.00	13.17	0.0587	118
rs1800872 (G > T)	18.33	28.26	23.54	0.0869	142

MAF: minor allele frequency.

The analysis of homozygotes revealed a statistically significant higher prevalence of TT homozygotes of the rs3731198 variant in the control group with  $p = 0.0209$  and a power of 64.52%. The group of NET patients had a statistically significant higher prevalence of GG homozygotes of the rs1800872 variant with  $p = 0.0300$  and a power of 58.43%. Both correlations were, however, non-significant after the implementation of the Bonferroni correction. The analysis of homozygotes is summarized in Table 3.

**Table 3.** Analysis of homozygotes.

Variant	Homozygotes of Less Frequent Allele				<i>p</i> Value	Homozygotes of More Frequent Allele				<i>p</i> Value
	Study Group		Control Group			Study Group		Control Group		
	Genotype	Frequency (%)	Genotype	Frequency (%)		Genotype	Frequency (%)	Genotype	Frequency (%)	
rs8005354 (T/C)	CC	12.7	CC	8.16	0.4414	TT	26.98	TT	40.82	0.4414
rs2069762 (A/C)	CC	5.00	CC	6.12	0.2615	AA	46.67	AA	61.22	0.1297
rs3731198 (T/C)	CC	0.00	CC	2.00	0.2595	TT	69.84	TT	88.00	0.0209
rs1800872 (G/T)	TT	3.33	TT	2.17	0.7213	GG	66.67	GG	45.65	0.0300

There was no statistically significant correlation of the studied variants with the primary focus or distant metastases.

3.3. Analysis of the Extended NET Patient Group

This part of the study involved 127 patients with the diagnosis of NET with a different primary site, established on the basis of the histopathological report according to the WHO classification (2010, 2017, or 2019) depending on the time of diagnosis. Histopathological results were also confirmed locally by pathologists with an experience in the field of NETs. The primary site, degree of histopathological differentiation, presence of distant metastases, serum CgA concentration, and OS were established. The distribution of NETs according to the primary site is presented in Table 4.

**Table 4.** Distribution of primary tumor locations in the group of 127 patients analyzed in the main part of the study.

Site	Number (All = 127)	Percent (%)
Small intestine	44	34.6
Pancreas	37	29.1
Unknown	20	15.8
Large intestine	15	11.8
Stomach	11	8.7

The group included 68 women (54%) and 59 men (46%). The mean age was  $64.0 \pm 11.4$  years (in the group of women, the mean age was  $65.1 \pm 10.2$  years; in the group of men, it was  $62.6 \pm 12.7$  years). Distant metastases were present in 84.5% of the patients, liver metastases were confirmed in 73.4%, lymph node metastases in 55.9%, and bone metastases in 18.1%.

The median CgA serum concentration was 8.5 nmol/L (IQR = 26.6). There were no differences between the group of women and men:  $p = 0.6098$ . In total, 90 patients (70.9%), 53 women and 37 men, were alive at the time of the study; 36 patients (28.3%), 14 women and 22 men, were deceased, and deaths were more frequent among men ( $p = 0.0472$ ). The median OS at study time was 7 years (IQR = 5), 6.5 years (IQR = 5.75) in men and 7 years (IQR = 5) in women.

In 92 subjects, data on the degree of histopathological differentiation were available. There were 39 (42.4%) patients with G1 tumors, 50 (54.3%) with G2, and 3 (3.3%) cases of G3 NET.

Small-intestine NETs were more common in men:  $p = 0.0246$  (Fisher’s exact two-sided test), while gastric NETs were more frequent in women:  $p = 0.0097$ . Gastric NETs did not result in liver metastases:  $p = 0.0001$  or lymph node metastases:  $p = 0.0106$ , while NETs of unknown primary site metastasized to the liver:  $p = 0.0402$  and small-intestine NETs gave rise to nodal metastases:  $p = 0.0024$  (Fisher’s exact two-sided test).

The genetic variants assessed in NET patients are summarized in Table 5.

**Table 5.** Genetic variants assessed in NET patients.

Variant	No. of Genotyped Patients	Homozygote: Reference Allele	Heterozygote	Homozygote: Alternative Allele	No. of Patients with Alternative Allele
rs8005354	122 (96.1%)	T/T	T/C	C/C	81 (63.8%)
		41 (32.3%)	69 (54.3%)	12 (9.4%)	
rs2069762	122 (96.1%)	A/A	A/C	C/C	69 (54.3%)
		53 (41.7%)	60 (47.2%)	9 (7.1%)	
rs3731198	126 (99.2%)	T/T	T/C	C/C	33 (26.0%)
		93 (73.2%)	32 (25.2%)	1 (0.8%)	
rs1800872	121 (95.3%)	G/G	G/T	T/T	68 (53.5%)
		53 (41.7%)	61 (48.0%)	7 (5.5%)	

### 3.4. Association of Clinical Data on Genetic Variants in the Extended NET Patient Group

The variants did not differ between the sexes.

Correlation of variants with CgA: after applying the correction for multiple comparisons, none of the results were within the range of statistical significance.

There was no statistical significance between the primary focus and the number of rarer alleles.

Correlation between distant metastases and the number of rarer alleles (Table 6): there was an association between variant rs3731198 and lymph node metastasis ( $p = 0.0038$  with Bonferroni correction, with a power of 59.97%).

**Table 6.** Correlation between the distant metastasis and the number of rarer alleles.

Variant; More Frequent > Rarer Allele	Liver Metastases <i>p</i> Value	Lymph Node Metastases <i>p</i> Value	Bone Metastases <i>p</i> Value
rs8005354; T > C	0.7990	0.8918	0.9104
rs2069762; A > C	0.7310	0.1940	0.8124
rs3731198; T > C	0.1008	0.0038	0.8028
rs1800872; G > T	0.3022	0.7918	0.9484

The tested variants showed no differences in the survival test (log-rank) (Supplementary Materials Table S1) or in the stage of disease assessed as localized/regional/advanced (Supplementary Materials Table S2).

## 4. Discussion

The results of the study showed that, among the analyzed variants, the rs3731198 (*CDKN2A*) variant showed a trend toward a higher prevalence in NET patients, whereas rs1800872 (*IL10* promoter) showed a trend toward a lower prevalence. None of the other variants examined, rs8005354 (*DAD1*) and rs2069762 (*IL2* promoter), were associated with NET risk. The analysis of homozygotes involved a statistically significant higher prevalence of TT homozygotes of the rs3731198 variant in the control group. There was a statistically significant correlation between the rs3731198 variant and lymph node metastases, which can be valuable in predicting the clinical course in patients with NET. In NET patients, there was a higher prevalence of GG homozygotes of the rs1800872 variant.

Despite advances in NET knowledge, the genetic factors responsible for the development of sporadic NETs are still under investigation. Moreover, further research is needed to accurately define the genomic landscape of sporadic NETs in order to estimate possible targetable molecular alterations and to identify predictive and prognostic markers. For that reason, we aimed to investigate whether common genetic variants of the genes involved in the inflammatory response, cell cycle control, and DNA repair mechanism may contribute to the risk of sporadic NETs. Analyzed variants were selected based on literature data indicating their potential association with NET development: rs3731198 [10,12], rs8005354 [10], and rs2069762 [11] or linking chosen variants to cancer susceptibility in general: rs2069762 [14] and rs180072 [15]. Our study did not confirm any associations of the studied SNPs with the incidence of NET; however, in the rs3731198 variant, there was a trend toward a higher prevalence in patients with NET and increasing the sample size to 118 patients would probably lead to such a result. However, due to the younger age of the control group and the corresponding lower risk of disease, this result should be treated with caution. The analysis of homozygotes revealed a lower incidence of TT homozygotes of that variant in NET patients. The variant rs3731198 is located in the *CDKN2A/CDKN2B* gene region, which is an important tumor suppressor gene involved in cell cycle regulation. Previously published papers demonstrated that this variant is associated with the risk of pancreatic NETs—first independently [11] and then in co-analysis with other variants with linkage imbalance [13]. In our study, there was association between rs3731198 and lymph



node metastasis, which remains in concordance with other studies. The study of Roy et al. indicated that alterations in *CDKN2A* may contribute to the metastasis of pancreatic NETs [16].

The rs1800872 variant in the anti-inflammatory gene *IL10* decreases gene transcription. The association of this variant with neoplasms has been the subject of several studies. In a Chinese study, *IL10* rs1800872 was associated with an increased risk of esophageal cancer [17]. A meta-analysis published in 2021 confirmed the association between the rs1800872 variant and the risk of cervical cancer [18]. Several other meta-analyses have shown the association between this variant and the risk of breast cancer [19,20]. Our study found a trend toward a lower occurrence in NET patients compared to that in the control group. In the study group, there was a higher prevalence of GG homozygotes of that variant.

The rs8005354 is an intronic variant of the *DAD1* gene. *DAD1* has been identified as a regulator of apoptosis [21]. In animal model studies, deletion of *DAD1* in the hamster TSN7 cell line was shown to induce apoptosis [22], and the absence of *DAD1* was associated with increased apoptosis in mice [23]. This marker has been studied in various diseases to search for connections with this gene. It has not been linked to any disease in clinical databases, but it has been correlated in the literature with sporadic NETs [11]. Kulke et al. reported that *DAD1* may play a potential role in the tumorigenesis of small-intestinal NETs [24]. Our study did not confirm any associations of this variant with the incidence of NET.

*IL2* is a pro- and anti-inflammatory cytokine involved in the cellular immune response [25]. Previous studies on rs2069762, which is located in the promoter region of the *IL2* gene, have not been conclusive. Data have shown that this variant is involved in increased susceptibility to nasopharyngeal [26] and oral cancer [27], and literature data have shown that this variant was associated with gastric cancer [28] and breast cancer [6]. A study from 2021 confirmed that the *IL2* gene variants rs2069762 and rs2069763 could be involved in the development of non-Hodgkin lymphoma (NHL) [29]. On the other hand, a meta-analysis from 2015 indicated that the variant *IL2* rs2069762 was not associated with cancer risk [30]. The paper by Berković et al. showed that the *IL-2* -330 T/G variant (rs2069752) may have a potential role in susceptibility to GEP NETs [12]. Our study did not show any associations of this variant with NET incidence.

The largest genome-wide association study in a group of NET patients that has been performed until now comprised more than 800 cases and more than 4500 controls. The authors identified no potential risk associations in the cohort overall, but in the small-intestine NET subgroup, they identified risk associations with three SNPs on chromosome 12 [31]. There are public databases that link genetic and clinical data, such as NCBI ClinVar, but they mainly only consider the association of genetic variants with the risk of the disease or response to treatment but not the course of the disease. For that reason, at this moment, to our best knowledge, none of them gives a possibility to verify our results.

The main limitation of our study is the small sample size. It should be noted that, due to the limited number of study participants, the power of our analysis was only about 60%. In addition, the varied number of patients, for whom good-quality genotyping results were obtained, might have also influenced the *p* value. Therefore, it would be valuable in the future to analyze those variants in additional patient groups and to include these results in meta-analyses. Due to the rarity of NETs, other larger multicenter studies are warranted to evaluate the potential genetic factors of sporadic NETs.

## 5. Conclusions

Among the tested SNPs, the rs3731198 variant showed the highest prevalence in NET patients.

Presence of the rs3731198 variant was associated with the highest risk of lymph node metastases. GG homozygosity of the rs1800872 variant was associated with a higher incidence of NET, while TT homozygosity was rarest in this group. The rarity of patients with NETs did not allow us to achieve a sufficient power value; however, our results might serve as an indication for future studies on this topic.



**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm11195536/s1>, Table S1: Statistics of survival analyses in the group of NET patients; Table S2: Comparison of the risk of locoregional or distant metastasis presence depending on the presence of the rarer allele (to confirm statistical significance expected  $p$  value after the implementation of the Bonferroni correction  $<0.0125$ ).

**Author Contributions:** Conceptualization, D.P., A.K. and M.O.; methodology, A.K., A.S. and M.O.; software, A.E.S.; validation, A.K., D.P., A.E.S., E.P.-M. and A.H.-D.; formal analysis, A.K., D.P. and A.E.S. and M.O.; investigation, A.K., D.P., E.P.-M., A.S., A.E.S., M.O. and A.H.-D.; resources, A.K. and A.S.; writing—original draft preparation, A.K. and M.O.; writing—review and editing, M.O., A.E.S. and A.H.-D., project administration, D.P., M.O. and A.H.-D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study was supported by the funds from the subsidies of the Ministry of Science and Higher Education No.: N41/DBS/000085.

**Institutional Review Board Statement:** Research was conducted ethically in accordance with the World Medical Institutional Review Board Statement: Association Declaration of Helsinki. The study protocol was approved by the Local Ethics Committee of the Jagiellonian University in Krakow (approval no. 1072.6120.250.2018).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Mafficini, A.; Scarpa, A. Genetics and Epigenetics of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr. Rev.* **2019**, *40*, 506–536. [CrossRef] [PubMed]
- Scarpa, A.; Chang, D.K.; Nones, K.; Corbo, V.; Patch, A.-M.; Bailey, P.; Lawlor, R.T.; Johns, A.L.; Miller, D.K.; Mafficini, A.; et al. Whole-genome landscape of pancreatic neuroendocrine tumours. *Nature* **2017**, *543*, 65–71. [CrossRef] [PubMed]
- Guilmette, J.M.; Nosé, V. Neoplasms of the Neuroendocrine Pancreas: An Update in the Classification, Definition, and Molecular Genetic Advances. *Adv. Anat. Pathol.* **2019**, *26*, 13–30. [CrossRef] [PubMed]
- Dasari, A.; Shen, C.; Halperin, D.M.; Zhao, B.; Zhou, S.; Xu, Y.; Shih, T.; Yao, J.C. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 1335–1342. [CrossRef]
- Pavel, M.; Öberg, K.; Falconi, M.; Krenning, E.P.; Sundin, A.; Perren, A.; Berruti, A. Gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 844–860. [CrossRef] [PubMed]
- Hu, X.-B.; Ouyang, L.-Z.; Tang, L.-L. Interleukin-2 Gene Polymorphisms and Prognosis of Breast Cancer. *Genet. Test. Mol. Biomarkers* **2013**, *17*, 453–457. [CrossRef]
- Núñez-Marrero, A.; Arroyo, N.; Godoy-Munoz, L.; Rahman, M.Z.; Matta, J.L.; Dutil, J. SNPs in the Interleukin-12 Signaling Pathway Are Associated with Breast Cancer Risk in Puerto Rican Women. 2020. Available online: [www.oncotarget.com](http://www.oncotarget.com) (accessed on 15 September 2020).
- Dimberg, J.; Shamoun, L.; Landerholm, K.; Andersson, R.E.; Kolodziej, B.; Wågsäter, D. Genetic Variants of the *IL2* Gene Related to Risk and Survival in Patients with Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* **2019**, *39*, 4933–4940. [CrossRef]
- Eaton, K.D.; Romine, P.E.; Goodman, G.E.; Thornquist, M.D.; Barnett, M.J.; Petersdorf, E.W. Inflammatory Gene Polymorphisms in Lung Cancer Susceptibility. *J. Thorac. Oncol.* **2018**, *13*, 649–659. [CrossRef]
- Ter-Minassian, M.; Wang, Z.; Asomaning, K.; Wu, M.C.; Liu, C.-Y.; Paulus, J.K.; Liu, G.; Bradbury, P.A.; Zhai, R.; Su, L.; et al. Genetic associations with sporadic neuroendocrine tumor risk. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 1216–1222. [CrossRef]
- Berković, M.C.; Jokić, M.; Marout, J.; Radošević, S.; Zjačić-Rotkvić, V.; Kapitanović, S. IL-2 –330 T/G SNP and serum values—potential new tumor markers in neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas (GEP-NETs). *Klin. Wochenschr.* **2010**, *88*, 423–429. [CrossRef]
- Campa, D.; Capurso, G.; Pastore, M.; Talar-Wojnarowska, R.; Milanetto, A.C.; Landoni, L.; Maiello, E.; Lawlor, R.T.; Malecka-Panas, E.; Funel, N.; et al. Common germline variants within the CDKN2A/2B region affect risk of pancreatic neuroendocrine tumors. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 39565. [CrossRef] [PubMed]
- Bodei, L.; Schöder, H.; Baum, R.P.; Herrmann, K.; Strosberg, J.; Caplin, M.; Öberg, K.; Modlin, I.M. Molecular profiling of neuroendocrine tumours to predict response and toxicity to peptide receptor radionuclide therapy. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, e431–e443. [CrossRef]

14. Zhang, M.; Tan, X.; Huang, J.; Xie, L.; Wang, H.; Shi, J.; Lu, W.; Lv, Z.; Liang, C.; Mei, H. Association between two interleukin-2 gene polymorphisms and cancer susceptibility: A meta-analysis. *OncoTargets Ther.* **2016**, *9*, 2181–2192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Ding, Q.; Shi, Y.; Fan, B.; Fan, Z.; Ding, L.; Li, F.; Tu, W.; Jin, X.; Wang, J. The Interleukin-10 Promoter Polymorphism rs1800872 (-592C>A), Contributes to Cancer Susceptibility: Meta-Analysis of 16 785 Cases and 19 713 Controls. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57246. [[CrossRef](#)]
16. Roy, S.; LaFramboise, W.A.; Liu, T.C.; Cao, D.; Luvison, A.; Miller, C.; Lyons, M.A.; O'Sullivan, R.J.; Zureikat, A.H.; Hogg, M.E.; et al. Loss of Chromatin-Remodeling Proteins and/or CDKN2A Associates with Metastasis of Pancreatic Neuroendocrine Tumors and Reduced Patient Survival Times. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 2060–2063. [[CrossRef](#)]
17. Sun, J.-M.; Li, Q.; Gu, H.-Y.; Chen, Y.-J.; Wei, J.-S.; Zhu, Q.; Chen, L. Interleukin 10 rs1800872 T>G Polymorphism was Associated with an Increased Risk of Esophageal Cancer in a Chinese Population. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 3443–3447. [[CrossRef](#)]
18. Wang, K.; Jiao, Z.; Chen, H.; Liu, X.; Lu, J.; Liu, X.; Li, J.; Wang, L. The association between rs1800872 polymorphism in interleukin-10 and risk of cervical cancer. *Medicine* **2021**, *100*, e23892. [[CrossRef](#)]
19. Li, L.; Xiong, W.; Li, D.; Cao, J. Association of Interleukin-10 Polymorphism (rs1800896, rs1800871, and rs1800872) With Breast Cancer Risk: An Updated Meta-Analysis Based on Different Ethnic Groups. *Front. Genet.* **2022**, *13*, 829283. [[CrossRef](#)]
20. Moghimi, M.; Ahrar, H.; Karimi-Zarchi, M.; Aghili, K.; Salari, M.; Zare-Shehneh, M.; Neamatzadeh, H. Association of IL-10 rs1800871 and rs1800872 Polymorphisms with Breast Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2018**, *19*, 3353–3359. [[CrossRef](#)]
21. Luo, Y.; Wu, Y.; Huang, H.; Yi, N.; Chen, Y. Emerging role of BAD and DAD1 as potential targets and biomarkers in cancer (Review). *Oncol. Lett.* **2021**, *22*, 1–13. [[CrossRef](#)]
22. Nakashima, T.; Sekiguchi, T.; Kuraoka, A.; Fukushima, K.; Shibata, Y.; Komiyama, S.; Nishimoto, T. Molecular cloning of a human cDNA encoding a novel protein, DAD1, whose defect causes apoptotic cell death in hamster BHK21 cells. *Mol. Cell. Biol.* **1993**, *13*, 6367–6374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Hong, N.; Flannery, M.; Hsieh, S.; Cado, D.; Pedersen, R.; Winoto, A. Mice Lacking Dad1, the Defender against Apoptotic Death-1, Express Abnormal N-Linked Glycoproteins and Undergo Increased Embryonic Apoptosis. *Dev. Biol.* **2000**, *220*, 76–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kulke, M.H.; Freed, E.; Chiang, D.Y.; Philips, J.; Zahrieh, D.; Glickman, J.N.; Shivdasani, R.A. High-resolution analysis of genetic alterations in small bowel carcinoid tumors reveals areas of recurrent amplification and loss. *Genes Chromosom. Cancer* **2008**, *47*, 591–603. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Capobianco, M.P.; Cassiano, G.C.; da Furini, A.A.C.; De Melo, L.M.S.; Domingos, C.R.B.; Machado, R.L.D. Human Interleukin 2 (IL-2) Promotion of Immune Regulation and Clinical Outcomes: A Review. *J. Cytokine Biol.* **2016**, *1*, 1–4. [[CrossRef](#)]
26. Wei, Y.-S.; Lan, Y.; Zhang, L.; Wang, J.-C. Association of the Interleukin-2 Polymorphisms with Interleukin-2 Serum Levels and Risk of Nasopharyngeal Carcinoma. *DNA Cell Biol.* **2010**, *29*, 363–368. [[CrossRef](#)]
27. Chandra, G.; Singh, P.K.; Kumar, V.; Ahmad, M.K.; Gupta, R.; Mahdi, A.A.; Jain, A.; Bogra, J. Association of -330 interleukin-2 gene polymorphism with oral cancer. *Indian J. Med. Res.* **2017**, *146*, 730–737. [[CrossRef](#)]
28. Wu, J.; Lu, Y.; Ding, Y.-B.; Ke, Q.; Hu, Z.-B.; Yan, Z.-G.; Xue, Y.; Zhou, Y.; Hua, Z.-L.; Shu, Y.-Q.; et al. Promoter polymorphisms of IL2, IL4, and risk of gastric cancer in a high-risk Chinese population. *Mol. Carcinog.* **2008**, *48*, 626–632. [[CrossRef](#)]
29. Mousa, S.M.; Makhlof, M.M.; Mohammed, E.T.; Zawam, H.M. The Influence of Interleukin-2 Gene Polymorphisms on the Risk and Clinical Outcome of Non-Hodgkin Lymphoma. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **2021**, *37*, 549–554. [[CrossRef](#)]
30. Wang, Y.; Shu, Y.; Jiang, H.; Sun, B.; Ma, Z.; Tang, W. Lack of association between interleukin-2 (IL-2) gene rs2069762 polymorphism and cancer risk: A meta-analysis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **2015**, *8*, 12557–12565.
31. Du, Y.; Ter-Minassian, M.; Brais, L.; Brooks, N.; Waldron, A.; Chan, J.A.; Lin, X.; Kraft, P.; Christiani, D.C.; Kulke, M.H. Genetic associations with neuroendocrine tumor risk: Results from a genome-wide association study. *Endocr.-Relat. Cancer* **2016**, *23*, 587–594. [[CrossRef](#)]

**Table S1.** Statistics of survival analyses in the group of NET patients.

<b>rs8005354</b>					
	Mean age of patients at time of admission [years ± std.dev]	P value	Median survival time [years]	HR (95% CI)	Log-rank p value
Without minor allele	63.7 ± 11.8	0.9926	12	1.24 (0.60-2.56)	0.5822
Minor allele carriers	63.7 ± 11.4		13		
<b>rs2069762</b>					
	Mean age of patients at time of admission [years ± std.dev]	P value	Median survival time [years]	HR (95% CI)	Log-rank p value
Without minor allele	64.9 ± 10.6	0.3329	12	0.93 (0.48-1.83)	0.8381
Minor allele carriers	62.9 ± 11.9		12		
<b>rs3731198</b>					
	Mean age of patients at time of admission [years ± std.dev]	P value	Median survival time [years]	HR (95% CI)	Log-rank p value
Without minor allele	63.6 ± 11.0	0.4330	13	0.86 (0.43-1.74)	0.6550
Minor allele carriers	65.5 ± 12.4		12		
<b>rs1800872</b>					
	Mean age of patients at time of admission [years ± std.dev]	P value	Median survival time [years]	HR (95% CI)	Log-rank p value
Without minor allele	63.0 ± 11.0	0.6052	12	1.41 (0.69-2.86)	0.3310
Minor allele carriers	64.1 ± 11.9		13		

**Table S2.** Comparison of the risk of locoregional or distant metastasis presence depending on the presence of the rarer allele (to confirm statistical significance expected p value after the implementation of the Bonferroni correction <0.0125).

variant	p value
rs8005354; T>C	p=0.80637
rs2069762; A>C	p=0.04369
rs3731198; T>C	p=0.07644
rs1800872; G>T	P=0.54011

### 5.3

## **A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in *SDHD***

Kurzyńska A, Przybylik-Mazurek E, Skalniak A, Buziak-Bereza M, Brzozowska-Czarnek A,  
Tomaszewska R, Hubalewska-Dydejczyk A.

Endokrynol Pol. 2021;72(4):403. doi: 10.5603/EP.a2021.0050. Epub 2021 May 19. PMID:  
34010450

punkty MNiSW: 70

impact factor: 1.569



## A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in SDHD

Anna Kurzyńska<sup>1</sup>, Elwira Przybylik-Mazurek<sup>1</sup>, Anna Skalniak<sup>1</sup>, Monika Buziak-Bereza<sup>1</sup>, Agata Brzozowska-Czarnek<sup>2</sup>, Romana Tomaszewska<sup>3</sup>, Alicja Hubalewska-Dydejczyk<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinical Department of Endocrinology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>2</sup>Department of Radiology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

<sup>3</sup>Department of Clinical and Experimental Pathology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, Poland

**Keywords:** paraganglioma; SDHD; variants; alleles

Paragangliomas are rare neuroendocrine neoplasms that arise from the chromaffin tissue. Tumours originating from the sympathetic nervous system are located within the adrenal medulla (pheochromocytomas) or sympathetic ganglia in the neck, chest, abdomen, and pelvis, and they usually produce catecholamines, while tumours arising from the parasympathetic nervous system are commonly found in the head, neck, and mediastinum and are usually non-secreting. Almost 40% of paragangliomas have a genetic background [1]. They can be associated with autosomal dominant inheritance mutations in one of the genes encoding succinate dehydrogenase (SDHB, SDHD, SDHC, SDHA, SDHAF2) or can coexist in genetically determined endocrine syndromes such as MEN type 2A and 2B, NF1, or VHL. Additional genes predisposing to hereditary pheochromocytoma are still being discovered that should be investigated when searching for the genetic cause of pheochromocytoma in affected families. Each of the mutated genes is associated with the specific characteristics of clinical features of the pheochromocytoma they are responsible for. Therefore, usually, the clinical picture may be an indicator of the gene that should be searched for pathogenic variants in a given patient and their family.

Herein, we present a rare case of a patient with an aggressive, metastatic, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in SDHD and an atypical clinical outcome.

A 69-year-old woman with a history of arterial hypertension and hypothyroidism (after treatment with I-131 due to hyperthyroidism) was admitted to the Department of Endocrinology in 2015 because of bone metastasis of neuroendocrine cancer from an unknown primary lesion. The patient had undergone removal of

the paraganglioma of the right carotid artery in 2008, and she had had surgical treatment of an L3 vertebra fracture in 2015. During the hospitalisation, biochemical data showed a significantly increased concentration of chromogranin A 93.6 ng/mL (0–6) and increased excretion of 3-methoxytyramine 15821.6 ug/24 h (N: 0–220) in 24-hour urine collection.

The material collected from the L3 vertebral metastasis was re-examined (a diagnosis of metastatic neuroendocrine cancer was included in the primary histopathological report), and the diagnosis of metastatic paraganglioma was established. The tumour cells expressed synaptophysin and had a Ki-67 index at 9%, and no expression of somatostatin receptors was found in the neoplastic cells. An active metabolic recurrence of paraganglioma in the area of bifurcation of the common carotid artery (Fig. 1)/mandibular angle on the right side, with massive dissemination to the skeletal system (Fig. 2) and the involvement of the chest lymph nodes, were visualised in <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography (<sup>18</sup>F-FDG PET-CT) (07.12.2015).

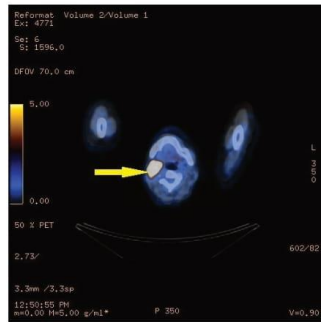
In Iodine-131-meta-iodobenzylguanidine (<sup>131</sup>I]-MIBG) scintigraphy (23.12.2015), tracer uptake in the lower jaw area on the left side, on the neck in the thyroid gland topography to the right of the midline of the body, and xiphoid process of the sternum in the thoracic spine and the plate of the right iliac bone were found (Fig. 3).

The molecular analysis revealed an uncommon variant, c.34G>A (p.Gly12Ser), in the SDHD gene. At that time point, this variant was of unknown clinical significance. The detected variant occurred as a homozygote in Sanger sequencing analysis. Therefore, the genetic investigation was complemented by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), result-



Dr hab n. med. Elwira Przybylik-Mazurek, Clinical Department of Endocrinology, Jagiellonian University Medical College, Krakow, ul. Mikołaja Kopernika 17, 31-501 Kraków, tel: + 48 12 424 75 00; e-mail: elwira.przybylik-mazurek@uj.edu.pl





**Figure 1.** PET/CT imaging with 18F FDG shows local recurrence of paraganglioma. The arrow shows an active metabolic area of paraganglioma in the area of bifurcation of the common carotid artery/mandibular angle on the right side. (Department of Endocrinology Medical College Jagiellonian University Krakow, Poland)

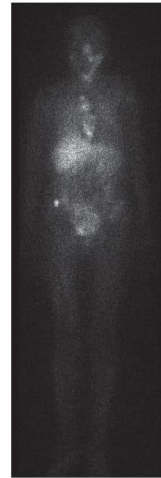


**Figure 2.** PET/CT imaging with 18F FDG. The arrows show an active metabolic area of paraganglioma in the area of vertebral column and sacroiliac bone. (Department of Endocrinology Medical College Jagiellonian University Krakow, Poland)

ing in the detection of a pathogenic alteration — an extensive gene deletion (encompassing exons 1–3) on one allele. Currently, the c.34G>A (p.Gly12Ser) variant is classified as benign or probably benign in the NCBI ClinVar database.

The patient was referred for therapy with iodine-labelled MIBG but unfortunately died due to dissemination.

Genetic testing was performed in the patient's family members. Her son inherited the extensive deletion, but because SDHD mutations are paternally inherited [2, 3], it should not be evident clinically. The molecular analysis was also conducted in his 2 children: genetic alterations were excluded in the case of his son but confirmed in the case of his daughter — the same extensive gene deletion (encompassing exons 1–3) with a high probability (approximately 80%) of caus-



**Figure 3.** SPECT/CT imaging with 131I-MIBG. Accumulation of a tracer in the lower jaw area on the left side, on the neck in the thyroid gland topography to the right of the midline of the body, and xiphoid process of the sternum in the thoracic spine and the plate of the right. (Department of Endocrinology Medical College Jagiellonian University Krakow, Poland)

ing symptoms of the paraganglioma syndrome. The daughter — a 20-year-old woman — was diagnosed with a lesion in a sternum indentation a few weeks ago and is now undergoing a diagnostic process.

Genetic alterations in the SDHD gene account for approximately 9% of all pheochromocytoma/paraganglioma cases [1]. Paragangliomas associated with SDHD variants develop most often in head and neck locations, they are usually benign tumours, and the risk of metastatic disease in carriers is approximately 5–7% [4, 5]. The above case was characterised by an atypically aggressive clinical course with relapse and distant metastasis 7 years after the initial diagnosis.

#### Funding sources

This research did not receive any specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sector.

#### References

1. Buffet A, Burnichon N, Favier J, et al. An overview of 20 years of genetic studies in pheochromocytoma and paraganglioma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2020; 34(2): 101416, doi: 10.1016/j.beem.2020.101416, indexed in Pubmed: 32295730.
2. Hensen EF, Jordanova ES, van Minderhout IJ, et al. Somatic loss of maternal chromosome 11 causes parent-of-origin-dependent inheritance in SDHD-linked paraganglioma and phaeochromocytoma families. *Oncogene.* 2004; 23(23): 4076–4083, doi: 10.1038/sj.onc.1207591, indexed in Pubmed: 15064708.
3. Tufton N, Sahdev A, Drake WM, et al. Can subunit-specific phenotypes guide surveillance imaging decisions in asymptomatic SDH mutation carriers? *Clin Endocrinol (Oxf).* 2019; 90(1): 31–46, doi: 10.1111/cen.13877, indexed in Pubmed: 30303539.
4. Koopman K, Gaal J, de Krijger RR. Pheochromocytomas and Paragangliomas: New Developments with Regard to Classification, Genetics, and Cell of Origin. *Cancers (Basel).* 2019; 11(8), doi: 10.3390/cancers11081070, indexed in Pubmed: 31362359.
5. Lee H, Jeong S, Yu Y, et al. Risk of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in mutation carriers: a systematic review and updated meta-analysis. *J Med Genet.* 2020; 57(4): 217–225, doi: 10.1136/jmedgenet-2019-106324, indexed in Pubmed: 31649053.

## 6. Podsumowanie wyników i wnioski

### **Artykuł numer 1: *Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland – experience of a clinical center***

Do badania zostało włączonych 48 pacjentów z klasyczną postacią WPN (38 osób z postacią z SW i 10 z SV). U wszystkich pacjentów przeprowadzono analizę genetyczną metodą MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*), z użyciem sondy SALSA MLPA P050 CAH firmy MRC Holland, która umożliwia wykrywanie dużych rearanżacji i siedmiu najczęściej występujących mutacji punktowych w jednej mieszaninie reakcyjnej. W przypadkach, w których nie wykryto zmian molekularnych metodą MLPA, diagnostykę uzupełniono o sekwencjonowanie metodą Sangera. Czterech pacjentów zostało wykluczonych z dalszej analizy, ponieważ nie było możliwe określenie rozkładu allelicznego wariantów bez wykonania analizy molekularnej u rodziców.

W badanej grupie 44 pacjentów z klasyczną postacią WPN (łącznie 88 alleli), zmiany molekularne w genie *CYP21A2* stwierdzono w 100% analizowanych alleli. Najczęstszym wykrytym wariantem był I2G (c.293-13A/C>G), który wykazano w 38,63% wszystkich zbadanych alleli, następnie występowały duże delecje i wariant I172N (p.Ile173Asn) (odpowiednio 32,95% i 12,5% badanych alleli). Pozostałe wykryte warianty to: p.Val282Leu, SNP-113 (c.- 113G>A), Q318X (p.Gln319Ter), R356Q (p.Arg357Gln), R356W (p.Arg357Trp), p.Trp20Ter, p.Pro31Leu, del8bp (p.Gly111Valfs\*21), F306+T (p.Leu308Phefs\*6) i c.738+12\_738+13delACinsGT.

Otrzymane genotypy podzielono na pięć grup (w zależności od resztkowej aktywności enzymatycznej 21OHD) [17, 18], a następnie skorelowano z obrazem klinicznym. Grupa *null*, z 0% resztkową funkcją 21OHD, obejmowała pacjentów z zaburzeniami molekularnymi stwierdzonymi w obydwu allelach genu *CYP21A2*, powodującymi całkowity brak aktywności enzymatycznej (delecje, konwersje, F306+T, del8bp, klaster E6, R356W i Q318X). Grupę A (0–1% resztkowej aktywności 21OHD) stanowili pacjenci będący homozygotami I2G lub heterozygotami składającymi się z I2G i innego wariantu, z minimalną aktywnością enzymatyczną (0–1%). Pacjenci będący homozygotami wariantu I172N (około 2% resztkowej

aktywności enzymu 21OHD) lub heterozygotami I172N z wariantami *null* lub A, zostali przypisani do grupy B, z 1–2% resztkową aktywnością enzymu. Pacjenci, którzy byli nosicielami wariantów o nieznanym wpływie na resztkową aktywność enzymatyczną *in vitro*, zostali przydzieleni do grupy genotypowej D.

W badaniu wykazano dobrą korelację pomiędzy genotypem a oczekiwanym fenotypem w grupach z zerową aktywnością 21OHD (*null*) i grupie z aktywnością enzymu wynoszącą 0–1% (A), z PPV odpowiednio 100% i 90,5%, natomiast korelacja była znacznie niższa w grupie z aktywnością 1–2% (grupa B) i wynosiła 66,7%. U dziewięciu pacjentów stwierdzono niezgodność genotyp-fenotyp.

W badanej grupie zidentyfikowano jeden nowy wariant *CYP21A2* c.[878G>T] (p.Gly293Val), dotychczas nieopisywany w literaturze. Do oceny wpływu wykrytego wariantu na funkcję białka wykorzystano narzędzia bioinformatyczne. Zidentyfikowany wariant c.[878G>T] został oceniony jako uszkodzający przez PROVEAN [19] i SIFT [20]. Również zgodnie z klasyfikatorem Bayesa stosowanym w MutationTaster wariant ten został uznany za chorobotwórczy [21].

Badanie wykazało dobrą korelację pomiędzy genotypem a fenotypem w grupie pacjentów z zerową aktywnością 21-hydroksylazy (*null*) i w grupie z aktywnością wynoszącą 0–1% (A). Częstości wariantów genu *CYP21A2* były zbliżone do danych wcześniej opisywanych dla innych krajów regionu. Najczęstszym wariantem genetycznym w badanej kohorcie był I2G, a następnie duże delecje i wariant I172N. W badanej grupie zidentyfikowano jeden nowy wariant – c.[878G>T] (p.Gly293Val), który za pomocą narzędzi bioinformatycznych scharakteryzowano jako patogenny.



## **Artykuł nr 2: *Prevalence of selected single-nucleotide variants in patients with neuroendocrine tumors – potential clinical relevance***

Pomimo postępu wiedzy o nowotworach neuroendokrynych, czynniki genetyczne odpowiedzialne za rozwój sporadycznych NET nadal stanowią przedmiot badań. Wciąż poszukuje się markerów molekularnych, które miałyby wartość prognostyczną i/lub predykcyjną.

Celem pracy była ocena wybranych wariantów pojedynczych nukleotydów genów zaangażowanych w odpowiedź zapalną, kontrolę cyklu komórkowego i mechanizmy naprawy DNA, w aspekcie występowania sporadycznych NET oraz ich przebiegu klinicznego. W pracy Bodei i wsp. [13] polimorfizmy pojedynczych nukleotydów zostały wymienione jako potencjalne czynniki mogące mieć zastosowanie w przewidywaniu toksyczności związanej z radioterapią izotopową, co sugeruje, że przedstawione badanie może mieć w przyszłości implikacje praktyczne.

Do badania zostało włączonych 185 pacjentów. W pierwszej części przeprowadzono analizę molekularną czterech wariantów pojedynczego nukleotydu: rs8005354 (*DAD1*, NM\_001344 substytucja intronowa T/C), rs2069762 (substytucja T/G w regionie promotora *IL2* NM\_000586), rs3731198 (*CDKN2A*, NM\_000077 substytucja intronowa A/G) oraz rs1800872 (substytucja C/A w regionie promotora *IL10* NM\_000572) u 107 uczestników (49 pacjentów z NET o różnym punkcie wyjścia oraz 58 osób z grupy kontrolnej). W drugim etapie badania oceniono te same polimorfizmy pojedynczych nukleotydów u 127 pacjentów z NET i przeanalizowano w odniesieniu do danych klinicznych (ognisko pierwotne, stężenie CgA w surowicy i występowanie przerzutów). Analizowane warianty zostały wyselekcjonowane w oparciu o dane literaturowe wskazujące na ich potencjalny związek z rozwojem NET: rs3731198 [22, 23], rs8005354 [22] i rs2069762 [24] lub łączące wybrane warianty z podatnością na inne nowotwory: rs2069762 [25] i rs180072 [26].

Wszyscy pacjenci zostali przebadani pod kątem obecności wybranych SNP przy użyciu odpowiednich sond TaqMan i TaqMan Genotyping Master Mix.

Analiza homozygot wykazała istotną statystycznie większą częstość występowania homozygot TT wariantu rs3731198 w grupie kontrolnej ( $p = 0,0209$ ). W grupie pacjentów z NET stwierdzono istotną statystycznie wyższą częstość występowania homozygot GG wariantu rs1800872 ( $p = 0,003$ ). Ponadto wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy

wariantem rs3731198 a występowaniem przerzutów do węzłów chłonnych ( $p = 0,0038$  z korektą Bonferroniego).

Badanie wykazało, że homozygoty GG wariantu rs1800872 są częściej obserwowane u chorych z NET, natomiast homozygoty TT wariantu rs3731198 występują w tej grupie rzadziej. Wariant rs3731198 może być związany ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych.

### **Artykuł nr 3: *A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in SDHD***

Zmiany genetyczne w genie *SDHD* odpowiadają za około 9% wszystkich przypadków pheochromocytoma/paraganglioma [14]. Paraganglioma związane z wariantami *SDHD* rozwijają się najczęściej w obrębie głowy i szyi, zwykle cechują się łagodnym przebiegiem klinicznym, a ryzyko wystąpienia choroby przerzutowej u nosicieli wynosi około 5–7% [16]. W pracy przedstawiono przypadek pacjentki z dwoma wariantami w obrębie genu *SDHD*. Na jednym allelu został wykryty wariant w postaci rozległej delecji genu (w obrębie eksonów 1–3), natomiast na drugim allelu rzadki wariant, c.34G>A (p.Gly12Ser), który do niedawna oznaczony był jako mający „niepewne znaczenie kliniczne”, a aktualnie jest klasyfikowany w bazie NCBI ClinVar jako „łagodny lub prawdopodobnie łagodny”. Przedstawiony przypadek cechował się agresywnym przebiegiem, wystąpieniem wznowy i przerzutów odległych około 7 lat od pierwotnego rozpoznania.

#### **Podsumowanie ogólne**

Coraz szersze portfolio testów genetycznych wykorzystywanych we współczesnej endokrynologii pozwala na poprawę możliwości diagnostycznych, a w niektórych sytuacjach również predykcyjnych.

Badania genetyczne w wielu jednostkach chorobowych stanowią dzisiaj decydujące narzędzie w optymalizacji procesów diagnostycznych i personalizacji leczenia. Poszukiwania zaburzeń molekularnych w rzadkich chorobach endokrynologicznych przybliżają nas nie tylko do lepszego zrozumienia patomechanizmu ich powstawiania, ale i przewidywania przebiegu choroby i odpowiedzi na leczenie.

## 7. Streszczenie pracy w języku polskim

### Wstęp

Badania molekularne stanowią jedną z kluczowych i niezwykle dynamicznie rozwijających się metod diagnostycznych współczesnej endokrynologii. Poszukiwanie zmian genetycznych pozwala nie tylko na ustalenie prawidłowego rozpoznania czy przewidywanie przebiegu klinicznego danej jednostki chorobowej, ale może również stwarzać możliwości terapii, zwłaszcza w dobie medycyny spersonalizowanej.

Założeniem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie zagadnień związanych z wykorzystaniem badań genetycznych w kilku wybranych rzadkich zaburzeniach endokrynologicznych: klasycznej postaci wrodzonego przerostu nadnerczy, guzach neuroendokrynnych oraz przyzwojakach.

### Cele pracy

1. Określenie korelacji pomiędzy genotypem a fenotypem u pacjentów z klasyczną postacią wrodzonego przerostu nadnerczy, wywołaną niedoborem 21-hydroksylazy.
2. Ocena wpływu wybranych wariantów genetycznych pojedynczych nukleotydów na ryzyko zachorowania oraz przebieg kliniczny guzów neuroendokrynnych.
3. Powiązanie rzadkiego przypadku agresywnego, dziedzicznego paraganglioma z patogennym wariantem w genie *SDHD*.

### Materiały i metody

Do pierwszego badania, dotyczącego podłoża genetycznego wrodzonego przerostu nadnerczy i korelacji genotyp-fenotyp, włączono 48 pacjentów (30 kobiet i 18 mężczyzn z klasyczną postacią WPN (38 z utratą soli i 10 z wirylicacją prostą). U wszystkich pacjentów została przeprowadzona analiza molekularna genu *CYP21A2* metodą MLPA, przy negatywnym wyniku MLPA diagnostykę była uzupełniona o sekwencjonowanie. Otrzymane genotypy podzielono w zależności od aktywności resztkowej 21-hydroksylazy, a następnie porównano z fenotypem klinicznym.

Do drugiego badania analizującego wybrane polimorfizmy pojedynczych nukleotydów w nowotworach neuroendokrynnych włączono 185 pacjentów. W pierwszym etapie pracy

analizowano częstość wybranych wariantów molekularnych: rs8005354 (*DAD1*, NM\_001344 substytucja intronowa T/C), rs2069762 (substytucja T/G w regionie promotora *IL2* NM\_000586), rs3731198 (*CDKN2A*, NM\_000077 substytucja intronowa A/G) oraz rs1800872 (substytucja C/A w regionie promotora *IL10* NM\_000572) w grupie badanej, obejmującej 49 pacjentów z NET o różnych punktach wyjścia oraz w grupie kontrolnej, liczącej 58 osób. W kolejnej części te same warianty analizowano w kontekście danych klinicznych w grupie 127 pacjentów z NET (punkt wyjścia guza neuroendokrynnego, stężenie chromograniny A i występowanie przerzutów).

W trzeciej pracy, będącej opisem przypadku, przedstawiono przypadek pacjentki z wariantami w obydwu allelach genu *SDHD* i agresywnym przebiegiem klinicznym.

## Wyniki

W pierwszym badaniu, dotyczącym WPN, zmiany molekularne w genie *CYP21A2* wykazano w 100% analizowanych alleli. Najczęstszym wykrytym wariantem był I2G (c.293-13A/C>G) stwierdzony w 38,63% wszystkich przebadanych alleli. Duże delecje dotyczyły 32,95% alleli, a wariant I172N (p.Ile173Asn) 12,5%. Badanie wykazało dobrą korelację pomiędzy genotypem a oczekiwanym fenotypem w grupach z zerową aktywnością 21-hydroksylazy (*null*) i grupie z aktywnością wynoszącą 0–1% (A), PPV odpowiednio 100% i 90,5%. Korelacja była znacznie niższa w grupie z aktywnością 1–2% (grupa B) – 66,7%. U dziewięciu pacjentów stwierdzono niezgodność genotyp-fenotyp. W badanej grupie zidentyfikowano jeden nowy patogenny wariant *CYP21A2* c.[878G>T] (p.Gly293Val), dotychczas nieopisywany w literaturze.

W drugim badaniu analiza homozygot udowodniła większą częstość występowania homozygot TT wariantu rs3731198 w grupie kontrolnej ( $p = 0,0209$ ). U pacjentów z NET stwierdzono wyższą częstość występowania homozygot GG wariantu rs1800872 ( $p = 0,003$ ). Ponadto wykazano istotną statystycznie korelację pomiędzy wariantem rs3731198 a przerzutami do węzłów chłonnych ( $p = 0,0038$ ).

W trzeciej pracy scharakteryzowano warianty genu *SDHD* na podstawie przypadku klinicznego. W obrębie jednego allelu wykryto wariant w postaci rozległej delecji genu (eksonów 1–3), na drugim allelu zidentyfikowano rzadki wariant, c.34G>A (p.Gly12Ser).

## **Wnioski**

1. Przeprowadzone badania pozwoliły na scharakteryzowanie genotypów klasycznej postaci WPN pacjentów z Polski południowej. Udowodniono wysoką korelację genotyp-fenotyp w grupach z zerową aktywnością 21-hydroksylazy oraz z aktywnością wynoszącą 0–1%. Zidentyfikowano i scharakteryzowano nowy patogenny wariant genu *CYP21A2*.
2. Wykazano, że homozygoty GG wariantu rs1800872 występują częściej u pacjentów z NET, a homozygoty TT wariantu rs3731198 są w tej grupie rzadsze. Wariant rs3731198 może się wiązać z ryzykiem wystąpienia przerzutów do węzłów chłonnych.
3. Opis przypadku zwrócił uwagę na rzadki przypadek agresywnego przebiegu paraganglioma związanego a patogennym wariantem *SDHD*.

## 8. Streszczenie pracy w języku angielskim

### Introduction

Molecular testing is one of the key and rapidly developing diagnostic methods in modern endocrinology. Searching for genetic alterations not only makes it possible to establish the proper diagnosis or predict the clinical course of a given disease entity, but can also provide opportunities for therapy, especially in the era of personalized medicine.

The purpose of this dissertation was to address issues related to genetic testing in selected rare endocrine disorders: the classical form of congenital adrenal hyperplasia, neuroendocrine tumors, and paragangliomas.

### Objects of the study

1. Determine the correlation between genotype and phenotype in patients with the classical form of congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency.
2. Assess the significance of selected single nucleotide genetic variants in the susceptibility and clinical course of neuroendocrine tumors.
3. Linking a rare case of aggressive hereditary paraganglioma with a pathogenic variant in the *SDHD* gene.

### Materials and Methods

Forty-eight patients (30 females and 18 males) with the classical form of CAH (38 with salt wasting and 10 with simple virilization) were included in the first study, on the genetic basis of CAH and genotype-phenotype correlations. Molecular analysis of the *CYP21A2* gene using MLPA was performed in all patients; in cases with a negative MLPA result, the diagnosis was complemented by sequencing. The obtained genotypes were classified according to the residual 21-hydroxylase activity and then compared with the clinical phenotype.

For the second study, which analyzed selected single nucleotide polymorphisms in neuroendocrine tumors, 185 patients were included. In the first stage of the study, the prevalence of selected molecular variants, rs8005354 (*DAD1*, NM\_001344 intronic T/C substitution), rs2069762 (T/G substitution in *IL2* promoter region NM\_000586), rs3731198 (*CDKN2A*, NM\_000077 intronic A/G substitution), and rs1800872 (C/A substitution in *IL10*

promoter region NM\_000572) was analysed in a study group of 49 NET patients and a control group of 58 subjects. In the next part, the same variants were analyzed in the context of clinical data on an extended group of 127 NET patients (primary site, serum chromogranin A concentration and metastasis).

The third paper, which is a case report, presents the case of a patient with variants in both alleles of the *SDHD* gene and an aggressive clinical course.

## Results

In the first study on classical CAH, molecular alterations in the *CYP21A2* gene were identified in 100% of the alleles analyzed. The most common variant detected was I2G (c.293-13A/C>G) - 38.63% of all alleles tested. Large deletions affected 32.95% of alleles and the I172N variant (p.Ile173Asn) affected 12.5%. The study showed a good correlation between genotype and expected phenotype in the groups with zero 21-hydroxylase activity (*null*) and the group with activity of 0-1% (A), PPV 100% and 90.5%, respectively. The correlation was much lower in the group with 1-2% activity (group B) - 66.7%. Nine patients had non-concordance of genotype and phenotype. In the study group, a new pathogenic variant of *CYP21A2* c.[878G>T] variant (p.Gly293Val), previously not reported in the literature, was identified and characterized.

In the second study, homozygote analysis proved a higher frequency of TT homozygotes of the rs3731198 variant in the control group ( $p = 0.0209$ ). NET patients showed a higher frequency of GG homozygotes of the rs1800872 variant ( $p = 0.003$ ). There was a statistically significant correlation between the rs3731198 variant and lymph node metastasis ( $p = 0.0038$ ).

In the third study, variants of the *SDHD* gene were characterized based on a clinical case. Within one allele, a variant was detected in the form of extensive deletion of the gene (exons 1–3), and a rare variant, c.34G>A (p.Gly12Ser), was identified in the other allele.

## Conclusions

1. The study allowed us to characterize the genotypes of the classical CAH in patients from southern Poland. A high genotype-phenotype correlation was shown in groups with zero 21-hydroxylase activity and with 0-1% activity. A new variant of the *CYP21A2* gene has been identified and characterized by means of bioinformatic tools.



2. The study showed that GG homozygotes of the rs1800872 variant are more common in NET patients, while TT homozygotes of the rs3731198 variant are less common in this group. The rs3731198 variant may be associated with a risk of lymph node metastasis.
3. The case report highlighted a rare case of aggressive paraganglioma associated with a pathogenic variant of *SDHD*.

## 9. Piśmiennictwo

- [1] El-Maouche D, Arlt W, Merke DP. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet*. 2017;390(10108):2194-2210. doi:10.1016/S0140-6736(17)31431-9.
- [2] Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, et al. Congenital Adrenal Hyperplasia Due to Steroid 21-Hydroxylase Deficiency: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(11):4043-4088. doi:10.1210/jc.2018-01865.
- [3] Navarro-Zambrana AN, Sheets LR. Ethnic and National Differences in Congenital Adrenal Hyperplasia Incidence: A Systematic Review and Meta-analysis [published online ahead of print, 2022 Aug 16]. *Horm Res Paediatr*. 2022;10.1159/000526401. doi:10.1159/00052640.
- [4] Concolino P, Costella A. Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) due to 21-Hydroxylase Deficiency: A Comprehensive Focus on 233 Pathogenic Variants of CYP21A2 Gene. *Mol Diagn Ther*. 2018;22(3):261-280. doi:10.1007/s40291-018-0319-y.
- [5] Simonetti L, Bruque CD, Fernández CS, et al. CYP21A2 mutation update: Comprehensive analysis of databases and published genetic variants. *Hum Mutat*. 2018;39(1):5-22. doi:10.1002/humu.23351.
- [6] Marino R, Ramirez P, Galeano J, et al. Steroid 21-hydroxylase gene mutational spectrum in 454 Argentinean patients: genotype-phenotype correlation in a large cohort of patients with congenital adrenal hyperplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011;75(4):427-435. doi:10.1111/j.1365-2265.2011.04123.x.
- [7] de Carvalho DF, Miranda MC, Gomes LG, et al. Molecular CYP21A2 diagnosis in 480 Brazilian patients with congenital adrenal hyperplasia before newborn screening introduction. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(2):107-116. doi:10.1530/EJE-16-0171.
- [8] New MI, Abraham M, Gonzalez B, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(7):2611-2616. doi:10.1073/pnas.1300057110.
- [9] Kos-Kudła B, Foltyn W, Malczewska A, et al. Update of the diagnostic and therapeutic guidelines for gastro-entero-pancreatic neuroendocrine neoplasms (recommended by the Polish Network of Neuroendocrine Tumours). *Endokrynol Pol*. 2022;73(3):387-454. doi:10.5603/EP.a2022.0049.
- [10] Nagtegaal ID, Odze RD, Klimstra D, et al. The 2019 WHO classification of tumours of the digestive system. *Histopathology*. 2020;76(2):182-188. doi:10.1111/his.13975.
- [11] Mafficini A, Scarpa A. Genetics and Epigenetics of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr Rev*. 2019;40(2):506-536. doi:10.1210/er.2018-00160.

- [12] Dasari A, Shen C, Halperin D, et al. Trends in the Incidence, Prevalence, and Survival Outcomes in Patients With Neuroendocrine Tumors in the United States. *JAMA Oncol.* 2017;3(10):1335-1342. doi:10.1001/jamaoncol.2017.0589.
- [13] Bodei L, Schöder H, Baum RP, et al. Molecular profiling of neuroendocrine tumours to predict response and toxicity to peptide receptor radionuclide therapy. *Lancet Oncol.* 2020;21(9):e431-e443. doi:10.1016/S1470-2045(20)30323-5.
- [14] Buffet A, Burnichon N, Favier J, Gimenez-Roqueplo AP. An overview of 20 years of genetic studies in pheochromocytoma and paraganglioma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2020;34(2):101416. doi:10.1016/j.beem.2020.101416.
- [15] Mete O, Asa SL, Gill AJ, et al. Overview of the 2022 WHO Classification of Paragangliomas and Pheochromocytomas. *Endocr Pathol.* 2022;33(1):90-114. doi:10.1007/s12022-022-09704-6.
- [16] Lee H, Jeong S, Yu Y, et al. Risk of metastatic pheochromocytoma and paraganglioma in *SDHx* mutation carriers: a systematic review and updated meta-analysis. *J Med Genet.* 2020;57(4):217-225. doi:10.1136/jmedgenet-2019-106324.
- [17] Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, et al. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(5):1145-1152. doi:10.1210/jcem.78.5.8175971.
- [18] Speiser PW, Dupont J, Zhu D, et al. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1992;90(2):584-595. doi:10.1172/JCI115897.
- [19] Choi Y, Sims GE, Murphy S, et al. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One.* 2012;7(10):e46688. doi:10.1371/journal.pone.0046688.
- [20] Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-1081. doi:10.1038/nprot.2009.86.
- [21] Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-362. doi:10.1038/nmeth.2890.
- [22] Ter-Minassian M, Wang Z, Asomaning K, et al. Genetic associations with sporadic neuroendocrine tumor risk. *Carcinogenesis.* 2011;32(8):1216-1222. doi:10.1093/carcin/bgr095.
- [23] Campa D, Capurso G, Pastore M, et al. Common germline variants within the

CDKN2A/2B region affect risk of pancreatic neuroendocrine tumors. *Sci Rep.* 2016;6:39565. Published 2016 Dec 23. doi:10.1038/srep39565.

- [24] Berković MC, Jokić M, Marout J, et al. IL-2 -330 T/G SNP and serum values-potential new tumor markers in neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas (GEP-NETs). *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(4):423-429. doi:10.1007/s00109-009-0581-x.
- [25] Zhang M, Tan X, Huang J, et al. Association between two interleukin-2 gene polymorphisms and cancer susceptibility: a meta-analysis. *Onco Targets Ther.* 2016;9:2181-2192. doi:10.2147/OTT.S94761.
- [26] Ding Q, Shi Y, Fan B, et al. The interleukin-10 promoter polymorphism rs1800872 (-592C>A), contributes to cancer susceptibility: meta-analysis of 16,785 cases and 19,713 controls. *PLoS One*. 2013;8(2):e57246. doi:10.1371/journal.pone.0057246.

## **11.Oświadczenia współautorów prac**

Kraków, 08.11.2022 r.

prof. dr hab. n. med. Alicja Hubalewska-Dydejczyk  
Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *"Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland - experience of a clinical center."* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na krytycznym przeglądzie przygotowanego artykułu pod kątem istotnej zawartości intelektualnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.



.....  
(podpis współautora)



Kraków, 08.11.2022 r.

dr hab. n. med. Elwira Przybylik-Mazurek  
Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *"Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland - experience of a clinical center."* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, udziale w analizie i interpretacji danych, krytycznym przeglądzie przygotowanego artykułu pod kątem istotnej zawartości intelektualnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.

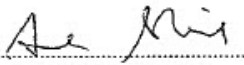
Dr n med. Anna Skalniak  
Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

#### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *"Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland - experience of a clinical center."* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na analizie danych i pomocy w przygotowywaniu artykułu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Place/date Stockholm 22 sep 2022

M.D. Kim Franson, Karolinska Universitetet  
(title, name and surname, affiliation)

#### Co-authorship statement

As a co-author of the publication: **Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland - experience of a clinical center.** *Hormones (Athens)*. 2022;21(2):241-249.  
doi:10.1007/s42000-022-00348-z

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of:

- validation of a research method (*CYP21A2* sequencing).

Hereby, I agree to submit the above-mentioned publication by MD Anna Kurzyńska as part of a doctoral dissertation in the form of a thematically coherent collection of articles published in scientific journals.

I declare that an independent and identifiable part of the abovementioned publication shows individual contribution of MD Anna Kurzyńska consisting of:

- development a research concept
- data collection
- interpretation of results
- preparation of manuscript
- review and editing of manuscript

.....  
(co-author's signature)

Ankara, Turkey 21/09/2022

Viola Bistika M. D.  
Başkent University Hospital

#### Co-authorship statement

As a co-author of the publication: **Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland - experience of a clinical center.** *Hormones (Athens)*. 2022;21(2):241-249.  
doi:10.1007/s42000-022-00348-z

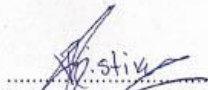
I declare that my own substantial contribution to this publication consists of:

- validation of a research method (*CYP21A2* sequencing).

Hereby, I agree to submit the above-mentioned publication by MD Anna Kurzyńska as part of a doctoral dissertation in the form of a thematically coherent collection of articles published in scientific journals.

I declare that an independent and identifiable part of the abovementioned publication shows individual contribution of MD Anna Kurzyńska consisting of:

- development a research concept
- data collection
- interpretation of results
- preparation of manuscript
- review and editing of manuscript

  
.....  
(co-author's signature)

---

Kraków, 08.11.2022 r.

lek. Anna Kurzyńska  
Katedra Endokrynologii CMUJ

#### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *"Molecular analysis and genotype-phenotype correlations in patients with classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency from southern Poland - experience of a clinical center."* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na: opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.

*Anna Kurzyńska*  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.

prof. dr hab. n. med. Alicja Hubalewska-Dydejczyk

Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "*Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors-Potential Clinical Relevance.*" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na krytycznym przeglądzie przygotowanego artykułu pod kątem istotnej zawartości intelektualnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.



.....  
(podpis współautora)



Kraków, 08.11.2022 r.

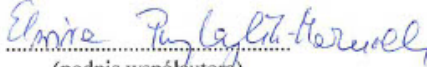
dr hab. n. med. Elwira Przybylik-Mazurek  
Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "*Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors-Potential Clinical Relevance.*" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na krytycznym przeglądzie przygotowanego artykułu pod kątem istotnej zawartości intelektualnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.

prof. dr hab. n. med. Dorota Pach  
Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "*Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors-Potential Clinical Relevance.*" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz krytycznym przeglądzie przygotowanego artykułu pod kątem istotnej zawartości intelektualnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.

Dr n med. Marta Opalińska  
Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "*Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors-Potential Clinical Relevance.*" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na krytycznym przeglądzie przygotowanego artykułu pod kątem istotnej zawartości intelektualnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.

Dr n med. Agnieszka Stefańska  
Oddział Kliniczny Endokrynologii, Endokrynologii Onkologicznej  
i Medycyny Nuklearnej SU w Krakowie

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "*Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors-Potential Clinical Relevance.*" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na zbieraniu danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.

  
(podpis współautora)

dr n. med. Agnieszka Stefańska  
SPECJALISTA CHOROÓB  
WEWNĘTRZNYCH, ONKOLOG  
ENDOKRYNOLOG 1981619

Kraków, 08.11.2022 r.

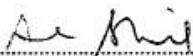
Dr n med. Anna Skalniak  
Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "*Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors-Potential Clinical Relevance.*" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na opracowaniu i analizie danych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.

lek. Anna Kurzyńska  
Katedra Endokrynologii CMUJ

#### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "*Prevalence of Selected Single-Nucleotide Variants in Patients with Neuroendocrine Tumors-Potential Clinical Relevance.*" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji badań, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu.

*Anne Kurzyńska*  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.


prof. dr hab. n. med. Alicja Hubalewska-Dydejczyk  
Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "*A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in SDHD.*" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na krytycznym przeglądzie przygotowanego artykułu pod kątem istotnej zawartości intelektualnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji pracy, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)



Kraków, 08.11.2022 r.

dr hab. n. med. Elwira Przybylik-Mazurek  
Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *"A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in SDHD."* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na krytycznym przeglądzie przygotowanego artykułu pod kątem istotnej zawartości intelektualnej.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji pracy, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.

Dr n med. Anna Skalniak  
Katedra i Klinika Endokrynologii CMUJ

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *"A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in SDHD."* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na opracowaniu wyników.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji pracy, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.

  
.....  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.

Dr n med. Agata Brzozowska-Czarnek  
Oddział Kliniczny Endokrynologii, Endokrynologii Onkologicznej  
i Medycyny Nuklearnej SU w Krakowie

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "*A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in SDHD.*" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na opracowaniu badań obrazowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji pracy, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.



.....  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.

Dr n med. Monika Buziak-Bereza  
Oddział Kliniczny Endokrynologii, Endokrynologii Onkologicznej  
i Medycyny Nuklearnej SU w Krakowie

### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: "*A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in SDHD.*" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na opracowaniu badań obrazowych.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. Annę Kurzyńską jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. Anny Kurzyńskiej polegający na: opracowaniu koncepcji pracy, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.

*Monika Buziak-Bereza*

.....  
(podpis współautora)

Kraków, 08.11.2022 r.

lek. Anna Kurzyńska  
Katedra Endokrynologii CMUJ

#### OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: *"A rare case of aggressive, hereditary paraganglioma associated with a pathogenic variant in SDHD."* oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zbieraniu danych, opracowaniu i interpretacji wyników, przygotowaniu manuskryptu.

Anna Kurzyńska  
(podpis współautora)