

Genetikai és epigenetikai biomarkerek hypophysis adenomákban

Doktori tézisek

Fülöpné Németh Kinga

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Butz Henriett, Ph.D., tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók:

Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Hubina Erika Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Kiss András, D.Sc., tanszékvezető, intézetvezető

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Putz Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Takács Krisztina, Ph.D., tanszékvezető egyetemi docens

Budapest
2019

I. Bevezetés

A hypophysis adenomák az intrakraniális tumorok 10-15%-át alkotják. Előfordulásuk eléri az 1/1000 esetet, amellyel a gyakori daganattípusok közé tartoznak. Tértfoglalásuk, és az endokrin rendszerre gyakorolt hatásuk miatt morbiditásuk jelentős. A hypophysis adenomák megközelítőleg 70%-a hormonálisan aktív, úgynevezett funkcionális adenoma, amelyek hormontermelésük révén klinikai tüneteket okoznak (például akromegáliát, Cushing-kórt), míg 30%-uk klinikailag nem-funkcionáló (hormonálisan inaktív) adenoma. Ezekben a sejtek hormontermelése (GH: növekedési hormon, PRL: prolaktin, FSH: follikulus stimuláló hormon, LH: luteinizáló hormon, ACTH: adenocorticotrop hormon, TSH: pajzsmirigy stimuláló hormon) csak az eltávolítást követő immunhisztokémiai vizsgálattal mutatható ki. Egyes adenomák immunhisztokémiai vizsgálattal minden hormonra negatívak (HN), míg mások több hormonra is pozitivitást mutatnak (plurihormonális adenomák).

A hypophysis adenomák 95%-ban sporadikus megjelenésűek, melyek kialakulásának és progressziójának molekuláris mechanizmusa kevésbé tisztázott. Új diagnosztikai módszerek és terápiás lehetőségek kidolgozása érdekében elsődleges fontosságú lenne ezen folyamatok és az ezekben résztvevő molekulák pontosabb megismerése.

Az eukarióta szövetekben a sejtek átlagosan 100 mitochondriummal rendelkeznek, melyek mindegyike több kópiában tartalmazhatja a 16569 bázispár hosszú cirkuláris mitochondriális DNS-t (mtDNS). A mitochondriumok az oxidatív foszforiláció révén biztosítják a sejtek energiájának nagy részét, valamint fontos szerepük van az apoptózisban, így a mtDNS-ben megjelenő hibák a sejtek működésének zavarához vezethetnek. Daganatos megbetegedéssel összefüggő mitochondriális variánsokat elsőként 1998-ban azonosítottak vastagbélrákban szenvedő betegeknél. Azóta számos más tumorszövetből is kimutattak mtDNS eltéréseket, és felvetették ezen variánsok tumorképződésben betöltött lehetséges szerepét.

A miRNS-ek olyan, 19-25 nukleotid hosszú, egyszálú RNS molekulák, amelyek az alapvető szabályozó funkciók finomhangolásában vesznek részt. Vérben való nagyfokú stabilitásuknak köszönhetően a keringő, extracelluláris miRNS-ek az elmúlt években kerültek a tumorbiológia fókuszpontjába, mint minimálisan invazív biomarkerek. Egyre több tanulmány foglalkozik az endokrin daganatok klinikai megjelenésével összefüggést mutató, plazmában vagy szérumban detektálható miRNS-ek szintjével, azonban a keringő miRNS-ek előfordulását hypophysis adenomákkal kapcsolatban eddig még nem vizsgálták. A miRNS-ek aktív szekrécióval, illetve a sejtek – például apoptózis révén való – szétesésével is a keringési rendszerbe juthatnak, így gyakran nagyon nehéz megmondani, hogy egy adott keringő miRNS valóban a tumorsejtekből

származik-e. Vannak olyan vizsgálatok, amelyben a tumor-asszociált miRNS-ek emelkedett szintjét tudták kimutatni a keringésben. Azonban ha a miRNS szintjének emelkedése vagy csökkenése a tumoral összefüggésben következetesen kimutatható, akkor a miRNS – eredetétől függetlenül – jól alkalmazható biomarkerként.

A hypophysis adenomák közül a prolaktin termelő daganatok esetében az elsődleges terápia a gyógyszeres kezelés, amely általában dopamin agonisták adását jelenti (például bromocriptin vagy cabergoline). Az összes többi adenoma típusnál az elsődleges terápiás lehetőség a daganat műtéti eltávolítása. A tumor teljes rezekciója azonban gyakran nehézkes, különösen a nagy méretű, és a környező szövetekbe terjedő daganatok esetében.

Mivel a rákos sejtek kialakulásának lényeges momentuma az apoptózis folyamatának károsodása, a tumorterápiák egyik fontos ágazata az apoptózis indukálása. Ennek egyik ígéretes módja a humán rekombináns TRAIL (TNF-szerű apoptózis indukáló ligand) kezelés, amely szelektíven, a tumorsejtekben indukálja az apoptózist anélkül, hogy az egészséges sejteket károsítaná. Számos daganatsejtről kimutatták azonban, hogy rezisztens a TRAIL kezelésre, melynek hátterében részben a survivin molekula emelkedett expresszióját azonosították.

A survivin az apoptózis inhibitor fehérjék (iAP) családjába tartozó kis molekula, amelynek mind az apoptózis, mind a sejtciklus szabályozásában fontos szerepe van. A felnőtt szövetekben általában alacsonyban, vagy egyáltalán nem fejeződik ki, emelkedett expresszióját viszont rengeteg tumorszövetben leírták. Több esetben is korrelációt fedeztek fel a tumor invazivitásával, kezelésre való rezisztenciájával és a kedvezőtlen túléléssel. Mindezek alapján a survivin egy ígéretes terápiás célpont a daganatterápiákban.

II. Célkitűzés

Doktori munkám során az alábbi célokat állítottam fel:

1. A hypophysis adenomák teljes mitochondriális genomját újgenerációs szekvenálással kívántam elemezni. Olyan variánsok után kutattam, melyek jelenléte segítséget nyújthat a hypophysis adenomák kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok pontosabb megértésében.
2. Célul tűztem ki a hypophysis adenomában szenvedő betegek keringő miRNS profiljának vizsgálatát potenciális biomarkerek felkutatása céljából. Ezen belül célom volt:
 - a. összehasonlítani a hypophysis adenomás betegek plazmájában előforduló miRNS és isomiR szekvenciákat,
 - b. és összevetni a miRNS-ek változását különböző hypophysis daganattal operált betegek műtét előtti és műtét utáni vérplazma mintájában.
3. Célul tűztem ki potenciális terápiás célpontok felkutatását hypophysis szöveti génexpressziós adatok alapján. Ennek keretében:
 - a. az apoptózisban résztvevő survivin és TRAIL molekula expressziós és funkcionális vizsgálatát,
 - b. a survivinen keresztül ható acetyl-szalicilsav (ASA) hypophysis adenoma sejtekre gyakorolt *in vitro* hatásának elemzését,
 - c. valamint a survivin gátlás és ASA hatás további *in vivo* vizsgálatához xenograft modellállatot kívántam létrehozni az RC-4 B/C hypophysis adenoma sejtvonalból.

III. Módszerek

III.1. Betegminták

Munkám során összesen 102 hypophysis adenoma (26 GH termelő (GHPA) és 76 nem-funkcionáló (NFPA)), és 10 normális (ép) hypophysis (NH) szövetmintát, valamint 45 betegől származó 149 plazmamintát, és kontrollként 2 egészséges önkéntes plazmamintáját használtam fel.

A hypophysis adenoma szövetmintákat az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetben 2015 és 2017 között transspenoidalis feltárással végzett operációk alkalmával gyűjtöttem össze. Az egészséges hypophysis szövetminták korábbi kollaborációból (2009) (University Clinical Centre, Belgrade, Serbia), endokrin betegségben nem szenvedő, baleseti elhunytakból – a halál beálltát követő 6 órán belül – kerültek eltávolításra. A pre- és posztoperatív vérminták a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikán hypophysis adenomával gondozott betegektől származnak. A betegek részletes tájékoztatást követően beleegyező nyilatkozat aláírásával járultak hozzá a minták felhasználásához.

III.2. Extracelluláris vezikula és nukleinsav izolálás

Az extracelluláris vezikulák (EV) szeparálását mintánként 300 ul plazmából a Total Exosome Isolation Kit (from plasma) (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztem. A DNS izolálást a 45 szövetmintából a QIAamp Fast DNA Tissue Kit-tel (Qiagen), a sejtmintákból pedig a QIAamp DNA Mini Kit-tel (Qiagen) hajtottam végre. Az RNS izoláláshoz a szövetek és sejtek esetében az RNeasy és a miRNeasy Mini Kit-eket (Qiagen), a plazma és az EV minták esetében a miRNeasy Serum/Plasma Kitet (Qiagen) alkalmaztam, a mintákhoz az izolálás során spike-in kontrollként cel-miR-39-3p exogén miRNS (Invitrogen) adtam. A nukleinsavak koncentrációját NanoDrop 1000 Spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) mértem.

III.3. Hagyományos és újgenerációs szekvenálás

A mitochondriális genom elemzéséhez a könyvtárkészítést a hypophysis adenoma szövetekből izolált genomiális DNS-ből kiindulva, VariantPro™ Mitochondrion Panel Library Preparation Kit (VP-MIT-0048, LC Sciences, LLC) segítségével, míg a miRNS szekvenáláshoz a plazmákból izolált RNS-ből kiindulva QIAseq™ miRNA Library Kit-tel (Qiagen) végeztem.

Az indexelt egyedi könyvtárak tisztaságát és a megfelelő méretű fragmensek jelenlétét Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) készülékkel ellenőriztem. A könyvtárak koncentrációját Qubit Fluorometerrel (Thermo Fisher Scientific) mértem, amelyekből ekvimoláris mennyiségeket összemérve létrehoztam a több indexelt mintát tartalmazó, 4 nM-

os összemért könyvtárat (könyvtár pool). Ezt a nátrium-hidroxiddal való denaturálást követően 10 pM-osra hígítottam, majd 600 µl-t a szekvenáló kazettába töltöttem.

A mitochondriális genom elemzéséhez az 500 ciklusos Illumina MiSeq Reagent v2 kit-et (Illumina), míg a miRNS profil elemzéséhez a 150 ciklusos Illumina MiSeq Reagent v3 kit-et (Illumina) használtam. A szekvenálásokat mindkét esetben Illumina MiSeq készüléken végeztem.

A kiválasztott mitohondriális variánsokat 45 mintában Sanger szekvenálással is validáltam. A fragmentumok felszaporításához a nukleáris genom kizárása érdekében mitochondrium-specifikus primer készletet alkalmaztam. A Sanger szekvenálás előkészítése BigDye™ Direct Cycle Sequencing Kit-tel (Thermo Fisher Scientific), a szekvenálás pedig Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) gép használatával történt.

III.4. Gén- és miRNS expressziós mérések

Az apoptózisban résztvevő gének expresszióját 29 NFPA, 19 GHPA és 10 NH szöveten TaqMan Low Density Array (TLDA) (Applied Biosystems) kártyával, a szöveti miRNS profilozás pedig 6 GHPA és 5 NH szöveten TLDA Human MicroRNA Panel v2 (Applied Biosystems) kártyával 7900 Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) gépen történt. Az expresszió változásokat a ddCT módszer alkalmazásával határoztam meg.

Az egyedi génexpresszió mérésekhez High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific), a miRNS mérésekhez pedig TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével cDNS-t szintetizáltam.

A survivin és a miRNS-ek expresszióját egyedi TaqMan gene expression assay-k (rno-BIRC5: Rn00574012_m1, hsa-BIRC5: Hs04194392_s1, hsa-ACTB: Hs99999903_m1, 18S: Hs99999901_s1, cel-miR-39-3p: 478293_mir, hsa-143-3p: 477912_mir, hsa-6867-5p: 480488_mir,150 hsa-6514-3p: 480214_mir, hsa-150-5p: 477918_mir, hsa-126-5p: 477888_mir, hsa-26b-5p: 478418_mir, hsa-151 148b-3p: 477824_mir) és TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztam meg. A ciklinA2 (CCNA2) és CDK2 gének expresszióját PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) és egyedileg tervezett primerek (rno-CCNA2 fw: 5'-GGATGGTAGTTTTGAATCACCCC-3', rev: 5'-GGATGGCCCGCATACTGTTA-3', rno-CDK2 fw: 5'-GCTTATCAACGCAGAGGGGT-3', rev: 5'-GGGTCACCATTTTCGGCAAAG-3', rno-ACTB fw: 5'-AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT-3', rev: 5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3') alkalmazásával mértem.

A méréseket Quant Studio 7 (Thermo Fisher Scientific) készüléken, 3 technikai párhuzamos alkalmazásával végeztem. Az expressziók kiszámításához a ddCt módszert használtam.

III.5. Western blot analízis

A western blot elemzéshez a fehérjéket 5x sample bufferrel (Thermo Fisher Scientific) kevertem és 99°C-on 5 percig denaturáltam. 15%-os poliakrilamid gélen mintánként azonos mennyiségű fehérjét választottam szét. Ezeket PVDF (polivinilidén-difluorid) membránra blottoltam, melynek sikerességét Ponceau festéssel igazoltam. A membránt blokkolás után az egy éjszakán át 4°C-on inkubáltam az elsődleges antitesttel: survivin (1:500; #2808), CDK2 (1:1000; #2546), p-CDK2 (1:1000; #2561) (Cell Signaling), cyclin A2 (1:1000; #MA1-154) (Thermo Fisher Scientific). A következő nap a membránt tormaperoxidáz-kötött másodlagos antitesttel inkubáltam: anti-egér (1:2000, #P044701, Agilent) vagy anti-nyúl (1:2000, #P044801, Agilent), majd SuperSignal West Pico kemilumineszcens szubsztrát (Thermo Fisher Scientific) segítségével hívtam elő, és Kodak Image Station 4000MM műszerrel vizualizáltam. A normalizáláshoz a mintákban – a fentieknek megfelelően – a β -aktin mennyiségét is meghatároztam, majd Image J szoftvert (Bethesda) segítségével denzitometriai elemzést végeztem.

III.6. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálathoz 16 NFPA, 9 GHPA és 5 NH szövetből származó formalinnal-fixált paraffinba ágyazott (FFPE) mintát használtunk. A 4 μ m-es metszeteket, a korábban beállított protokoll alapján nyúl anti-survivin elsődleges (71G4B7, Cell Signaling Technology, 1:4000), és kecske anti-nyúl másodlagos (#P0448, Agilent, 1:200) antitestek segítségével jelöltük. Az előhívást DAB Chromogen Kit (Biocare Medical) alkalmazásával végeztük, valamint a mintákon haematoxylin jelölést is alkalmaztunk. Az elkészült metszeteket nagyfelbontású scanner (Pannoramic Scan, 3DHISTECH Kft.) segítségével digitalizáltuk, és a CaseViewer 2.1 szoftver NuclearQuant (3DHISTECH Kft.) moduljának segítségével tapasztalt patológus elmezte. A survivin expresszió alapján két csoportot különítettük el: negatív-gyenge, és közepes-erős expresszió. A szoftver segítségével megállapítottuk, hogy a sejtek hány százaléka volt survivin pozitív. A közepes-erős festődést alkalmaztuk a csoportok közötti összehasonlításra.

III.7. Sejtenyészeteken végzett *in vitro* vizsgálatok

Kísérleteimet az RC-4 B/C (CRL-1903) és a GH3 (CCL-82.1) patkány hypophysis adenoma sejtvonalakon végeztem (American Type Culture Collection, ATCC).

A sejtek kezeléséhez az acetyl-salicilsav (ASA) esetében 1-5 mM, az YM155 esetében 0,1-5 μ M, a TRAIL esetében pedig 2 μ g/ml koncentrációkat alkalmaztam. A kezeléseket minden méréshez legalább 3 független kísérletben végeztem el.

A proliferáció vizsgálatához 10% AlamarBlue reagenst adtam a sejtekhez, majd egy óra 37°C-on való inkubálás után plate reader (Thermo Fisher Scientific) segítségével mértem a fluoreszcenciát. A sejtek életképességének meghatározásához trypan blue festést alkalmaztam.

Az apoptózis vizsgálatához a kaszpáz-3 aktivitását Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével mértem, valamint a sejtekből izolált DNS degradációját agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem.

A kezelések sejtciklusra gyakorolt hatását áramlási citometriával vizsgáltam. A sejteket 10 ng/ml propidium-jodiddal festettem, majd FACSCalibur áramlási citométeren (BD Sciences) elemeztem. Minden mintában legalább 10000 eseményt mértem. Az eredmények értékeléséhez Cell Quest Pro és ModFit szoftvereket alkalmaztam. A korábbiakhoz hasonlóan minden kezelésnél és időpontnál legalább három biológiai párhuzamos mintát elemeztem.

A survivin túlexpresszáltatásához a survivin fragmentumot HindIII és XbaI enzimek (New England Biolabs) használatával pcDNA3.1 vektorba (Thermo Fisher Scientific) klónoztam. Ezt Escherichia coli DH5 α baktériumokba transzformáltam, melyekből felszaporítás után PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével nagy mennyiségben nyertem ki a rekombináns DNS-t. Az inszert szekvenciáját és plazmidba való beépülését a plazmidon tapadó primerek segítségével, Sanger szekvenálással ellenőriztem (a primerek szekvenciája: fw: 5'-CGAAGCTTCACCATGGGTGCTCCGGCGCTGC-3', rev: 5'-CGTCTAGAGTCAGCGTAAGGCAGCCAGCTG-3'). Az elkészült plazmidot XtremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Sigma) segítségével juttattam be az RC-4 B/C sejtekbe. A survivin túlexpresszáltatásának sikerességét 48 óra eltelté után RT-qPCR-rel és western blottal is igazoltam. A transzfekció hatékonysága megközelítőleg 80%-os volt, melyet GFP-t (zöld fluoreszcens fehérje) tartalmazó plazmid bevitelével fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztem.

A survivin gén csendesítése érdekében két különböző survivin siRNS-sel (Silencer Select s133761, s133762, Thermo Fisher Scientific), és egy negatív kontrol siRNS-sel (Thermo Fisher Scientific), Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) reagens segítségével transzfektáltam a sejteket 10 nM végkoncentrációban. A géncsendesítés hatékonyságát western blottal ellenőriztem.

III.8. Xenograft kísérlet

A xenograft kísérlethez 6-8 hetes, kombinált immunhiányos (SCID) BALB/C törzsű beltenyésztett egerekbe szérum mentes tápban szuszpendált, mátrigéllal (Corning) 1:1 arányban kevert RC-4 B/C sejteket injektáltunk. Minden kísérletben két-két egeret használtunk, és egerenként a következő sejtszámokat próbáltuk ki: 5×10^6 , 10^7 , 2×10^7 . Irodalmi adatok alapján pozitív kontrollként GH3 sejteket (10^7 sejt/egér) használtunk.

III.9. Bioinformatikai és statisztikai elemzések

Az újgenerációs szekvenálással kapott eredményeket komplex bioinformatikai elemzésnek vetettük alá. A mitochondriális genom vizsgálata során referenciaként a legfrissebb humán mitochondriális referencia szekvenciát (Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) of the Human Mitochondrial DNA (NC_012920.1 gi:251831106)) használtuk. A heteroplazmia vizsgálata során 3%-os cut-off értéket alkalmaztunk.

A miRNS szekvenálás elemzése során az adapterek eltávolítása után a kapott szekvenciákat a miRBase online adatbázis (www.mirbase.org) adataira illesztettük. Az egyedi read számokat a minta teljes read számára normalizáltuk, majd ezt 10000-rel szoroztuk, így kaptuk meg az egyedi miRNS-ekhez tartozó normalizált read számokat. Az isomiR-ek elemzéséhez isomiR-SEA algoritmust használtuk.

Az eredmények elemzését és vizualizálását az R statisztikai programmal és a GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.) szoftverrel végeztük. Két csoport összehasonlításánál a Shapiro-Wilk normalitás teszt eredménye alapján Student féle T-próbát, párosított T-próbát, vagy Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk, a többszörös összehasonlításból eredő hiba korrekciójára Benjamini-Hochberg (BH) módszert használtunk. Több csoportban Shapiro-Wilk normalitás teszt eredményétől függően egyutas varianciaelemzést (Analysis of Variance, one-way ANOVA) követő Tukey-féle post-hoc teszttel vagy Kruskal-Wallis tesztet követő Dunn teszttel elemeztük. Minden elemzésnél $p < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

IV. Eredmények

IV.1. A hypophysis adenomák mitochondriális genomjának elemzése

A mitochondriális genom elemzéséhez összesen 12 GHPA és 33 NFPA szövetet használtunk fel, utóbbiak közül a szövettani vizsgálat alapján 22 FSH/LH+ és 11 HN adenomának bizonyult.

Az újgenerációs szekvenálás során mintánként átlagosan 52 399 (minimum: 24 019, maximum: 242 870) leolvasást (read-et) kaptunk. Az illesztés során a leolvasások 95±1%-a illeszkedett a humán mitochondriális genomra. A bázisonkénti átlagos lefedettség 630±370 (átlag±SE) read volt.

Összesen 496 egynukleotidos variánst (SNV-t) azonosítottunk legalább egy mintában, melyek közül 269 fehérjekódoló, 227 pedig nem-kódoló régióban helyezkedett el. A fehérjekódoló variánsok közül 136 nem-szinonim, 133 pedig szinonim változást okozott.

Eredményeinket a HmtDB adatbázisban (<http://www.hmtdb.uniba.it>) fellelhető egyetlen korábbi, GHPA mintákat is elemző vizsgálat adataival összevetve megállapítottuk, hogy az általunk azonosított 496 variáns közül 82 már ismert, 414 pedig teljesen új volt.

A detektált variánsok közül 482 mutatott legalább egy mintában valamilyen mértékű, általában alacsony heteroplazmiát. A különböző szövettani csoportok összehasonlítása alapján megállapítható, hogy a hormon negatív (HN) adenomák enyhén magasabb (8,27%) heteroplazmiát mutatnak, mint az FSH/LH+ (6,96%) és a GH termelő (6,72%) adenomák. Ez a különbség akkor is megmaradt, ha a kódoló és nem-kódoló variánsokat külön elemeztük. Nem találtunk különbséget az alacsony (<50%) és a magas (>50%) heteroplazmiát mutató minták tumorméretében és proliferációjában (Ki-67 index alapján).

Átlagosan mintánként 35 variánst azonosítottunk, amely hasonló volt a különböző szövettani csoportokban (GHPA: 33, FSH/LH+ adenoma: 34, HN adenoma: 40). Bár az előforduló variánsok száma nem mutatott korrelációt a proliferációval, megállapítottuk, hogy szövettani típustól függetlenül, a legtöbb variánst hordozó mintáknak volt a legmagasabb a Ki-67 proliferációs index-ük (GHPA: 8%, FSH/LH+ adenomák: 7-10%, HN adenomák: 5%).

A szövettani csoportokat összehasonlítva 143, 58, illetve 52 olyan variánst találtunk, amely kizárólag a FSH/LH+, a HN vagy a GH termelő adenomákban fordult elő, a másik kettőben egyáltalán nem.

Nyolc olyan variánst azonosítottunk, melyek eltérő gyakoriságot mutattak a különböző típusú adenomák között. Az A11251G, a T4216C, a T16126C, a C15452A, a T14798C, az A188G és a T16093C variánsok gyakorisága eltérő volt a GHPA és a HN adenomák között, míg a

T14798C, a G185A, az A188G és a T16093C variánsok gyakorisága az FSH/LH+ és a HN adenomákban különbözött. Ezek közül négy (G185A, A188G, T16093C és T16126C) a nem-kódoló D-loop régióban foglalt helyet. A másik négy, kódoló régióban elhelyezkedő variáns közül az A11251G szinonim változást okozott. Nem-szinonim variánsok voltak ezzel szemben a *CYB* génben elhelyezkedő T14798C és C15452A, és az *ND1* génben a T4216C. Ezek a variánsok rs28357681, rs527236209 és rs1599988 néven már ismertek voltak.

Egyetlen variáns gyakorisága sem mutatott összefüggést a tumor méretével vagy proliferációjával. Találtunk azonban egy olyan variánst (T16189C), amely a nem-recidív adenomák 40%-ában (6/15) előfordult, a recidív adenomákban viszont egyáltalán nem (0/11) ($p=0,021$).

Két, kódoló régióban elhelyezkedő, nem-szinonim változást okozó variánst (T14798C, T4216C) Sanger szekvenálással is megvizsgáltunk mind a 45 mintában, melynek során az újgenerációs szekvenálással kapott eredményeket 100%-ban sikerült megerősítenünk.

IV.2. Keringő miRNS biomarkerek keresése hypophysis adenomás betegekben

A keringő biomarkerek azonosításához hypophysis adenomával operált páciensek pre- és posztoperatív plazmamintáit vizsgáltuk újgenerációs szekvenálással, majd egyedi RT-qPCR-rel. Mintacsoportjaink elnevezésére a következő terminológiát követtük: GH termelő (GH+) csoport, FSH/LH+ csoport, HN csoport, amely azon betegek plazmamintáit jelöli, akiktől a nevezett szövettani típusú adenoma került eltávolításra. Kontrollként két egészséges önkéntestől származó plazmamintát használtunk (N, egészséges csoport).

Első lépésben 18 beteg (4 GH+, 10 FSH/LH+, 4 HN) pre- és késői posztoperatív plazmapárjainak, valamint 2 egészséges plazmamintának a miRNS profilját vizsgáltuk újgenerációs szekvenálással.

Mintánként átlagosan körülbelül 4 millió (4 001 268) read-et kaptunk, melyeket a miRBase adatbázisban (www.mirbase.org, miRBase v21) található ismert humán miRNS szekvenciákra illesztettük. Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a betegektől nyert preoperatív plazmamintákban kevesebb volt az annotált miRNS read, mint az egészségesekben ($1,3 \times 10^6$ vs. $2,3 \times 10^6$; $p=0,0392$). Összehasonlítottuk a különböző szövettani csoportba tartozó betegek preoperatív mintáit, és 29 olyan miRNS-t azonosítottunk, amely alapján elkülöníthetők a különböző csoportok.

Az újgenerációs szekvenálás – a korábban miRNS elemzésre használt módszerekkel ellentétben – lehetőséget nyújt a miRNS-ek különböző izoformáinak (isomiR-ek) azonosítására is. A plazmamintákban detektált miRNS-ek 46,2%-a isomiR szekvencia volt, az 53,8%-ban jelen levő, tökéletesen illeszkedő (egzakt) miRNS-ek mellett, amely jól mutatja az isomiR-ek jelentőségét. Ebből 40,6% 3p isomiR volt, az 5p és SNP isomiR-ek mindössze 1,6%-ot és 1,2%-ot képviseltek, míg 2,8% többféle variációt is tartalmazott.

A különböző csoportokba tartozó preoperatív minták összehasonlítása során 11 eltérő gyakoriságú isomiR-t azonosítottunk. Az 5p isomiR-eket tekintve a miR-140-3p gyakorisága szignifikánsan eltért a GH+ és az egészséges minták között. A miR-1-3p SNP isomiR-ek nagyobb mennyiségben fordultak elő a GH+, mint az FSH/LH+ és a HN plazmákban. Az egyik ilyen SNP isomiR csak a HN mintákban fordul elő, a többi csoportban egyáltalán nem. A miR-184 3p isomiR-ek gyakoriságában szignifikáns különbség mutatkozott a GH+ és HN csoportok között. Érdekes módon a miR-184 egyik ilyen variánsa csak a HN mintákban fordult elő. Ez a variáns a szekvencia 3' végén rövidebb, mint az egzakt miRNS, és két egyponos nukleotid variánst is hordoz. A HN mintákban ez a jellegzetes isomiR teszi ki a miR-184 isomiR-ek 48%-át.

Korábbi közlemények alapján az egészséges hypophysis és a hypophysis adenoma szövet miRNS-ekben igen gazdag, ezért arra is kíváncsiak voltunk, hogy a hypophysis adenoma és a normális hypophysis szövet között eltérően expresszálódó miRNS-ek megjelennek-e a keringésben.

Az elérhető irodalmi adatokat (NFPA: négy, GHPA: három tanulmány) és a saját szöveti eredményeinket (6 GHPA és 5 NH szövet) összevetettük a jelen munkám során plazmamintákban mért eredményekkel. A szöveti eredményekből kiválasztottuk azon miRNS-eket, amelyek legalább két vizsgálatban egyforma irányú expresszió változást mutattak. Az NFPA szövetekben 31, míg a GHPA szövetekben 7 ilyen miRNS volt. Megvizsgáltuk, hogy ezek szintje változik-e a pre- és posztoperatív mintapárokbán. A 31 miRNS közül 22 fordult elő a megfelelő (FSH+ és HN) plazmamintákban. Ezekből három (a miR-10b-5p, a miR-182-5p és a miR-26a-2-3p) miRNS változása ugyan olyan irányú volt az FSH/LH+ preoperatív mintákban posztoperatív párjaikhoz és az egészséges plazmákhoz képest, mint a tumoros szövetben az egészségesekhez képest. A GHPA szövetekben azonosított 7 miRNS közül 5 fordult elő a GH+ plazmamintákban, és közülük a miR-29b-3p, a miR-432-5p és a miR-503-5p esetében tapasztaltuk az említett, ugyanolyan irányú változást. Közös jellemzőjük ezeknek a

szövetben és plazmában egyező irányú változást mutató miRNS-nek, hogy a plazmában rendkívül alacsony mennyiségben voltak jelen.

Potenciális keringő miRNS biomarkerek azonosítása céljából megvizsgáltuk, hogy változik-e a betegek miRNS profilja a tumor eltávolítását követően. A GH+ mintákban 7, az FSH/LH+ csoportban 3, míg a HN csoportba tartozó plazmapárok esetében 66 olyan miRNS-t találtunk, amely szintje szignifikánsan eltért a pre- és késői posztoperatív mintapárokból ($p < 0,05$).

A validálás első lépéseként megvizsgáltuk, hogy az újgenerációs szekvenálással azonosított kevésbé abundáns miRNS-ek esetében melyek érik el azt a szintet, amelyek RT-qPCR-rel igazolhatók. A normalizált read számok alapján 3 csoportot különböztettünk meg: < 50 , $50-100$, és ≥ 100 . Az azonosított miRNS-ek megközelítőleg 75%-a tartozott az első csoportba, közel 8% a másodikba, és körülbelül 17% a legabundánsabbak közé. Ezutóbbiak közül 165 a GH+, 167 az FSH/LH+ és 170 a HN csoportban fordult elő, tehát a különböző mintacsoportok között ebben nem tapasztaltunk lényeges eltérést. A validáláshoz mindhárom csoportból választottunk ki miRNS-eket (GH+: miR-1304-3p, miR-144-5p, FSH/LH+: miR-6514-3p, miR-6850-5p, miR-6867-5p, HN: miR-4458). Azt tapasztaltuk, hogy a legkisebb tartományba (< 50 read) tartozó miRNS-ek RT-qPCR technikával nem voltak detektálhatóak.

Az újgenerációs szekvenálás alapján kiválasztott miRNS-eink közül az ennél nagyobb read számmal rendelkezők (GH+: miR-150-5p, FSH/LH+: miR-143-3p, HN: miR-26b-5p, miR-126-5p, miR-148b-3p) jelenlétét RT-qPCR technikával is sikerült megerősítenünk. A validálás során a korábbi mintaszettet további, független mintákkal is kiegészítettük. A vizsgált miRNS-ek közül a miR-143-3p szignifikánsan alacsonyabb szintjét tudtuk igazolni az FSH/LH+ késői posztoperatív mintákban a preoperatív párjaikhoz képest (párosított t-próba, $p = 0,0097$). Bár a többi vizsgált miRNS esetében is az újgenerációs szekvenáláshoz hasonló eredményeket kaptunk, ezen esetekben a RT-qPCR validálási eredményekben a változás nem volt szignifikáns ($p > 0,05$).

Megvizsgáltuk az FSH/LH+ csoportban szignifikáns változást mutató miR-143-3p szintjét a többi csoportban is, valamint kíváncsiak voltunk arra is, hogy a műtét után közvetlenül vett plazmában is csökken-e a miRNS szintje. Ezért a pre-, és késői posztoperatív minták mellett korai posztoperatív mintákat is elemeztünk. Ezen kívül olyan plazmamintákat is bevontunk a vizsgálatba, ahol az eltávolított adenomák a szövettani vizsgálat során az FSH/LH mellett más hormonra (PRL vagy TSH) is pozitívak voltak (plurihormonális adenomák).

A preoperatív minták összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy az FSH/LH+ mintákban magasabb a miR-143-3p szintje, mint a többi csoportban, amely azt jelenti, hogy a fenti miRNS vizsgálatával az FSH/LH+ betegek elkülöníthetők a más szövettani típusú adenomával rendelkező betegektől.

Megállapítottuk, hogy a GH+, a HN és a plurihormonális minták a tumor eltávolítása után nem csökken a miR-143-3p szintje, ami jelzi a miRNS csökkenésének specificitását a FSH/LH+ csoportra.

A korai posztoperatív mintákban a miR-143-3p szintje az FSH/LH+ csoportban sem változott szignifikánsan a preoperatív párjaikhoz képest, amely feltehetőleg annak köszönhető, hogy a miRNS-nek még nem volt ideje kiürülni a keringésből, és felhívja a figyelmet a mintavétel időpontjának fontosságára.

Az, hogy a miR-143-3p szintje magasabb az FSH/LH+ adenomával rendelkező betegekben, valamint az FSH/LH+ preoperatív plazmamintákban a késői posztoperatívakhoz képest, felveti biomarkerként való használhatóságának lehetőségét, ezért ROC (Receiver Operating Characteristic) analízist végeztünk. Ennek eredménye alapján a miR-143-3p 81,8%-os szenzitivitással és 72,7% specificitással képes elkülöníteni a pre-, és posztoperatív állapotot (AUC: 0,79, $p=0,024$; cut-off: $-dCT=-5,14$).

A keringő miRNS-ek gyakran extracelluláris vezikulákba (EV) csomagolva fordulnak elő a vérben. Irodalmi adatok alapján ezen vezikulák külön izolálása a plazmánál érzékenyebb forrás is lehet a miRNS biomarkerek elemzésére, ezért kíváncsiak voltunk arra, hogy azon miRNS-ek, melyek az újgenerációs szekvenálás során alacsony normalizált read számmal rendelkeztek, és feltehetően alacsony szintjük miatt RT-qPCR technikával plazmából nem voltak detektálhatók, az EV frakcióból esetlegesen kimutathatók-e.

Azt tapasztaltuk, hogy azok a miRNS-ek, amelyeket a validálás során teljes plazmából nem sikerült detektálnunk (GH+: miR-1304-3p, miR-144-5p, FSH/LH+: miR-6514-3p, miR-6850-5p, miR-6867-5p, HN: miR-4458), az exoszóma izolátumból sem voltak kimutathatóak. Ezzel összhangban, minden korábban észlelt miRNS az EV izolátumból is mérhető volt (GH+: miR-150-5p, FSH/LH+: miR-143-3p, HN: miR-26b-5p, miR-126-5p, miR-148b-3p), viszont a plazmában mért eredményekhez hasonlóan itt sem volt szignifikáns a különbség a pre-, és posztoperatív minták között. Érdekes módon, az EV frakcióban a miR-143-3p változása sem volt szignifikáns az FSH/LH+ mintákban. Ez arra utalhat, hogy a miR-143-3p változása első

sorban nem az EV-asszociált, hanem a más formában (például fehérjéhez kapcsoltnak) jelenlevő miRNS-eket érinti.

IV.3. Új terápiás lehetőségek keresése hypophysis adenomákban

A TLDA kártyával mért adatok alapján a TRAIL csökkent expressziót mutatott az NFPA (n=29) szövetekben a NH (n=10) szövetekhez képest, míg a GHPA (n=12) szövetekben ez a változás nem volt szignifikáns. A survivin mutatta a legerősebb expresszió emelkedést, amely az NFPA és a GHPA szövetekben is szignifikáns volt, ám immunhisztokémiai módszerrel tovább vizsgálva ez csak az NFPA szövetekben volt szignifikáns. Ezen felül megállapítottuk, hogy a survivin fehérje mind a NH mind az adenomás szövetekben a sejtmagban lokalizálódott, valamint, hogy a survivin mRNS és fehérje szinten sem korrelált a tumorok méretével, vagy proliferációjával (Ki-67 index).

In vitro vizsgálataink során megállapítottuk, hogy az RC-4 B/C és GH3 hypophysis adenoma sejtek rezisztensek a humán rekombináns TRAIL kezelésre, és ezt a rezisztenciát az acetil-szalicilsav (ASA) előkezelés sem írja felül.

Kimutattuk, hogy az ASA idő- és dózisfüggő módon képes csökkenteni az RC-4 B/C sejtek proliferációját, míg a GH3 sejtekre nincs hatással, így további vizsgálataink során az előbbi sejtvonalra koncentráltunk. Megvizsgáltuk, hogy mi állhat az antiproliferatív hatás hátterében, és azt találtuk, hogy az élő sejtek száma csökken, miközben a halott sejtek száma nem növekszik, és az apoptózis nem indukálódik. Az áramlási citometriával való sejtciklus elemzés alapján az S fázisban lévő sejtek száma csökkent, míg a G2/M fázisban lévő sejtek aránya növekedett, vagyis a proliferációs csökkenés hátterében a sejtciklus gátlása állhat. Ez a hatás szintén dózisfüggőnek mutatkozott.

Emellett azt is kimutattuk, hogy az ASA kezelés csökkenti a survivin expresszióját mind mRNS mind fehérje szinten. Mivel ismert, hogy a survivin fontos szerepet játszik az apoptózis és sejtciklus szabályozásában, ezért megvizsgáltuk, hogy az ASA antiproliferatív hatása a survivin gátlásán keresztül valósulhat-e meg. Ennek érdekében az YM155 kis molekula inhibitorral és kétféle siRNS-sel specifikusan gátoltuk a survivint és megvizsgáltuk, hogy ennek hatása mennyire hasonlít az ASA hatására.

Igazoltuk, hogy mind az YM155, mind a survivin siRNS-ek általi survivin gátlás az ASA hatásához hasonlóan, az apoptózis indukálása nélkül csökkentette az élő sejtszámot hypophysis adenoma sejteken. A sejtciklus vizsgálat során azonban azt tapasztaltuk, hogy bár az ASA-hoz hasonlóan a specifikus survivin gátlás növelte a G2/M fázisban lévő sejtek arányát, az S

fázisban lévő sejtek aránya nem csökkent. Ez arra utal, hogy az ASA-nak van a survivin gátlásától független hatása is a sejtciklusra.

Ennek további vizsgálata érdekében megvizsgáltuk az ASA hatását az S fázisban és annak átmeneteiben résztvevő ciklin A2 (CCNA2) és CDK2 molekulákra. Azt tapasztaltuk, hogy az ASA csökkentette ezen molekulák expresszióját mRNA és fehérje szinten is. Emellett szintén csökkentette a foszfo-CDK2 kifejeződését, miközben a CDK2/p-CDK2 arány nem változott, vagyis az ASA a CDK2 foszforilációs állapotát nem befolyásolja. Mindezek alapján az expresszió gátlása feltehetőleg transzkripció szinten valósul meg. Kimutattuk azt is, hogy az YM155 és az siRNS általi survivin gátlás nem csökkentette ezen molekulák expresszióját, amely alátámasztja, hogy ez valóban az ASA, survivin gátlástól független hatása a sejtciklusra.

A survivin proliferációra gyakorolt hatását tovább vizsgálva plazmid transzfekcióval túlexpresszáztunk a survivint a hypophysis adenoma sejtekben. Megállapítottuk, hogy ennek nincs hatása a sejtek proliferációjára, vagyis a magas survivin expresszió további erősítése nem növeli tovább a hypophysis adenoma sejtek proliferációs aktivitását.

Az *in vitro* eredményeink *in vivo* igazolásához nem állt rendelkezésre gonadotroph hypophysis sejtekből képzett xenograft modell, ezért ennek létrehozását is célul tűztük ki.

Kombinált immunhiányos (SCID) egerek bőre alá RC-4 B/C sejtuszuspenziót injektáltunk, és a tumorok megjelenését hetente ellenőriztük. Mivel semmilyen korábbi vizsgálatra nem támaszkodhattunk, többféle kondíciót (mátrigél nélkül, mátrigéllal keverve) és sejtszámot (5×10^6 , 10^7 , 2×10^7) próbáltunk ki, ám sajnos egyik esetben sem sikerült az egerekben tumorformálódást előidézniük. Bár a 2×10^7 sejt esetében egy héttel az injektálás után egy apró (méréshatár alatti, de körülbelül 2,5 mm) képlet volt tapintható, ez a következő héten a felére zsugorodott, majd a harmadik hét végére teljesen felszívódott.

Az RC-4 B/C sejttel ellentétben a GH3 hypophysis adenoma sejtvonalból létrehozott xenograft modelltől már rendelkezésre álltak szakirodalmi adatok, így pozitív kontrollként egy egérbe 10^7 GH3 sejtet tartalmazó, szintén matrigéllal kevert sejtuszuspenziót injektáltunk. Az állatban egy hét után már 4,5 mm-es tumor jelent meg, amely a következő héten közel a duplájára nőtt, a harmadik hét végén pedig etikai megfontolásból le is kellett ölni az állatot.

V. Következtetések

1. Újgenerációs szekvenálás segítségével elsőként elemeztük a különböző típusú hypophysis adenomák teljes mitochondriális genomját. 414 új mitochondriális variánst sikerült azonosítanunk, melyek közül nyolc összefüggést mutatott a daganat szövettani típusával, egy pedig csak a nem recidív adenomákban fordult elő, a recidívákból teljesen hiányzott, amely jelzi ezen variáns lehetséges szerepét a kevésbé agresszív viselkedés kialakításában. Eredményeink alapján a mitochondriális genomban bekövetkező változások nem elsődleges tényezői a hypophysis adenomák kialakulásának.
2. Az általunk használt újgenerációs szekvenálás alapú módszer hatékonyan és megbízhatóan alkalmazható a mitochondriális variánsok azonosítására.
3. Elsőként vizsgáltuk a hypophysis adenomás betegek keringő miRNS és isomiR profilját. Megállapítottuk, hogy a betegek plazmájában összességében kevesebb miRNS fordul elő, mint az egészséges mintákban. Kimutattuk, hogy az azonosított miRNS-ek megközelítőleg 46%-a isomiR szekvencia volt, amely felhívja a figyelmet ezek jelentőségére. Igazoltuk, hogy a miRNS és az isomiR profil egyaránt alkalmas a különböző csoportba tartozó hypophysis adenomával rendelkező betegek és az egészségesek plazmamintáinak elkülönítésére.
4. Az újgenerációs szekvenálással való miRNS profilozás egy érzékeny mérés. A miRNS-ek mennyiségi meghatározásához az eredményeket mindig validálnunk kell, amihez aranystandardként a RT-qPCR technikát használjuk. Kimutattuk, hogy a nagyon kis mennyiségben (<50 read) jelen lévő miRNS-ek – bár újgenerációs szekvenálással detektálhatók – PCR alapú technikával nem erősíthetők meg, így – egyelőre – biomarkerként sem alkalmazhatók.
5. A preoperatív és posztoperatív plazmapárok miRNS profiljának összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a miR-143-3p potenciális biomarkere a klinikailag nem-funkcionáló, FSH/LH+ hypophysis adenomáknak.
6. *In vitro* hypophysis adenoma sejteken kimutattuk, hogy az acetil-szalicilsav kezelés az apoptózis indukálása nélkül, a sejtciklus gátlásán keresztül csökkenti a sejtek életképességét. Megállapítottuk, hogy az antiproliferatív hatás hátterében részben a survivin, részben pedig a ciklin A2 és CDK2 molekulák transzkripcionális gátlása állhat. Vizsgáltuk továbbá az YM155 survivin inhibitor hatását ugyanezen sejteken, és megállapítottuk, hogy mind az acetil-szalicilsav, mind az YM155 ígéretes tumorelleses terápiás szer lehet nem-funkcionáló hypophysis adenomák esetén.

VI. A disszertáció témájához kötődő saját publikációk jegyzéke

Németh K, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, Szabó B, Barna G, Karászi K, Igaz P, Zivkovic V, Korbonits M, Patócs A, Butz H. (2018) Survivin as a potential therapeutic target of acetylsalicylic acid in pituitary adenomas. *Oncotarget* 9: 29180–29192.

Németh K, Darvasi O, Likó I, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, Szabó B, Kurucz PA, Krokker L, Igaz P, Patócs A, Butz H. (2019) Next-generation sequencing identifies novel mitochondrial variants in pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest* 42: 931-940.

Németh K, Darvasi O, Likó I, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, Szabó B, Krokker L, Pállinger É, Igaz P, Patócs A, Butz H. (2019) Comprehensive analysis of circulating microRNAs in plasma of patients with pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 104: 4151-4168.

Németh K, Darvasi O, Szücs N, Czirják S, Butz H. (2018) [The role of miRNAs in the pathogenesis of pituitary adenomas]. *Orv Hetil* 159: 252–259.

VII. A disszertáció témájától független saját publikációk jegyzéke

Butz H, **Németh K**, Rácz K, Patócs A. (2016) Circulating miRNAs as biomarkers for endocrine disorders. *J Endocrinol Invest* 39: 1–10.

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

Darvasi O, Szabó PM, **Németh K**, Szabó K, Spisák S, Likó I, Czirják S, Rácz K, Igaz P, Patócs A, Butz H. (2017) Limitations of high throughput methods for miRNA expression profiles in non-functioning pituitary adenomas. *Pathol Oncol Res* 25: 169-182.

Grolmusz VK, Borka K, Kövesdi A, **Németh K**, Balogh K, Dékány C, Kiss A, Szentpéteri A, Sármán B, Somogyi A, Csajbók É, Valkusz Z, Tóth M, Igaz P, Rácz K, Patócs A. (2017) MEN1 mutations and potentially MEN1-targeting miRNAs are responsible for menin deficiency in sporadic and MEN-1 syndrome associated primary hyperparathyroidism. *Virchows Arch* 471: 401-411.

Butz H, **Németh K**, Czenke D, Likó I, Czirják S, Zivkovic V, Baghy K, Korbonits M, Kovalszky I, Igaz P, Rácz K, Patócs A. (2017) Systematic Investigation of Expression of G2/M Transition Genes Reveals CDC25 Alteration in Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *Pathol Oncol Res* 23: 633–641.