

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2802.**

**AG-SZABÓ BORBÁLA**

**Hormonális szabályozó mechanizmusok**  
című program

Programvezető: Dr. Igaz Péter, egyetemi tanár  
Témavezető: Dr. Butz Henriett, osztályvezető főorvos

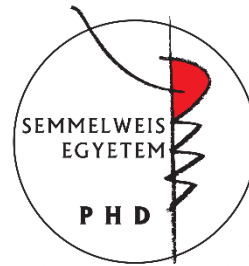
# **A DNS metiláció/demetiláció státusz jelentőségének vizsgálata hypophysis neuroendokrin daganatokban**

Doktori Értekezés

**Ag-Szabó Borbála**

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Butz Henriett Ph.D., osztályvezető főorvos

Hivatalos bírálók: Dr. Orbán Tamás Ph.D., tudományos főmunkatárs  
Dr. Uhlyarik Andrea Ph.D., klinikai főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Sótonyi Péter, D.Sc., Ph.D., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Nagy Géza, D.Sc., Ph.D., egyetemi adjunktus  
Dr. Ponyi Péter Ph.D., szakmai igazgató

Budapest

2022

**TARTALOMJEGYZÉK**

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>5</b>
<b>I. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR).....</b>	<b>14</b>
I. 1. Epigenetikai szabályozás .....	14
I. 1. 1. A DNS metilációja és mérési technikák .....	14
I. 1. 2. Hisztonok szerepe a génexpresszió szabályozásában .....	19
I. 1. 3. Epigenetikai eltérések, mint terápiás célpontok .....	20
I. 1. 3. 1. <i>Decitabin</i> .....	21
I. 1. 3. 2. <i>Aszpirin</i> .....	22
I. 2. Hypophysis neuroendokrin daganatok .....	23
I. 2. 1. Hypophysis daganatok pathomechanizmusa .....	24
I. 2. 2. Familiáris megjelenésű hypophysis neuroendokrin daganatok genetikai háttere .....	27
I. 2. 3. Szomatikus genetikai eltérések hypophysis neuroendokrin daganatokban	30
I. 2. 4. Epigenetikai változások hypophysis neuroendokrin daganatokban .....	31
I. 2. 4. 1. <i>DNS metilációs eltérések</i> .....	32
I. 2. 4. 2. <i>Hiszton módosulások szerepe a hypophysis tumorigenezisben</i> .....	34
<b>II. CÉLKITŰZÉSEK.....</b>	<b>36</b>
<b>III. MÓDSZEREK.....</b>	<b>37</b>
III. 1. Betegminták.....	37
III. 2. Nukleinsav izolálás.....	40
III. 2. 1. Dezoxiribonukleinsav (DNS) izolálás .....	40
III. 2. 2. Ribonukleinsav (RNS) izolálás.....	41
III. 3. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai - tandem tömegspektrometria.....	41
III. 3. 1. Standardok és reagensek.....	41
III. 3. 2. Mintaelőkészítés .....	42
III. 3. 3. Nagy nyomású folyadékkromatográfia tandem tömegspektrométerrel.....	42
III. 4. Transzkriptom szekvenálás.....	42
III. 5. Individuális génexpressziós vizsgálatok.....	43
III. 6. Immunhisztológiai vizsgálatok.....	43
III. 7. Fehérje extrakció és mennyiségi vizsgálat Western blot technikával .....	45

III. 8.	<i>In vitro</i> sejttenyészetek .....	46
III. 8. 1.	Sejttenyészetek.....	46
III. 8. 2.	<i>In vitro</i> farmakológiai kezelések és transzfecciók.....	46
III. 8. 2. 1.	<i>Decitabin</i> kezelés.....	47
III. 8. 2. 2.	<i>Aszpirin</i> kezelés .....	47
III. 8. 2. 3.	<i>Plazmid</i> transzfecció.....	47
III. 8. 3.	Életképességi vizsgálatok .....	48
III. 8. 4.	Migrációs teszt.....	48
III. 8. 5.	Áramlási citometria mérések .....	49
III. 8. 5. 1.	<i>Sejtciklus</i> elemzés .....	49
III. 8. 5. 2.	<i>Ki-67</i> fehérje vizsgálat.....	49
III. 9.	Statisztikai elemzés.....	50
<b>IV.</b>	<b>EREDMÉNYEK .....</b>	<b>51</b>
IV. 1.	Hypophysis neuroendokrin daganatok vizsgálata .....	51
IV. 1. 1.	DNS metilációs/demetilációs státusz.....	51
IV. 1. 2.	A DNS metilációs/demetilációs státuszát kialakító enzimek hypophysis adenomákban .....	53
IV. 2.	Hypophysis neuroendokrin daganatos betegek vér mintáinak metilációs profilja .....	55
IV. 3.	<i>In vitro</i> decitabin kezelés .....	56
IV. 4.	<i>In vitro</i> aszpirin kezelés.....	57
IV. 4. 1.	DNS metilációs/demetilációs státusza .....	57
IV. 4. 2.	A metilációs profil kialakításában fontos enzimek génkifejeződése .....	57
IV. 4. 3.	Transzkriptom analízis.....	59
IV. 4. 4.	<i>In vitro</i> funkcionális vizsgálatok.....	63
IV. 4. 5.	Az aszpirin transzkripció faktorokon keresztüli hatása.....	64
IV. 4. 6.	Az aszpirin és a demetilációs státusz hatása a Pttg1 génexpressziójára .....	67
IV. 4. 7.	Aszpirin által szabályozott gének diszregulációja PitNET mintákban .....	69
<b>V.</b>	<b>MEGBESZÉLÉS.....</b>	<b>70</b>
V. 1.	Hypophysis neuroendokrin daganatok metilációs/demetilációs státusza .....	70
V. 2.	<i>In vitro</i> decitabin kezelés .....	73
V. 3.	<i>In vitro</i> aszpirin kezelés .....	73

<b>VI.</b>	<b>KÖVETKEZTETÉS.....</b>	<b>78</b>
<b>VII.</b>	<b>ÖSSZEFOGLALÁS.....</b>	<b>80</b>
<b>VIII.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>81</b>
<b>IX.</b>	<b>IRODALMI JEGYZÉK .....</b>	<b>82</b>
<b>X.</b>	<b>SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>103</b>
X. 1.	A doktori értekezéshez felhasznált saját publikációk jegyzéke.....	103
X. 2.	Az értekezés témájához nem kapcsolódó publikációk jegyzéke .....	103
<b>XI.</b>	<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>104</b>
<b>XII.</b>	<b>MELLÉKLETEK .....</b>	<b>106</b>
XII. 1.	Leukocyta frakció DNS metilációs/demetilációs vizsgálatának eredményei ..	106

## **RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

3PA: 3P (Pheochromocytoma/Paraganglioma és hypophysis (pituitary)) asszociáció

5caC: 5-karboxicitozin

5fC: 5-formilcitozin

5hmC: 5-hidroximetilcitozin

5mC: 5-metilcitozin

ACTH: adrenocorticotrop hormon

ADD: ATRX-DNMT3-DNMT3L domén

AIP: aril hidrokarbon receptor-kölcsönható fehérje (Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein)

AKT1/2: protein kináz B  $\alpha$  1/2 (Protein Kinase B  $\alpha$  1/2)

ASA: acetyl-szalicilsav

AURK A: aurora kináz A (Aurora Kinase A)

AURK B: aurora kináz B (Aurora Kinase B)

BAD: Bcl2 Associated Agonist of Cell Death

BAG1: BAG ko-chaperon 1 (BAG Co-chaperone 1)

BER: bázis kivágásos hibajavítás

BIRC5: bakulovirális apoptózis fehérje inhibitor 5 (Baculoviral IAP (inhibitor of apoptosis proteins) Repeat Containing 5)

BMP4: Csont morfogén fehérje 4 (Bone Morphogenetic Protein 4)

BRAF: B-Raf protoonkogén (B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase)

BRCA1: emlő és petefészek daganat hajlamosító fehérje 1 (Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Protein 1)

CADM1: sejt adhéziós molekula 1 (Cell Adhesion Molecule 1)

cAMP: ciklikus adenozin monofoszfát

CASP8: Caspase 8

CCNA2: ciklin A2 (Cyclin A2)

CCNB1: ciklin B1 (Cyclin B1)

CCNB2: ciklin B2 (Cyclin B2)

CCND1: ciklin D1 (Cyclin D1)

CCNE: ciklin E (Cyclin E)

CDC45: sejtosztódási ciklus 45 (Cell Division cycle 45)

CDH1: kadherin 1 (Cadherin 1)

CDK: ciklin dependens kinázok (Cyclin Dependent Kinases)

CDK1: ciklin dependens kináz 1 (Cyclin Dependent Kinase 1)

CDK2: ciklin dependens kináz 2 (Cyclin Dependent Kinase 2)

CDK3: ciklin dependens kináz 3 (Cyclin Dependent Kinase 3)

CDK4: ciklin dependens kináz 4 (Cyclin Dependent Kinase 4)

CDKi: ciklin dependens kináz inhibitorok (Cyclin Dependent Kinase Inhibitors)

CDKN1A: ciklin dependens kináz inhibitor 1A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A)

CDKN1B: ciklin dependens kináz inhibitor 1B (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B)

CDKN2A: ciklin dependens kináz inhibitor 2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A)

CDKN2C: ciklin dependens kináz inhibitor 2C (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C)

CDKN2D: ciklin dependens kináz 2D (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2D)

cfDNS: sejten kívüli, keringő („cell-free”) DNS frakció

CGI: CpG szigetek - magas CG (citozin-guanin) dinukleotid arányú (>55%) DNS szakasz

CHEK2: Ellenőrző pont kináz 2 (Checkpoint Kinase 2)

CIMP: metilált CpG sziget fenotípus

CNC: Carney-komplex

CNKS1: Ras1 kináz szupresszor enhancer régió (Connector Enhancer of Kinase Suppressor of Ras1)

COX: ciklooxigenáz

CpG: citozin - foszfodiészter kötés - guanin

CXXC4 (IDAX): CXXC Finger Protein 4

DAPK1: Sejthalál asszociált fehérje kináz 1 (Death Associated Protein Kinase 1)

DICER1: Dicer 1 specifikus kétszálú RNS endoribonukleáz (Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease)

DMAP1: DNS metiltransferáz asszociált fehérje 1 (DNA Methyltransferase 1 Associated Protein 1)

DMSO: dimetil-szulfoxid

DNMT: Dezoxiribonukleinsav (DNS) metiltransferáz

DSBH: kettős szálú  $\beta$ -hélix domén

EGFR: epidermális növekedési faktor receptor (Epidermal Growth Factor Receptor)

EP300: p300 fehérje E1A kötőfehérjéje (E1A Binding Protein p300)

ER: ösztrogén receptor (Estrogen Receptor)

FDR: false discovery rate, hamis felfedezési arány

FFPE: formalin fixált, paraffinba ágyazott minták

FGFR2: fibroblaszt növekedési faktor receptor 2 (Fibroblast Growth Factor Receptor 2)



FIPA: familiárisan izolált hypophysis adenoma

FLT1: FMS (FMS Related Receptor Tyrosine Kinase 1)

FOXD3: Forkhead Box D3

FSH: follikuluszstimuláló hormon

FSHB: follikuluszstimuláló hormon  $\beta$  alegység (Follicle Stimulating Hormone Subunit  $\beta$ )

GADD45 $\alpha$ : növekedést gátló DNS károsodás indukált fehérje 45 $\alpha$  (Growth arrest and DNA Damage Inducible 45 $\alpha$ )

GADD45 $\gamma$ : növekedést gátló DNS károsodás indukált fehérje 45  $\gamma$  (Growth arrest and DNA Damage Inducible 45 $\gamma$ )

GAPDH: glicerin-aldehid-3-foszfát dehidrogenáz

GATA5: GATA kötő fehérje 5 (GATA Binding Protein 5)

GH: növekedési hormon

GH1: növekedési hormon 1 (Growth Hormone 1)

GH2: növekedési hormon 2 (Growth Hormone 2)

GHRHR: növekedési hormon felszabadító hormon receptor (Growth Hormone Releasing Hormone Receptor)

GNAS1: G $\alpha$  protein  $\alpha$  alegységét kódoló gén (G $\alpha$  Protein  $\alpha$  Subunit)

GPR101: G fehérje kapcsolt receptor 101 (G Protein-Coupled Receptor 101)

GSK-3: Glycogene Synthase Kinase 3

H2AX: H2A.X hiszton variáns (H2A.X Variant Histone)

H3K9ac: 3-as hiszton 9-es lizinjének acetilációja

HAT: hiszton acetil transzferáz

HDAC: hiszton deacetiláz

HDM: hiszton demetiláz

HEPES: 4-(2-hidroxietyl) -1-piperazinetánszulfonsav

HMGA2: nagy mobilitású AT hurok 2 (High Mobility Group AT Hook 2)

HMT: hiszton metiltranszferáz

HPLC-MS/MS: nagy nyomású folyadékkromatográfia tandem tömegspektrométer

IDH: izocitrát dehidrogenáz (Isocitrate Dehydrogenase) (NADP (+))

IGF-1: inzulszerű növekedési faktor 1 (Insuline Like Growth Factor 1)

ITPKB: inozitol-trifoszfát 3-kináz B (Inositol- Triphosphate 3-Kinase B)

KCNAB2: feszültségfüggő káliumion csatorna A alcsalád,  $\beta$  szabályozó 2-es alegységet kódoló gén (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Regulatory  $\beta$  Subunit 2)

Ki-67: Ki-67 proliferációs marker fehérje (Marker of Proliferation Ki-67)

KLLN: killin, p53 szabályozott DNS replikációs gátló (Killin, p53 Regulated DNA Replication Inhibitor)

LH: luteinizáló hormon

LHB: luteinizáló hormon  $\beta$  alegység (Luteinizing Hormone Subunit  $\beta$ )

MAD2L1: mitózist gátló fehérje szerű gén 2 (Mitotic Arrest Deficient 2 Like 1)

MAGEA3: melanoma asszociált antigén család A3 tagját kódoló gén (MAGE (Melanoma Associated Antigene) family member A3)

MAPK: MAP kináz (Mitogen-Activated Protein Kinase 1)

MAX: myc asszociált faktor X (Myc Associated Factor X)

MCM4: minikromoszóma fenttartó komplex komponens 4 (Minichromosome Maintenance Complex Component 4)

MEG3: maternálisan kifejeződő gén 3 (Maternally Expressed Gene 3)

MEN: menin 1 (Menin 1)

MEN1: 1-es típusú multiplex endokrin neoplázia

MEN2: 2-es típusú multiplex endokrin neoplázia

MEN4: 4-es típusú multiplex endokrin neoplázia

mRNS: hírvivő RNS (messenger RNS)

MSH6: MutS homológ 6 (MutS Homolog 6)

mTOR: Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase)

MYC-N: Myc proto-onkogén (MYCN Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor)

NC: null-sejtes ('null cell') hypophysis neuroendokrin daganat

NF: nem funkcionáló hypophysis neuroendokrin daganat

NF1: neurofibróma 1

NSAID: NonSteroidal Anti-Inflammatory Drug

PAD: peptidil arginin deimináz

PAX5: Paired Box 5

PBS: Phosphate-buffered Saline, foszfát puffer

PCNA: sejtosztódást jelző nukeláris antigén (Proliferating Cell Nuclear Antigen)

PCR: polimeráz láncreakció

PIT-1: Hypophysis specifikus POU-csoport homeodomén transzkripció faktor 1 (Pituitary-Specific POU-Class Homeodomain Transcription Factor 1)

PitNET: hypophysis neuroendokrindaganat

POMC: Proopiomelanocortin

PRKAR1A: protein kináz A 1  $\alpha$  alegység (Protein Kinase cAMP Dependent Type I Regulatory Subunit  $\alpha$ )

PRL: prolaktin

PRLR: prolaktin receptor (Prolactin Receptor)

PTAG: Pituitary Tumor Apoptosis Gene

PTTG1: Pituitary Tumor Transforming Gene 1

PTTG1IP: PTTG1 interakciós fehérje (Pituitary Tumor Transforming Gene 1 Interacting Protein)

PVDF: polivinilidén difluorid

RAP1: Ras onkogén 1-es család tagja (Member of Ras Oncogene Family 1)

RASSF1A: Ras asszociált domén család 1A (Ras Association Domain Family Member 1)

RB1: Retinoblasztoma 1

RBX1: RING-BOX 1

RET: Ret Proto-oncogene

RFTS: replikációs fókusz felismerő szekvencia

RIZ1 (PRDM2): PR/SET Domain 2

RT-qPCR: valós idejű, kvantitatív polimerizációs láncreakció

SAM: S-adenozil-metionin

SDH.X: szukcinát dehidrogenáz komplex X alegység (Succinate Dehydrogenase Complex Subunit X)

SF-1: szteroidogén faktor 1 (Steroidogenic Factor 1)

SIRT1: szirtuin (Sirtuin 1 (NAD-Dependent Protein Deacetylase))

SLIT3: Slit Ligand 3 (Slit guidance Ligand 3)

SMC4: 4-es kromoszóma struktúra fehérjéje (Structural Maintenance Of Chromosomes 4)

SOCS1: citokin szignalizáció supresszor 1 (Supressor of Cytokine Signaling 1)

SOCS2: citokin szignalizáció supresszor 2 (Supressor of Cytokine Signaling 2)

SSTR2: szomatosztatin receptor 2 (Somatostatin Receptor 2)

TDG: timin-dezoxiribinukleinsav (DNS) glikoziláz

TET 1-3: 10 -11-es kromoszóma transzlokáz metilcitozin-dioxigenáz 1-3 (Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 1-3)

TP53: tumor fehérje 53 (Tumor Protein 53)

T-PIT: T-box család TBX19 tagja (T-box family member TBX19)

TSC1: szklerózis tuberóza 1-es fehérje (Tuberous Sclerosis 1 Protein)

TSH: pajzsmirigy stimuláló hormon

t-SNE: t-eloszlású sztohasztikus szomszéd analízis (t-distributed stochastic neighbor embedding)

UBE2C: ubikvitin konjugált enzim E2 C (Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 C)

UHRF1: ubikvitin szerű fehérje PHD és RING Finger doménekkal 1 (Ubiquitin Like With PHD and Ring Finger Domains 1)

UHRF2: ubikvitin szerű fehérje PHD és RING Finger doménekkal (Ubiquitin Like With PHD and Ring Finger Domains 2)

USP48: ubikvitin specifikus peptidáz 48 (Ubiquitin Specific Peptidase 48)

USP8: Ubiquitin specifikus peptidáz 8 (Ubiquitin Specific Peptidase 8)

VEGF: vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

VHL: Von Hippel-Lindau tumorszupresszor (Von Hippel-Lindau Tumor Supressor)

WGBS: teljes genomi biszulfid konverziós szekvenálás

X-LAG: X kromoszómához kötött akrogigantizmus

## **I. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR)**

### **I. 1. Epigenetikai szabályozás**

Az epigenetikai szabályozás felelős a genetikai információ kifejeződéséért. A sejt génextpressziós profiljának kialakításával meghatározza a sejt differenciálódását és működését. Epigenetikai szabályozások közé tartoznak a dezoxiribonukleinsav (DNS) metilációjával vagy poszttranszlációs hiszton módosulásokkal történő kromatin átrendeződés, a gén imprinting mechanizmusa és a kis, nem kódoló ribonukleinsav (RNS) molekulák általi génextpresszió szabályozás [1].

A módosító folyamatokat katalizáló enzimek, három nagy csoportot alkotnak. Az 'írók' (writers), melyek a módosításokat hozzák létre, az 'olvasók' (readers), amik ezeket specifikusan felismerik, és értelmezik azt a sejt működési szintjén, végül a 'törlők' (erasers), amik a kémiai módosítások helyett az eredeti állapotot állítják helyre [2].

#### **I. 1. 1. A DNS metilációja és mérési technikák**

A DNS metiláció mechanizmusán alapulnak olyan alapvető biológiai folyamatok, mint az X kromoszóma inaktiváció, a gén imprinting, de a mitózishoz szükséges nukleoszóma struktúra kialakulásának is ez az egyik alapja. Emellett nagymértékben változik a DNS metilációjának mennyisége a sejt kóros folyamatainál, például daganatos megbetegedésekben, vagy az öregedés során [3, 4].

A DNS metilációt emlősök esetében a citozin nukleotidok ötös szénatomjának metil szubsztitúciója jelenti, ahol metildonorként S-adenozilmetionin (SAM) szerepel [5]. Az 5-metilcitozin (5mC) a teljes genom citozin mennyiségének átlagosan 5%-át teszi ki. Ezek egyrészt magas citozin-guanin (CpG) arányú (>55%) szakaszokon, az 5' szabályozó régiókban található úgy nevezett CpG szigeteken (CGI), másrészt a gén kódoló régiójában helyezkednek el. Mindkét régió fokozott metilációja transzkripcionális represszióhoz vezet [6]. Emlősök esetében a CGI régiók 70-80%-a metilált és körülbelül 21%-a változik dinamikusan a sejt típusától és funkciójától függően. A metilációval megváltozik a DNS térszerkezete, ezáltal allosztérikusan gátolja az enzimeket, és az aktív transzkripció faktorokat [4, 7–10].

A DNS metilációjának kialakításában az 'író' funkciót a DNMT (DNA methyltransferase) enzimes család tölti be. Emberben a DNMT1, DNMT3A és DNMT3B fehérjék végzik a DNS metilációt, míg a szintén ebbe a családba tartozó DNMT2 és DNMT3L fehérjék DNS metiláz aktivitással nem rendelkeznek [11, 12].

A DNMT1 a sejtosztódás során a szemikonzervatív replikációt követően aktív. A hemimetilált DNS-hez kötve a metilációs mintázat másolásával a sejtmemória fenntartásáért felelős. Az enzimes családra jellemző szabályozó (N terminális), és katalitikus (C terminális) régióján kívül a DNMT1 fehérjében kódolt a genomhoz való kötődést biztosító PWWP (Pro-Trp-Trp-Pro) domén, a replikációs origóhoz való kötődést segítő RFTS (replikációs fókusz felismerő szekvencia), míg a nem metilált régiókhoz való kötést a CXXC cink-ujj domén biztosítja. Emellett egyéb fehérje-fehérje interakciót biztosító domének találhatók még a fehérjén (pl: DMAP1 (DNA Methyltransferase 1 Associated Protein 1) transzkripció represszor, hiszton deacetiláz 2) [11, 13].

A SAM mellett a DNMT1 fontos kofaktora az UHRF1 (Ubiquitin Like With PHD and Ring Finger Domains 1), amely a DNS molekulához való kötésért, a hemimetilált régiók felismeréséért felelős. A kofaktor hiánya a genom 5mC mennyiségének csökkenéséhez vezet [14, 15].

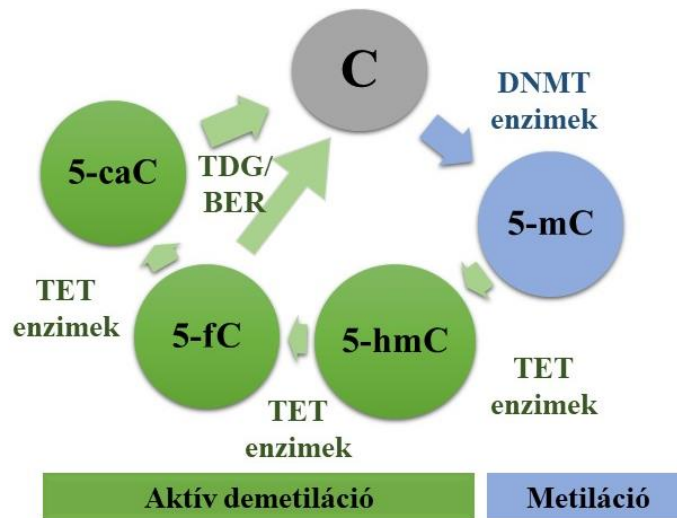
A DNMT3A és DNMT3B *de novo* metilációért felelős fehérjék aktivitása általános, nem CGI szelektív, és az egyedi metilációs mintázat kialakítását biztosítják. A már ismertetett PWWP és katalitikus domének mellett az ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) domént tartalmazza, ami a DNMT3-kromatin és DNMT3-3-as hiszton fehérje interakciókat biztosítja. A DNMT3L a katalitikus domén egy részét, és az ADD doméneket hordozza, a DNMT3A fehérjével annak kofaktoraként heterotetramert alkotva növeli aktivitását [13, 16].

A DNMT enzimek aktivitása poszttranszlációs szinten szabályozott. Például a DNMT1 142-es vagy 1094-es pozíciójú lizinjének demetilációja a fehérje degradációját segíti elő. A 143-as szerin foszforilációja gátolja a 142-es lizin metilációját így gátolva a degradációt. A DNMT3A 386 és 389-es szerinjének foszforilációja a heterokromatinhoz való kötést és



annak metilációját segíti elő. A genom fokozott metilációja elleni védelem része az enzim allosztérikus gátláson keresztüli autoinhibíciója [13].

A DNS metilációja dinamikusan változik, a sejtciklus és a sejt differenciálódás során. A demetiláció aktív vagy passzív módon is történhet. Passzív módon az 5mC amino csoportját elvesztve timinné alakul, amit a DNS hibajavító enzimek, a timin-DNS glikoziláz (TDG) és báziskivágásos hibajavítás (BER) eliminálnak. Az aktív, enzimatis demetiláció több lépcsős oxidációt követően a nukleotid cseréje (**1. ábra**). Első lépéseket a 2-oxoglutarát függő dioxigenáz család tagjai a TET (Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenases) enzimek katalizálják, így ezek a metilcsoportok 'törlői'. 5mC-ből elsőként 5-hidroximetilcitozin (5hmC), majd 5-formilcitozin (5fC), végül 5-karboxicitozin (5caC) keletkezik (**1. ábra**). Az 5fC és 5caC citozinra történő cseréjét a TDG/BER enzimek végzik. Az 5mC oxidált formáinak mindegyikéhez köthetők specifikus 'olvasók', melyek önálló epigenetikai jellegként befolyásolják a génkifejeződést [17–20].



**1. ábra A DNS metilációs/demetilációs ciklus.** A DNS metiltranszferáz (DNMT) enzimes család tagjai katalizálják a citozin metil szubsztitúcióját 5-metilcitozinná (5mC). A metil csoport eliminációja a TET (10 -11-es kromoszóma transzlokáz metilcitozin-dioxigenáz 1-3 (Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 1-3) enzimek katalizálta oxidációs lépésekben történik, ahol az első intermedier az 5-hidroximetilcitozin (5hmC), ami 5-formilcitozinná (5fC), végül 5-karboxicitozinná (5caC) alakul. Az 5fC és 5caC formákat a timin-DNS glikoziláz (TDG) és báziskivágásos DNS hibajavítás (BER) enzimek törlik a genomból.

Az 5mC mellett a másik stabil, nagyobb mennyiségben jelenlevő citozin intermedier az 5hmC. Mennyisége a sejtciklus során számottevően nem változik [21], azonban nagyban eltér a különböző szövettípusokban. Általában a genom teljes citozin mennyiségének kevesebb, mint egy százalékát teszi ki, de mennyisége szövettípus függő (pl. agy: 0,7%; vese: 0,4%; szív: <0,1%) [22]. Magas CpG tartalmú helyeken, mint a promoter, az enhancer régiók nagy mennyiségben van jelen [21].

A TET enzimek szerkezetileg nagy hasonlóságot mutatnak egymással. A TET1, illetve TET3 fehérjék N terminálisán helyezkedik el a CXXC domén, ami a DNMT enzimekhez hasonlóan a DNS kettős hélixhez való kötődést biztosítja, a C terminálison található a katalitikus hely, amit a kettős szálú  $\beta$ -hélix domén (DSBH) és cisztein gazdag régiók alkotnak. A TET2 fehérje CXXC régiója a szomszédos *CXXC4* génben kódolt. A három fehérje katalitikus aktivitásában nincs különbség, viszont eltérő expressziós mintázatot mutatnak. A TET1 főként embrionális őssejtekben, míg a TET2 és TET3 széles körben aktív gének. A TET enzimek legnagyobb affinitása az 5mC-hez van, aminek körülbelül tizede oxidálódik. A következő oxidációs lépésben az 5hmC tartalomnak szintén körülbelül 10%-át alakítják tovább az enzimek, így az egyes formák mennyisége között nagyságrendi különbség van [19, 23].

Az enzimes család oxidációs aktivitásához az UHRF2 kofaktor ismeri fel elsődlegesen az 5hmC nukleotidokat, emellett  $\text{Fe}^{2+}$ , 2-oxoglutarát (alfa-ketoglutarát), molekuláris oxigén, valamint redukálószer jelenléte is szükséges [19].

A TET enzimek szabályozása poszttranszlációs szinten foszforilációval, illetve glikozilációval történik. Működésüket kompetitív inhibitoroként gátolják a citrát kör onkometabolikus intermedierei (szukcinát, fumarát), valamint a daganatokra jellemző oxigén hiányos közeg. A citrát kör köztitermékeinek érintettsége miatt a résztvevő enzimek hatással vannak a DNS demetilációjára, így azok genetikai eltérései (szukcinát-dehidrogenáz, fumarát-hidroláz, izocitrát-dehidrogenáz gének mutációi) nagyban befolyásolhatják a DNS metilációs/demetilációs státuszát [24, 25].

Az elmúlt évek kutatásai alapján elmondható, hogy az 5mC mellett annak oxidált formáinak, főként az 5hmC megváltozott mennyisége a karcinogenezis korai jele közé tartozik. Míg általánosságban az 5mC mennyiségének növekedése, addig az 5hmC csökkenése társul rosszabb prognózissal. Ennek lehetséges okaként a citrátkör IDH (Isocitrate Dehydrogenase) enzimeinek megváltozott aktivitását, így az onkometabolitok felhalmozódását, vagy a katalizáló enzimek defektusát fogalmazzák meg [26]. A *DNMT3A* mutációja akut mieloid leukémia, mielodiszpláziás szindróma, mielofibrózis és krónikus mielomonocitás leukémia kialakulásához, a *TET1* mutációja kevert vonalú leukémia, a *TET2* defektusa akut mieloid leukémia, mieloproliferatív neopláziák, szisztémás masztocitózis, mielodiszpláziás szindrómához és krónikus mielomonocitás leukémia háttérben állhat [27]. Az úgynevezett metilált CpG sziget fenotípus (CIMP) megjelenése mögött a TET enzimek csökkent mennyisége révén csökkent demetilációt feltételeznek vastagbél daganatok kapcsán végzett vizsgálatok alapján [25, 27].

A DNS demetilációjára vonatkozó irodalmi adatok szegényesek, illetve egyrésztük ellentmondásos, melynek oka a mechanizmus összetettsége mellett a citozin intermedierek elkülönítésének nehézsége, és az eltérő mérési technikák felhasználása lehet [4, 19].

A DNS metilációjának kimutatási módszerei három alapelven működnek: restriktív enzimek specifikus metilált motívumok felismerése és hasítása, a fehérjék affinitásbeli különbsége immunorecipitációban, vagy a kémiai reakción alapuló nem-metilált citozinok biszulfid konverziós módosítása. E módszerek valamelyikének kombinációja szekvenálással vagy microarray technikával a legelterjedtebb technikák közé tartoznak [28].

A kisebb genomi szakaszok vizsgálatánál leggyakoribb, arany standardnak számító technika a biszulfid konverziót követő Sanger szekvenálás, míg a teljes genomi vizsgálatokhoz biszulfid konverziót követő új generációs szekvenálás (WGBS). A technika hátránya, hogy alapja a nem metilált citozin nukleotidok konverziója uracillá (U), melyek polimeráz láncreakciók (PCR) sokszorosítást követően természetesen (T) jelennek meg a szekvenciában, tehát citozin nukleotidként csak az 5mC-k jelennek meg. Ez a jelenség a DNS fragmentálódása mellett szintén nehézséget okoz a szekvencia illesztésben. A nagy áteresztő képességű technika hátránya a célzott DNS szakasz vizsgálatához képest a DNS szakaszok

csökkent és nem homogén lefedettsége, valamint a technika komplexitása és magas anyagi vonzata [28, 29].

A különböző (gyöngyös vagy array) hibridizációs technikák jól definiált, specifikus régiók (promoter, enhancer és 3' át nem íródó régiók) vizsgálatára alkalmasak biszulfid konverziót követően (például: Infinium HumanMethylation450 Bead Chip array, Illumina [https://support.illumina.com/array/array\\_kits/infinium\\_humanmethylation450\\_beadchip\\_kit.html](https://support.illumina.com/array/array_kits/infinium_humanmethylation450_beadchip_kit.html)). Az egyes régiók metilációs szintje a módosult (C → U → T), és a komplementer (5mC → C) oligomerek arányából számítható. Ez is nagy áteresztő képességű technika, azonban költséghatékonyabb a WGBS-nél, és a mérés precíz végrehajtása sem kíván kiemelkedő szaktudást, mint az új generációs szekvenálási technika [28, 29].

A nagy nyomású folyadék kromatográfiával összekötött tömegspektrometriás (HPLC-MS/MS) mérés előnye a többi klasszikus analitikai vizsgálattal szemben, hogy alacsony a szükséges DNS mennyiség (50 ng), és rossz minőségű DNS minták (pl. FFPE minták) vizsgálatára is alkalmas [29].

A fenti technikák közül egyedülként a HPLC-MS/MS alkalmas egy lépésben az 5mC és 5hmC elkülönítésére. Kimondottan az 5hmC kimutatása ezen kívül vagy specifikus antitesttel, vagy az 5hmC-t szelektíven felismerő enzimes átalakításokat felhasználó kitekkel lehetséges (pl: glükoziltranszferáz, TET) [29, 30].

### **I. 1. 2. Hisztonok szerepe a génexpresszió szabályozásában**

A kompakt kromoszóma struktúrához első lépésként a nukleoszóma alakul ki. Ez hiszton fehérjék segítségével (magi hisztonok: 3-as hiszton (H3), H4, H2A, H2B, összekötő hiszton: H1) jön létre, és együtt változik a sejtciklus során a citozin metilációval. A hisztonok poszttranszlációs módosításai megváltoztatják a fehérje lokális töltöttségét, ami meghatározza a DNS-hez és enzimekhez való affinitását, így transzkripciós szabályozó szerepe van. A módosítások a nukleoszóma struktúrájából kilógó N és C terminálisain lehetnek acetyl-, metil-, foszforil-, ubikvitin-, acil-, hidroxil-, glikán, glikozil-, szumoi- vagy adenozil-difoszfát ribozil csoportok. Ezek közül legtöbb információ a metilációról és acetylációról áll rendelkezésre [31]. A poszttranszlációs hiszton módosulások

szabályozottsága a DNS metilációhoz hasonlóan felborul olyan kóros folyamatok esetén, mint pl. tumorképződés [3].

A metiláció a H3 és H4 fehérjék lizin (K) aminosavaira jellemző. A folyamatban 'íróként' a hiszton metiltranszferáz (HMT) enzimsalád tagjai szerepelnek, az eliminálást a hiszton demetiláz enzimek (HDM) végzik. Az aktív génekre a hármas hiszton 4-es pozíciójú lizinjének metilációja (H3K4), a H3K36, H3K79 módosulások jellemzőek, míg a genom inaktív, represszált régióira a H3K9, H3K27 és H4 K20 metilációja jellemző [32, 33].

A másik legismertebb a hisztonok lizinjeinek acetilációja, ami csökkenti a DNS és fehérje közti töltéskülönbséget, így általában az aktív eukromatinra jellemző. A folyamatban a hiszton acetiltranszferázok (HAT) az 'írók', és hiszton deacetilázok (HDAC) a 'törlők'. melyik mindegyike nagy specificitást mutat. A hisztonok számos acetilációs helye közül a legtöbb információ a hármas hiszton 27-es lizinjének módosulásáról áll rendelkezésre, ami az aktív promoter és enhancer régiókra jellemző. A lizin metilációja és acetilációja antagonistá folyamatok [33–35].

A szerin, treonin és tirozin oldalláncok foszforilációját például az Aurora-B vagy Haspin kinázok végzik. Funkciója a génexpresszió szabályozásán kívül, a különböző módosításokkal a szabályozás összehangolása [36]. Például 9-es és 27-es pozíciójú lizinekkel szomszédos szerinek foszforilációja befolyásolja a szomszédos aminosav hozzáférhetőségét a HMT és HDM számára, így gátolja azokat, közvetve kifejtve hatását a génkifejeződésre [33, 37].

A hisztonok különböző módosulásai, valamint a DNS metiláltsága között összetett és szoros összhang van, melyek együttesen határozzák meg a kromatin szerkezetét. Ennek az összhangnak a felborulása a DNS metilációjához hasonlóan a sejt alapvető funkcióinak zavarát okozzák [36, 38].

### **I. 1. 3. Epigenetikai eltérések, mint terápiás célpontok**

Az alapvető epigenetikai mechanizmusok, és ezek daganatok keletkezésében betöltött szerepének megismerése új potenciális terápiás célpontokat tárt fel. Ezeket kihasználva az epigenetikai változások visszafordítása révén a sejteket érzékenyíthetik a hagyományos

kemoterápiás kezelésekre. A normál epigenetikai szabályozottság visszaállításának támadáspontja a két fő folyamatban szereplő HDAC és DNMT enzimek, amelyeket kis molekulákkal gátolnak [39].

A DNS metiláció célzása mellett szól, hogy általánosan minden daganattípusra jellemző a promoter hipermetiláció, valamint az ebben bekövetkező változás nyomon követése technikailag egyszerűbb. A hiszton deacetilázok gátlásával csak a nem metilált gének reaktiválhatók, a gének hipermetilációja nem fordítható vissza annak ellenére, hogy a két mechanizmus között szoros összhang van [3].

A DNMT inhibitorokon belül nukleozid vagy nem-nukleozid inhibitorokat különítenek el. Ezek közül kutatásaim során a citozin analóg decitabint használtam, melyet immár a klinikumban is alkalmaznak (Food and Drug Administration (FDA), [https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/search\\_product.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/search_product.cfm)) onkológiai protokollokban.

#### ***I. 1. 3. 1. Decitabin***

Az egyik első kifejezetten epigenetikai hatású gyógyszer, amelynek használatát az Amerikai Egyesült Államok Élelmiszerbiztonsági és Gyógyszerészeti Hivatala (2006), később az Európai Gyógyszerügynökség (2012) is engedélyezte. Ma krónikus mieloid leukémia, akut mieloid leukémia, mielodiszpláziás szindróma, prosztatata és pajzsmirigy daganatok kezelésére alkalmazható, emellett több klinikai kísérlet harmadik fázisában tart [40, 41].

A decitabin (5-aza-2'-deoxicitidin) a DNMT inhibitoroknak a citidin analóg csoportjába tartozó vegyület. A dezoxiribóz cukor váz miatt kizárólag DNS-be képes beépülni, ahol a DNMT fehérjéhez irreverzibilisen köt, gátolva annak további működését. A csökkent aktív enzim mennyiség a promoter hipometilációján keresztül közvetlenül tumorszupresszorok (*RASSF1A*, *CDKN2D*), és más gének reaktiválásához vezet, melyek közvetetten szintén befolyásolhatják más gének átíródásának mértékét (pl: transzkripciós faktorok). In vitro kísérletek során az idő és dózis függvényében csökkentette a sejtek proliferációját, magas koncentrációban citotoxikus hatása van [40, 41].

A sok száz epigenetikai farmakon mellett számtalan kismolekulának van hatása az egyes írók/olvasók/törlők aktivitására. Például az élelmiszerek az alapanyagcsere metabolitjai mellett tartalmaznak olyan anyagokat, mint fitoösztrogének (kékszőlő-resveratrol), bioflavonoidok (tea, kávé) vagy polifenolok (kurkuma, gyömbér) melyek epigenetikai hatásokon keresztül fejtik ki jótékony hatásukat a szervezetre [42]. A gyógyszerkutatásban új irány a régóta ismert, hatékonyan alkalmazott molekulák off-target epigenetikai hatásainak megismerése, feltárása [39].

Az egyik elterjedten alkalmazott, hosszú ideje használt farmakon, melynek ismertek epigenetikai hatásai, az aszpirin. Kutatásom során a decitabin mellett az aszpirin epigenetikai sajátosságokra gyakorolt hatásait is vizsgáltam [43].

### ***I. 1. 3. 2. Aszpirin***

Az aszpirin (acetilszalicilsav, ASA) egy közismert nem szteroid fájdalom-, és gyulladáscsökkentő hatású molekula, amely az alkalmazott dózis függvényében rendelkezik antitrombotikus hatással, valamint potenciális daganat megelőző és kezelő szerként is vizsgálták az elmúlt években (végbél-, emlő-, tüdő-, máj- és bőrrák). Az aszpirin jótékony hatásának hátterében több összetett mechanizmus állhat, melyek együttes eredményeként gátolja a káros sejtburjánzást és indukálja a sejthalált [43].

A daganat megelőzés feltételezett hatásmechanizmusainak egyike a ciklooxygenáz enzimek (COX1/2) acetilálása, ezáltal irreverzibilis inaktiválása. A COX enzimek (prostaglandin H-szintáz) az arachidonsav metabolizmusának, a prosztoglandin szintézisnek egyik kulcs enzime. A COX enzimeken kívül az ASA sok fehérje aktivitását befolyásolja, részben acetilálással, melynek eredményeként az NF- $\kappa$ B útvonal fokozott aktivitása, az ERK, VEGF és Wnt/ $\beta$ -katenin útvonalak gátlása, és a fokozott mitokondriális membrán permeabilitás következtében fokozott kaspáz aktivitás mérhető különböző sejtekben [43]. Kutatócsoportunk korábbi munkája alapján az ASA sejtosztódásra gyakorolt hatásának hátterében részben a survivin gátlás, s ezen keresztül a csökkent CCNA2 (Cyclin A2) és CDK2 (Cyclin Dependent Kinase 2) mennyiség áll [44].

A fehérje szintű hatások mellett vizsgálták epigenetikai hatásait is, mint például: bizonyos tumorszupresszor gének célzott reaktiválását a metiláció csökkentése révén, vagy a poszttranszlációs hiszton módosítók aktivitásának befolyásolását, melynek szintén tumorelles hatást tulajdonítanak [45].

## **I. 2. Hypophysis neuroendokrin daganatok**

A hypophysis neuroendokrin daganatok (PitNET) a hypophysis elülső lebenyének jóindulatú daganatai, melyek által okozott morbiditás fő oka a térfoglalás mellett az endokrin rendszerre gyakorolt hatás [46]. Egyáltalán nem tekinthető ritka tumor típusnak, a statisztikák alapján az intrakraniális daganatok közül a harmadik leggyakoribb [46–48], előfordulási gyakoriságuk metaanalízisek alapján 1:1064 [49]. A hypophysis neuroendokrin daganatok fontos jellemzői a hormontermelés, a méret, az invazivitás és az agresszivitás.

A hypophysis daganatok egyéb tumorokhoz hasonlóan monoklonális eredetűek. Klasszifikációjuk alapja az Egészségügyi Világszervezet 2017-es irányelve [50], mely elsőként vizsgálja a termelt hormon jelenlétét; illetve meghatározza a daganat kiindulás sejtípusát a sejtvonalra jellemző transzkripciós faktorok jelenlétének immunhisztokémiai vizsgálata által. A szomatotrop daganatokra elsősorban növekedési hormon (GH) (esetleg prolaktin (PRL)), míg a laktotrop daganatokra egyértelmű PRL pozitivitás jellemző. A thyrotrop sejtől kiinduló daganatok pajzsmirigy stimuláló hormon (TSH), a corticotrop tumorok adrenocorticotrop hormon (ACTH), a gonadotrop daganatok follikulus stimuláló hormon (FSH) és/vagy luteinizáló hormon (LH) pozitivitást mutatnak. Plurihormonális adenomák lehetnek GH/PRL/TSH, ritkán ACTH/GH vagy ACTH/PRL pozitívak. A transzkripciós faktorok az elülsőlebeny hormonokra negatív esetek további vizsgálatában nyújtanak nagy segítséget, alkalmazásukkal azonosíthatóak a kizárólag PIT-1 (pituitary-specific POU-class homeodomain transcription factor 1) pozitív sejtek/daganatok, melyek szomatotrop, a PIT-1 és ER (estrogen receptor) pozitív laktotrop, a PIT-1 és GATA-2 (GATA Binding Protein 2) festődést is mutató thyrotrop eredetű daganatok. Az SF-1 (steroidogenic factor 1), GATA-2 és ER faktorokra pozitív minták gonadotrop, a T-PIT (T-box family member TBX19) corticotrop differenciáltságot jeleznek. Azok a daganatok, melyekben egyik transzkripciós faktor jelenléte sem kimutatható alkotják a valódi „null-sejtes” (‘null



cell', NC) PitNET csoportját [50]. Felnőttek körében a daganatok 15-40%-át gonadotrop; 30-50%-át lactotrop; 15-20%-át somatotrop; 15%-át corticotrop, 0,5-1,5%-át thyrotrop, kevesebb, mint 1%-át NC PitNETek alkotják [51].

A daganat klinikai szempontból rendkívül fontos jellemzője a hormontermelés, mely meghatározza az endokrin rendszerre gyakorolt hatást, ez alapján megkülönböztetünk nem funkcionáló (NF, hormont nem termelő) (35%), illetve funkcionáló, hormont termelő daganatokat (65%) [52].

Méretük alapján mikro- (57,4%), és makroadenomákat (42,6%) különítenek el, melyek között 10 mm a mérethatár [49]. A tumor méret alakulása szempontjából meghatározó a proliferációs index (Ki-67). Az erős proliferációs aktivitást mutató tumorokat ( $\geq 3\%$ -os Ki-67 pozitivitás) klinikai szempontból az agresszív PitNET daganatnak tekintik, melyek sebészi eltávolítást követően nagyobb valószínűséggel recidíválnak [53, 54]. Az invazív csoportba sorolt daganatok intrasellárisan terjednek, infiltrálják a kemény agyhártyát és a környező csont- és agyszövetet [55].

A hypophysis carcinomái ritkák (0,2%). Ide azok a bizonyítottan hypophysis eredetű daganatok tartoznak, melyek esetében a craniospinális vagy szisztematikus metasztázis bizonyított [56].

A PitNET kialakulásának hátterében állhatnak öröklött vagy szerzett genetikai, epigenetikai változások.

### **I. 2. 1. Hypophysis daganatok pathomechanizmusa**

A tumorigenezis pontos mechanizmusa nem ismert, azonban számos fehérje kapcsán mutattak ki összefüggést (pozitív vagy negatív) megváltozott mennyisége vagy hibás működése miatt. A daganatkeletkezésben szerepet játszhatnak onkogének vagy tumorszupresszorok, melyek közé többek között a sejtciklus szabályozásban részt vevő fehérjék, növekedési faktorok, transzkripcionális szabályozó fehérjék, tágabb értelemben véve nem kódoló RNS-ek tartoznak. Ezek közül a PitNET kialakulásával összefüggésben álló fehérjék megváltozott szignál transzdukciós aktivitáshoz, lebontó folyamatokhoz

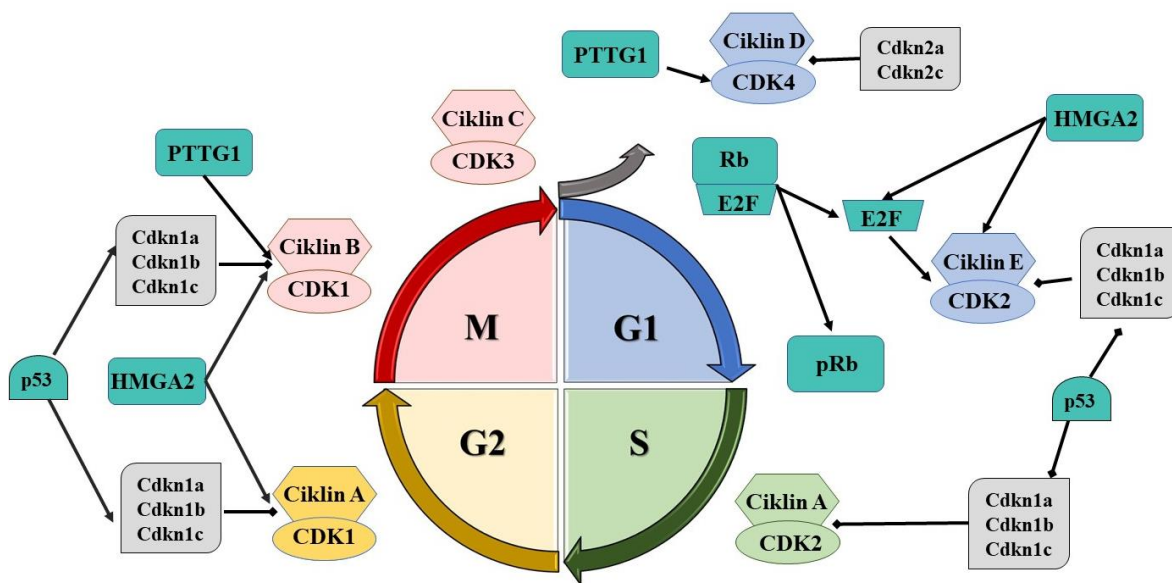
vezethetnek, gyakran érintik a sejtciklust szabályozó fehérjéket. Mindezek a daganat iniciációját és progrediálását eredményezik [57, 58].

Kiemelt helyen szerepelnek a ciklinek, ciklin dependens kinázok (CDK), és inhibitoraik (CDKi), amelyek precíz szabályozása révén történik a sejt osztódása. A CDK-k foszforilálják, így inaktiválják a sejtciklus egyes fázisaihoz kapcsolódó fehérjéket (pl.: retinoblasztoma (Rb1)), míg inhibitoraik (CDKN2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A), CDKN1B (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B)) megelőzik a CDK aktivitást, így gátolják a sejt fokozott ütemű osztódását. A ciklinek általában fokozott génexpressziót mutatnak nem funkcionáló daganatokban [59]. Ezen fehérjék összességének megváltozott aktivitása a sejtciklus szabályozás felborulásával hiperpláziák, többek között PitNET kialakulását segítik [57, 58].

A leggyakrabban megfigyelt eltérés PitNET-ek esetében a Rb1 útvonal esetében van. Habár a *RB1* gén mutációja rendkívül ritka, epigenetikai szabályozás felborulása következtében csökkent fehérje mennyiséget találtak szomatotrop daganatok esetében [62]. A RB1 részben tagja az RB1-CDKN2A-CCND1(Cyclin D1) - CDK4 (Cyclin Dependent Kinase 4) szabályozásnak, ahol a CDKN2A gátolja a RB1 foszforilációját a CDK4 inhibíciójával. Hypophysis adenoma mintákban a CDKN2A csökkent, agresszív daganatok esetén a CCND1 emelkedett szintet mutat [63]. Másrészt a RB1 az E2F1 transzkripciós faktor aktivitását szabályozza. A RB1 fehérje foszforilálatlan, aktív állapotban köti az E2F1 fehérjét, viszont CDK aktivitás mellett foszforilált állapotban (pRB1) a kötés megszűnik, az E2F1 szabad formában fejt ki szabályozó hatását (**2. ábra**). Az E2F1 transzkripciós faktor a sejtciklus első ellenőrzési pontjának (G1/S) fő koordinátora, ami a célfehérjék promoteréhez kötve szabályozza például a DNS replikációját (*PTTG1* - Pituitary Tumor Transforming Gene 1) valamint proapoptotikus folyamatokat. A RB1 foszforilációja révén aktivizált E2F család így a sejt ciklus felgyorsulásához vezet [58, 64, 65]. A CDKN1B inhibitor csökkent mennyisége a CCNE (Cyclin E) mennyiség növekedésével jár együtt, ami a differenciált sejtek esetében a sejt osztódásának fokozódásához vezet, összefüggést mutat a daganat méretével [66]. A CCND1 emelkedett mennyisége összefüggésben áll a daganat

invazivitásával [67], míg a CDKN2C (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C) hiánya gigantizmushoz vezet [68].

Szintén az E2F család aktivitásához kapcsolódik a *HMGA2* (High Mobility Group AT Hook 2) gén fokozott expressziója, melynek mértéke a különböző hisztológiai csoportokban eltérő. A fehérje mennyiségének emelkedése összefügg a daganat méretével és proliferációs indexével is. A *HMGA2* a *CCNB2* (Cyclin B2) promoterét indukálva közvetve a sejtciklus abnormális felgyorsításához vezet [58, 69].



**2. ábra** A hypophysis daganatok patomechanizmusának fehérjei, és ezek sejt ciklus fehérjéivel való interakciója. PTTG1: Pituitary Tumor Transforming Gene 1, RB: Retinoblastoma 1, HMGA2: nagy mobilitású AT hurok 2 (High Mobility Groop AT Hook), CDK1: ciklin dependens kináz 1 (Cyclin Dependent Kinase 1), CDK2: ciklin dependens kináz 2 (Cyclin Dependent Kinase 2), CDK3: ciklin dependens kináz 3 (Cyclin Dependent Kinase 3), CDK4: ciklin dependens kináz 4 (Cyclin Dependent Kinase 4), CDKN1A: ciklin dependens kináz inhibitor 1A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A), CDKN1B: ciklin dependens kináz inhibitor 1B (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B), CDKN1C: ciklin dependens kináz inhibitor 1C (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1), CDKN2A: ciklin dependens kináz inhibitor 2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A), CDKN2C: ciklin dependens kináz inhibitor 2C (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C). Otto és Sicinski [60], valamint Fedele és Fusco [61] munkáját használtam fel.

A PTTG1 sejtciklus szabályozó onkogén, a kromoszómák szegregálódásáért felelős. Mennyisége a sejtciklus függvényében jelentősen változik, a legmagasabb szintet a G2/M átmenetnél éri el. A PitNET-ekre jellemző emelkedett expressziója összefüggést mutat az invazivitással és az erős proliferációval [70].

A p53 tumorszupresszor a sejtciklus lassításáért, apoptózisért, sejt differenciálódásáért, a DNS javításáért felelős gének kifejeződését transzkripcionálisan szabályozza. Stressz hatására (DNS károsodás, onkogének) poszttranszlációs módosítások hatására aktivizálódik és stabilizálódik, így felhalmozódik a sejtben [71]. Bár az irodalomban leírták, hogy a p53 fehérje mennyisége korrelál a daganat invazivitásával és az agresszív viselkedéssel, azonban ezt más kutatócsoportok nem tudták megerősíteni és semmilyen összefüggést nem találtak a klinikai megjelenéssel [72, 73]. Ezért a WHO aktuális ajánlása szerint nem alkalmas prognosztikus paraméternek PitNET-ek esetében [50]. A p53 defektusa (pl. génmutáció) közvetlen szerepe a daganat kialakulásban szintén vitatott [74].

Az AKT1, AKT2 (protein kináz B) fehérjék szerin-treonin kináz aktivitással rendelkeznek. Aktivitásuk a foszfatidil-inozitol 3 kináz (PI3K) általi foszforilációjával történik, így az egyik legfontosabb jelátviteli útnak tagjai. Az AKT fehérjék kináz aktivitásuk révén kapcsoló funkcióval bírnak az apoptózis, sejtnövekedés és osztódás folyamatait meghatározó proteinekre, mint például ciklinek, ciklindependens kinázok (CCND1, CDKN1A, CDKN1B), apoptotikus faktorok (BAD – Bcl2 Associated Agonist of Cell Death) vagy transzkripciós faktor (GSK-3 – Glycogene Synthase Kinase 3). Az AKT fehérjék expressziós szinten nagyobb mennyiségben vannak jelen, és magasabb a foszforilált, aktív forma aránya daganatos sejtekben [75].

A BAG1 a BCL2-vel asszociált antiapoptotikus fehérje magas szinten expresszált PitNET sejtekben mind normál mind NC PitNET-ekhez képest. Összefüggés állhat fent a daganatos sejt túlélése, proliferációs rátája és metasztatikus hajlama és a BAG1 mennyisége között [76].

### **I. 2. 2. Familiáris megjelenésű hypophysis neuroendokrin daganatok genetikai háttere**

A hypophysis neuroendokrin daganatai mindössze 4-5%-a familiáris eredetű, az esetek túlnyomó többsége (95%) sporadikus megjelenésű [48]. A familiáris eseteket nagy része

olyan endokrin szindrómákhoz társul, mint a multiplex endokrin neoplázia szindrómák (MEN), vagy a Carney-komplex (CNC) (**1. táblázat**) [48, 77].

A familiáris halmozódást mutató esetek közül leggyakoribb (15-30%) az *AIP* (Aryl Hydrocarbon Receptor Interacting Protein) tumorszupresszor gén mutációja (15%), mely a familiárisan izolált hypophysis adenomák (FIPA) kialakulásához vezet [78, 79]. A pontos tumorigenezis nem ismert, feltehetően az *AIP* csökkent működése kapcsán megváltozott ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) szint állhat a háttérben [77].

**1. táblázat Familiáris megjelenésű PitNET-eket kiváltó mutációt hordozó gén, és a klinikai paraméterek (hormontermelés, PitNET klinikai megjelenése).** FIPA- familiárisan izolált hypophysis adenoma, MEN1- 1-es típusú multiplex endokrin neoplázia, CNC: Carney-complex, MAS: McCune-Albright szindróma, MEN2A, MEN2B: 2-es típusú multiplex endokrin neoplázia, MEN4: 4-es típusú multiplex endokrin neoplázia, X-LAG: X-kapcsolt akrogigantizmus, 3PA: Pheochromocytoma/ Paraganglioma, hypophysis asszociáció. A táblázat Tatsi és munkatársainak munkájának felhasználásával készült [77].

Szindróma	Gén	Hormon termelés	Hypophysis daganat klinikai jellemzője
FIPA	<i>AIP</i>	GH, PRL	Korábbi manifesztáció, agresszív, invazív fenotípus, gyakori rezisztencia.
MEN1	<i>MEN1</i>	PRL, NF, GH, ACTH	Elsődleges manifesztáció, agresszív fenotípus, makroadenoma, gyakori rezisztencia.
CNC	<i>PRKARIA</i>	PRL, GH	Lassan fejlődő daganat, gyakori recidíva.
MAS	<i>GNAS1</i>	GH	-
MEN2A, MEN2B	<i>RET</i>	GH, ACTH, NF	-
MEN4	<i>CDKN1B</i>	GH, ACTH, NF	-
X- LAG	<i>GPR101</i>	GH, PRL	Korai életszakaszban, invazív fenotípus, agresszív makroadenoma.
3PA	<i>SDH.X, VHL, MEN1, RET, MAX</i>	PRL, GH, NF	Agresszív megjelenés, gyakori rezisztencia.
Sclerosis tuberosa	<i>TSC1, TSC2</i>	ACTH, GH, sFSH/LH	-

A multiplex endokrin neoplázia I-es típusa (MEN1), melynek háttérében a *MEN1* tumorszupresszor gén csírasejtes mutációja áll, mely szintén genetikai predispozíciót jelent a hypophysis daganatok kialakulására nézve [80]. A MEN1-es esetek közel felénél (40%) alakul ki PitNET, ami gyakran az elsődleges manifesztáció. [77, 81, 82].

A Carney-complex (CNC) a ritka szindrómákhoz tartozik, háttérében az esetek döntő többségében (>70%) a *PRKARIA* gén inaktiváló mutációjára vagy deléciójára vezethető vissza. A betegség autoszomális domináns öröklődés menetet mutat [83]. A betegség tünetei emellett a myxomák és a bőr jellegzetes, pöttyözött pigmentációja [77].

A *GNAS1* gén mutációja McCune-Albright szindrómához vezet, mely bár nem örökletes kórkép mégis genetikai betegség, hisz ebben a betegségben a gén mutációja a posztzigotikus feljődés adott szakában jelenik meg, így a szomatikus mozaicizmus következtében csak bizonyos szövetekben mutatható ki a géntérés [82, 84]. Az esetek ötödénél GH termelő PitNET az egyik manifesztáció, jellegzetes tünete a café-au-lait pigmentáció és a korai pubertás [77].

A fenti gyakoribb genetikai eltérések mellett szintén szindrómákhoz kapcsolódóan PitNET kialakulásához vezethet a MEN2A/2B (2-es típusú multiplex endokrin neoplázia), MEN4 (4-es típusú multiplex endokrin neoplázia), X-LAG (X kromoszómához kötött akrogigantizmus), 3PA, vagy sclerosis tuberosa (**1. táblázat**). Extrém ritkán társul hypophysis neuroendokrin daganat neurofibromatózis-1 (NF-1) vagy Beckwith-Wiedemann szindrómához [77].

A MEN2A, MEN2B, valamint a MEN4 ritkán szintén kialakulhat PitNET. A *RET* (Ret Proto-oncogene) gén mutációjából eredő MEN2A és MEN2B szindróma esetén három [85], míg a *CDKN1B* defektusra visszavezethető MEN4 esetek közül mindezidáig öt esetben azonosítottak különböző endokrin aktivitást mutató PitNET-et [86].

Az X-LAG, azaz X-kapcsolt akrogigantizmus egy G fehérje kapcsolt receptor molekula, a *GPR101* génnek a mikroduplicációja okozza [87], ami magas, nehezen szabályozható GH szekréciót eredményez. Az esetek 85%-ban PitNET kialakulásához vezet, gyakran agresszív viselkedésű makroadenoma [77].

A 3P asszociáció (3PA) azon ritka eseteket foglalja össze, ahol Pheochromocytomás/Paragangliomás betegeknél az *SDH.X*, *VHL* (Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor), *MEN1*, *RET* vagy *MAX* (Myc Associated Factor X) génmutációi mellett PitNET alakul ki [77]. Feltételezik, hogy ezen esetekben a hypophysis daganat kialakulásának hátterében eltérő valószínűséggel a fenti gének mutációja állhat [88].

Néhány eset ismert, ahol a sclerosis tuberosa PitNET-tel társult. A betegség hátterében a *TSC1* vagy a *TSC2* gén eltérése áll, minek következtében megváltozik a hypophysis sejtek központi jelátviteli útvonalainak aktivitása (PI3K/Akt, mTOR – Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase) [77].

### **I. 2. 3. Szomatikus genetikai eltérések hypophysis neuroendokrin daganatokban**

A hypophysis neuroendokrin daganatok 95%-a azonban nem mutat családi halmozódást [48], s a szakirodalomban mindössze néhány gén szerepel, melyek szomatikus eltérései egyértelmű összefüggést mutatnak PitNET kialakulásával (**2. táblázat**). A korábban ismertettek közül a *MEN1*, *AIP* és *GNAS* gének mutációját írták le sporadikus PitNET-ek esetében szöveti szinten [89, 90].

Ezek közül a legrégebben azonosították a *GNAS* gént, melynek szekvenciájában patogén eltérés mutatható ki a GH-termelő PitNET-ek több mint 50%-ában, és néhány corticotrop adenomában. A klinikai viselkedés nagy hasonlóságot mutat a McCune-Albrighth szindróma kapcsán leírtakhoz [77].

Corticotrop PitNET hátterében állhat az *USP8* (Ubiquitin Specific Peptidase 8), *BRAF* (B-Raf Proto-Oncogene) gének szomatikus eltérése. Az *USP8* defektusa emelkedett EGFR (epidermális növekedési faktor receptor) szinten keresztül hypophysis sejtekben a *POMC* (Proopiomelanocortin) gén fokozott expresszióját, így emelkedett ACTH szekréciót eredményez. Az *USP48* (Ubiquitin Specific Peptidase 48) és *BRAF* a MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase 1) szignalizációhoz kapcsolódnak, melynek eredménye szintén a *POMC* szint változása, de ennek pontos mechanizmusa nem ismert [77, 91].

**2. táblázat Szomatikus genetikai mutációk hypophysis neuroendokrin daganatok (PitNET) háttérében.** *GNAS: G<sub>s</sub> protein  $\alpha$  alegység génje (G<sub>s</sub> Protein  $\alpha$  Subunit), USP8: ubikvitin specifikus peptidáz 8 (Ubiquitin Specific Peptidase 8), USP48: ubikvitin specifikus peptidáz (Ubiquitin Specific Peptidase 48), BRAF: B-raf onkogén (B-Raf Proto-Oncogene), PIK3CA: foszfatidilinozitol-4,5-biszfoszfát 3-kináz  $\alpha$  katalitikus alegység (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit  $\alpha$ ).* A táblázat Tatsi és munkatársainak munkájának felhasználásával készült [77].

Gén	Gyakoriság	Klinikai megjelenés
GNAS	somatotroph PitNET-ek 50%-ában, néhány corticotrop eset	McCune-Albright szindrómához hasonló
USP8	corticotrop PitNET-ek 20-60%-ában	Gyakori recidíva, agresszív fenotípus
USP48	corticotrop PitNET-ek 23%-ában	-
BRAF	corticotrop PitNET-ek 16%-ában	-
PIK3CA	PitNET-ek 2-12%-a	Invazív fenotípus

A PI3K/Akt útvonal *PIK3CA* (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha) génjének mutációját azonosították invazív esetek közel tizedében [77]. A klasszikus tumorszupresszorok közül néhány esetben találtak eltérést a *TP53* kódoló régiójában, mely agresszív fenotípust, a hypophysis karcinoid neopláziáját eredményezi [77].

A *DICER1* (Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease) mikroRNS érésben központi fehérjét kódoló génmutációja rendkívül ritka, a következményesen kialakuló szindróma (DICER szindróma) egyik súlyos manifesztációja a hypophysis blasztoma. Bár a hypophysis blasztomák hisztológiailag elkülönülnek a PitNET-ektől, ACTH szekréció megfigyelhető némely eseteiben [77].

#### I. 2. 4. Epigenetikai változások hypophysis neuroendokrin daganatokban

Azon esetek kapcsán, melyeknél genetikai eltérést nem sikerült azonosítani, az epigenetikai mechanizmusok vizsgálatának fejlődésével lehetőség nyílt ezen eltérések vizsgálatára, megismerésére. Számos gén kapcsán bizonyították a megváltozott epigenetikai mintázat következtében eltérő génexpressziós profilt, ami összefüggést mutathat a klinikai megjelenéssel.



#### ***I. 2. 4. 1. DNS metilációs eltérések***

Egyedi gének promoterének metiláció specifikus vizsgálata során számos általános, illetve hypophysis specifikus tumorigenezishez kapcsolódó gén fokozott metilációját írták le, valamint ebből eredően csökkent génexpressziót mértek. Ezen gének közé tartozik például a sejtciklus szabályozásban részt vevő *CDKN2A*, *RBI*, a genom stabilitásában fontos *GADD45 $\gamma$*  (Growth arrest and DNA Damage Inducible 45 $\gamma$ ), az apoptotikus folyamatokban fontos *PTAG* (Pituitary Tumor Apoptosis Gene), a tumorszupresszor *DAPK1* (Death Associated Protein Kinase 1), *RASSF1A* (Ras Association Domain Family Member), *MEG3* (Maternally Expressed Gene 3), az onkogén *PTTG1* és *MAGEA3* (Melanoma Associated Antigene family member A3) vagy az *FGFR2* növekedési faktor receptor gén [1, 92].

Ezek közül például a *CDKN2A* hipermetilációja nem-funkcionáló daganatokra jellemző (70%) [93], de invazivitás szempontjából nem mutatható ki különbség. A *PTAG* hisztológiai csoporttól függetlenül (nem funkcionáló és szomatotrop) csökkent expressziót mutat [94], aminek oka a megváltozott genomi metiláció. A *DAPK* hipermetilációja agresszív viselkedéssel társul [95], a *RASSF1A* génhez hasonlóan, ahol a metiláció különbséget mutatott a Ki-67 pozitivitás függvényében is [96].

Teljes genomot célzó vizsgálatok során szintén a klinikai megjelenés és metilációs profil közti összefüggéseket keresték. A különböző hypophysis tumor típusok közül, érdekes módon, a nem funkcionáló daganatok mutatják a legmagasabb genomiális metiláltságot. Ezeket követik a szomatotrop sejtekből kiinduló daganatok [97–100]. Az egyes hisztológiai csoportokra jellemző, eltérően metilált gének meghatározása nem konzekvens a különböző tanulmányokban. Nem meglepő módon, a hormontermelésben résztvevő *FSHB* (Follicle Stimulating Hormone Subunit  $\beta$ ), *LHB* (Luteinizing Hormone Subunit  $\beta$ ), illetve *POMC*, *GHI* (Growth Hormone 1), *GH2* (Growth Hormone 2), *PRLR* (Prolactin Receptor), *GHRHR* (Growth Hormone Releasing Hormone Receptor) és *SSTR2* (Somatostatin Receptor 2) gének csökkent metilációt mutatnak hormont termelő daganatok esetében, ami magas génexpresszióval társul [98, 99]. Emellett, Ling és munkatársai (2014) a *KCNAB2* (Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily A Regulatory  $\beta$  Subunit 2) gén promoter metilációjában találták a legnagyobb eltérést, ami a kódolt kálium-ioncsatorna fehérje

megváltozott expressziója révén a hormontermelést nagy mértékben befolyásolhatja más, szintén iontranszportban szereplő géekkel együtt, így magyarázat lehet a funkcionalitást érintő különbségre [100].

Nem egybehangzóak a vizsgálatok annak tekintetében, hogy az eltérően metilált gének mely biológiai funkciókhoz kapcsolódnak, mely jelátviteli útvonalak megváltozott aktivitásához vezetnek. Duong és munkatársai eredményei alapján az eltérően metilált gének az intracelluláris szignál kaszkádokhoz, a sejtfelszíni receptorok jelátviteléhez; és a transzkripcionális szabályozáshoz kapcsolódnak, más daganatok esetében tumorszupresszor funkcióval bírnak (*SOCS2* (Suppressor of Cytokine Signaling 2), *RASSF1*, *SOCS1* (Suppressor of Cytokine Signaling 1)) [97]. Gonadotrop szövetekben a sejt migrációhoz, a transzkripció negatív szabályozásához és a fokális adhézióhoz kapcsolódó gének mutattak eltérő metiláltságot, míg az útvonalak közül a kis guanin trifoszfát mediált jelátvitel; transzmembrán tirozin kináz, Rap1 (Member of Ras Oncogene Family 1), MAPK szabályozása volt érintett [101]. Korábban szélesebb hisztológiai spektrumon az eltérően (hiper)metilált gének olyan útvonalakhoz kapcsolódtak, mint a Wnt-, p53-, PI3K-Akt- vagy a proteoglikánok jelátvitel daganatokban („Proteoglycans in cancer”, KEGG útvonal azonosító: hsa05205) [99].

A hipermetiláltság nem szignifikánsan magasabb invazív daganatok esetében nem invazívhoz képest, de a két csoport metilációs mintázata jelentős különbséget mutat. A *CNKSRI* (Connector Enhancer of Kinase Suppressor of Ras1) hipermetilált invazív daganatok esetében, hipometilált az *ITPKB* (Inositol- Triphosphate 3-Kinase B), valamint a motilitáshoz és invázióhoz kapcsolódó *FLT1* (FMS Related Receptor Tyrosine Kinase 1) és *SLIT3* (Slit guidance Ligand 3) gének [99, 100, 102]. Gu és munkatársainak munkája alapján az invazív és non-invazív csoportokban eltérően metilált gének a különböző adhéziós folyamatokhoz szükségesek [102].

Tumorszupresszor gének metilációjának vizsgálata során García-Martínez és munkatársai szintén erősen eltérő metilációs profilt találtak a különböző hisztológiai csoportok között (corticotrop: *MSH6* (MutS Homolog 6), *CADMI* (Cell Adhesion Molecule 1); szomatotrop: *CASP8* (Caspase 8), *RASSF1* hipermetiláció). Emellett a *RASSF1* és *ER* (Estrogen Receptor)

gének metiláltsága és az invazív viselkedés között negatív összefüggést találtak, és megállapították többek között a *TP53*, *GATA5* (GATA Binding Protein 5), *CASP8*, *RASSF1* gének fokozott metilációját hormonálisan inaktív szövetekben [103].

A DNS metilációs mintázatának kialakításában fontos enzimek (*DNMT1/3A/3B*) közül a *DNMT1* expressziója mutat korrelációt a genom metiláltságával, a másik két, *de novo* metilációt katalizáló enzim és *TET* enzimek esetében ilyen összefüggést nem találtak hypophysis neuroendokrin daganatok esetében [104].

#### ***I. 2. 4. 2. Hiszton módosulások szerepe a hypophysis tumorigenezisben***

A hiszton fehérjék poszttranszlációs módosulásainak vizsgálatával a fehérje megváltozott acetilációja, metilációja és citrullinációja ismert habár kisebb mértékben reprezentált az irodalomban.

Globálisan PitNET-ek esetében emelkedett a hiszton 3 fehérje 9-es lizin aminosav acetilációja (H3K9ac), aminek mértéke pozitív korrelációt mutat a p53 sejtciklus szabályozásban fontos fehérje, és a Ki-67 proliferációs marker fehérje mennyiségével [105]. A fokozott hiszton acetiláció oka enzimatikus szinten lehet a HDAC2 (hiszton deacetiláz 2) fehérje szabályozása a *POMC* gén által [106], valamint, hogy a HDAC11 (hiszton deacetiláz 11) megnövekedett aktivitása negatívan hat a korábban ismertett sejtciklus szabályozó p53 fehérje mennyiségére [107]. A szirtuin hiszton deacetiláz aktivitású fehérjecsald tagjai közül a *SIRT1* overexpresszált szomatotrop és nem funkcionáló daganatokban, a *SIRT3*, *SIRT4* és *SIRT7* csökkent génexpressziót mutatnak NF PitNET csoporton belül nagyobb daganatok esetében. A *SIRT1* génexpressziója kisebb tumorméret estén magasabb, míg a *SIRT3* esetében fordított arányosság áll fenn a tumorméret és a génkifejeződése között [108]. A PTTG1 fehérje mennyisége nő magas p300 hiszton acetyl-transferáz aktivitás hatására [109], az Ikaros 6 acetyltransferáz fehérje a Bcl-XL (Bcl-2 family member) antiapoptotikus faktor promotor aktivitását növeli, fokozva a sejt túlélőképességét [110]. Emellett a *BMP4* (Bone Morphogenetic Protein 4) génexpresszió növekedését köthették össze a hiszton fehérjék fokozott acetylációjával [111, 112]. A BMP4 fehérje szintetizálásnak szabályozásában a hiszton fehérjék eltérő metiláltsága is szerepet játszik [112]. Általánosságban emelkedett

metilációját találták a hármas hiszton négyes (H3K4), valamint huszonhetes (H3K27) lizinjének NI csoportban invazívhoz képest, aminek oka a PRDM2 (PR/SET Domain 2) hiszton metiltranszferáz emelkedett aktivitása, ennek eredményeként későbbi a progresszió [113].

A PAD enzimek magas aktivitása miatt erős citrullinációt írtak le prolaktinomák és szomatotrop PitNET-ekben. Ennek hatására közvetetten emelkedik a HMGA, IGF-1 (Insuline Like Growth Factor 1) és MYC-N (MYCN Proto-Oncogene) onkoproteinek mennyisége, nő a sejtproliferáció [114].

## II. CÉLKITŰZÉSEK

A hypophysis neuroendokrin daganatok (PitNET) jellemzően jóindulatúak, azonban, gyakoriságuk és az endokrin rendszerre gyakorolt hatásuk következtében jelentős morbiditással járnak. Mindeztáig számottevő hányadukban (és kifejezetten a nem-funkcionáló daganatokban) nem találtak kiváltó okot hagyományos genetikai nagy áteresztőképességű vizsgálatokkal sem, mely felveti az elmúlt években egyre hangsúlyosabbá vált epigenetikai eltérések szerepét.

Doktori képzésem kutatómunkája során a sporadikus PitNET minták epigenetikájának tárgykörén belül a DNS metilációs eltérések, valamint az epigenetikai eltérések transzkriptomikai mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálatával foglalkoztam.

Céljaim a kutató munka során:

1. A hypophysis neuroendokrin daganatszövetek teljes genom állományának metilációs/demetilációs státusz és azok klinikopatológiai paraméterekkel való összefüggésének vizsgálata. Felmerülhet-e ez a jelleg, mint potenciális biomarker? A tumorszövetek mellett hasonló kontextusban vizsgáltuk a kapcsolódó vérminták leukocita genomjának teljes metiláció-demetilációjának mértékét is.
2. A DNS metilációs és demetilációs eltérések hátterében potenciálisan álló, enzimcsaládok, és az azok aktivitásához nélkülözhetetlen kofaktorok génexpressziójának vizsgálata humán PitNET szövetekben és *in vitro* sejtvonalakban.
3. Az alapvető folyamatok feltérképezését követően hypophysis neuroendokrin sejtvonalakon epigenetikai hatású farmakonok hatásainak vizsgálata, a felismert összefüggések vizsgálata, ezáltal potenciális terápiás lehetőségek feltárása.
  - a. A decitabin, mint DNS metilációt gátló enzim inhibitor hatása a sejt túlélésre, proliferációra.
  - b. Valamint az aszpirin, ill. hatásának vizsgálata hypophysis sejtek túlélésére, proliferációjára és az aszpirin hatásmechanizmusának megismerése ezekben a sejtekben

### III. MÓDSZEREK

#### III. 1. Betegminták

Kutatómunkámhoz felhasznált hypophysis adenoma szövetminták a 2007-2017 időszakban az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetben végzett transsphenoidális műtéti eltávolítást követően kerültek összegyűjtésre kutatócsoportunk által. A kapcsolódó vérminták a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján gondozott betegektől tájékozott beleegyezést követően, a diagnosztikához kapcsolódó vérvételek alkalmával kerültek levételre, így a betegek számára addicionális kockázatot nem képviseltek. A vizsgálatot a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács és Kutatásetikai Bizottság hagyta jóvá (0618/15).

A szövetminták, az eltávolítást követően  $-80^{\circ}\text{C}$ -on megfelelő stabilitást biztosító RNA later reagensben (Thermo Fisher Scientific) kerültek tárolásra.

A klinikai diagnózis alapját a betegek tünetegyüttese mellett a perifériás vérmintákból végzett hormon vizsgálatok képezték. A rutin szövettani vizsgálatok (hisztológia és elülsőlebeny hormonok immunhisztokémiája) a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben kerültek elvégzésre, melyhez kiegészítésként a WHO 2017-es irányelveinek megfelelően az ajánlott transzkripció faktorok meghatározása is beállításra került [50] **(3. táblázat)**.

Az általunk vizsgált minták klinikai és immunhisztokémiai jellemzőit és a rajtuk elvégzett vizsgálatokat az 1. táblázatban összegeztem. Mindösszesen 57 szövetet vizsgáltunk, melyben 12 növekedési hormont termelő, 41 gonadotroph, 3 corticotroph és 1 'null sejt' hisztológiát mutatott **(3. táblázat)**.

Az 57 beteg közül 25 esetében a szövet mellett vérmintát is felhasználtunk vizsgálataink során, amelyeket a mintavétel után 3 órán belüli centrifugálást (3000 g; 20 perc;  $4^{\circ}\text{C}$ ) és aliquotolást követően a felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltunk.

**3. táblázat – Kutatómunkám során felhasznált betegminták – IHK: immunhisztokémia; HPLC-MS-MS: Nagynyomású folyadék kromatográfiás tömegspektrometriai vizsgálatok; GEX: Individuális génexpressziós vizsgálatok. F: férfi; N: nő; NFPA: klinikailag nem-funkcionáló hypophysis adenoma; GHPA: növekedési hormont termelő hypophysis adenoma; FSH: follikulus stimuláló hormon; LH: luteinizáló hormon; GH: növekedési hormon; PRL: prolaktin; ACTH: adrenocorticotrop hormon; T-PIT: T-box család TBX19 tagja; PIT-1: Hypophysis specifikus POU-csoport homeodomén transzkripció faktor 1; SF-1: Steroidogenic Factor 1; GO: gonadotrop; GH: növekedési hormon; KO: corticotrop; NC: null sejtes.**

Nem	Kor	Klinikai diagnózis	IHK (elülső lebenyi hormon; transzkripció faktor)	Besorolás sejtvonal alapján	Ki-67 proliferációs index (%)	Vizsgálatok			
						IHK	HPLC-MS/MS		GEX
							Szövet	Vér	
F	43	NFPA	FSH, LH	GO	8,5		X		X
F	38	NFPA	FSH	GO	3,5		X		
N	68	NFPA	FSH, LH	GO	3,5		X	X	X
F	67	NFPA	FSH, LH	GO	3,5		X	X	
N	73	NFPA	FSH, LH	GO	1		X	X	
F	63	NFPA	FSH, LH	GO	0,5		X		X
N	39	NFPA	FSH	GO	1,5		X		X
N	60	GHPA	GH, PRL	GH	2		X	X	X
N	43	GHPA	GH	GH	2		X		X
F	58	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	6		X	X	X
N	60	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	5	X	X	X	X
N	64	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	5	X	X		X
N	49	NFPA	HN (T-Pit +; PIT1 -; SF-1 -)	KO	3,5		X	X	X
N	65	NFPA	HN (T-Pit +; PIT1 -; SF-1 -)	KO	3,5		X	X	X
N	58	NFPA	HN (T-Pit +; PIT1 -; SF-1 -)	KO	4		X	X	X
N	43	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	1	X	X		X
N	50	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	2	X	X		X
N	64	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	0,5	X	X		X
F	33	GHPA	GH, PRL	GH	3,5		X	X	X
N	49	GHPA	GH, PRL	GH	3,5		X	X	X
F	22	GHPA	GH, PRL	GH	3		X		X
F	64	NFPA	FSH, LH	GO	2		X	X	X
F	38	NFPA	FSH, LH	GO	3,5		X	X	X
F	72	NFPA	LH	GO	1		X	X	X
F	73	NFPA	LH	GO	2		X	X	X
N	69	NFPA	FSH, LH	GO	2		X		
F	73	NFPA	FSH, LH	GO	2,5		X		X
N	80	NFPA	FSH, LH	GO	2,5		X		X

Nem	Kor	Klinikai diagnózis	IHK (előlső lebenyi hormon; transzkripció faktor)	Besorolás sejtvonal alapján	Ki-67 proliferációs index (%)	Vizsgálatok			
						IHK	HPLC-MS/MS		GEX
							Szövet	Vér	
F	43	NFPA	FSH, LH	GO	8,5		X		X
F	62	NFPA	FSH, LH	GO	2		X	X	X
N	74	NFPA	FSH, LH	GO	2		X	X	X
N	49	NFPA	FSH, LH	GO	0,5		X	X	X
F	51	NFPA	FSH	GO	2,5		X		X
F	73	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 -)	NC	3,5		X		X
F	50	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	1	X	X	X	X
N	72	NFPA	FSH, LH	GO	1,5		X	X	X
F	44	NFPA	FSH	GO	2,5		X		X
N	48	GHPA	GH, PRL	GH	10		X		X
N	76	NFPA	FSH	GO	2,5		X	X	X
N	35	GHPA	GH, PRL	GH	5,5		X	X	X
N	22	GHPA	GH, PRL	GH	4,5		X		X
F	51	GHPA	GH, PRL	GH	2		X	X	X
F	30	GHPA	GH, PRL	GH	8		X	X	X
F	35	GHPA	GH, PRL	GH	6		X	X	X
F	49	GHPA	GH	GH	0,5		X		X
N	37	NFPA	FSH, LH	GO	7,5		X		X
F	57	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	1,5	X			
F	66	NFPA	FSH, LH	GO	2,5	X			
F	71	NFPA	FSH, LH	GO	2,5	X			
F	58	NFPA	FSH, LH	GO	3	X			
F	40	NFPA	FSH, LH	GO	3	X			
N	66	NFPA	FSH, LH	GO	3,5	X			
F	55	NFPA	FSH, LH	GO	1,5	X			
F	80	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	1,5	X			
F	79	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	2	X			
F	45	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	2	X			
F	69	NFPA	HN (T-Pit -; PIT1 -; SF-1 +)	GO	5,5	X			
F	59	NFPA	FSH, LH	GO	6,5	X			

Emellett felhasználtam korábbi publikációkhoz tartozó adatokat, melyeket a Gén Expressziós Adatbázisból (GEO) értem el (**4. táblázat**). A szöveti metilációs/demetilációs profil, és a kialakításában fontos enzimek vizsgálatához a GEO adatbázis GSE26966 [115] és GSE51618 [116] adatgyűjteményeket használtam fel.



A farmakológiai génextpressziós elemzés eredmények vizsgálatának validációjához a GSE26966 [115] és GSE51618 [116] számú adatsorokat kiegészítettem két publikációból származó génlistával, melyek a szignifikáns eltéréseket tartalmazták normális és PitNET minták között [59, 118], valamint a GSE2175 [117] adatsorral. A farmakológiai kísérlet proteomikai eredményeit két publikációban közölt fehérje listával vettem össze [59, 119].

**4. táblázat Eredményeink validálásához felhasznált irodalmi adatsorok, adatbázisok.** GEO ID: Gén expressziós adatbázisbeli azonosító; nP: normál hypophysis szövet, PitNET: hypophysis neuroendokrin daganatok, FSH: folliculus stimuláló hormon, LH: luteinizáló hormon, NC: null sejtes PitNET, I: invazív, NI: nem invazív, NF: nem funkcionáló.

GEO ID	Minták	Hivatkozás
<b>A metilációs/demetilációs kulcsenzimek génextpressziós vizsgálatához felhasznált irodalmi adatok</b>		
GSE26966	nP: 9, PitNET: 14 (FSH/LH+: 10; NC: 4)	[115]
GSE51618	nP: 3, I: 3, NI: 4	[116]
<b>Farmakológiai vizsgálatoknál felhasznált korábbi génextpressziós adatok</b>		
GSE26966	nP: 9, PitNET: 14 (FSH/LH+: 10; NC: 4)	[115]
GSE51618	nP: 3, NF PitNET: 7	[116]
GSE2175	nP: 5, NF PitNET: 5	[117]
gén lista	nP: 3, NF PitNET: 11	[59]
gén lista	nP: 3, NF PitNET: 13	[118]
<b>Farmakológiai vizsgálatoknál felhasznált korábbi proteomikai adatok</b>		
protein lista	nP: 3, NF PitNET: 11	[59]
protein lista	nP: 8, NF PitNET: 15	[119]

## III. 2. Nukleinsav izolálás

### III. 2. 1. Deoxiribonukleinsav (DNS) izolálás

A szövetminták közül 45 esetben végeztem DNS izolálást, melyek közül 12 GH PitNET, és 33 NF PitNET szövet volt. Nem-funkcionáló hypophysis adenoma közül 22 FSH/LH +; 11 hormon negatív (HN), melyek transzkripciós faktorok szerinti megoszlása: 7 SF-1+ gonadotrop; 3 T-pit+ corticotrop; 1 transzkripciós faktor negatív null sejtes szövetminta volt (**3. táblázat**). A nukleinsav izoláláshoz a QIAamp Fast DNA Tissue Kit-et (Qiagene) használtam a gyártó instrukcióit követve.

QIAamp DNA Mini Kit (Qiagene) segítségével vontam ki leukocita genomi DNS-t összesen 25 vérmintából, melyek közül 7 GH PitNET, 18 NF PitNET (12 FSH/LH+; 6 HN – 3 T-pit +; 3 SF-1+) szövethez kapcsolódott (lásd beteglábat, **3. táblázat**). A mintákból a mellékelt protokollt követve vontam ki a DNS frakciót.

*In vitro* sejttenyészeteken végzett munkám során a DNS izoláláshoz a sejteket tripszin-EDTA (BioSera) oldat segítségével egy-sejt szuszpenzióvá alakítottam, majd centrifugálással sejt pelletet képeztem (szobahőmérséklet; 1000 rpm; 10 min), amit a DNS izoláló kit előírása alapján 200µL PBS (phosphate buffered saline, foszfát puffer; Thermo Fisher Scientific) oldatban szuszpendálva használtam a továbbiakban a kit (Qiagene QIAamp DNA Mini Kit) leiratában szereplő módon.

A DNS minták mennyiségi és minőségi ellenőrzését NanoDrop 1000 spektrofotométerrel végeztem (Thermo Fisher Scientific), további felhasználásig -80°C-on tároltam őket.

### **III. 2. 2. Ribonukleinsav (RNS) izolálás**

A géneexpressziós vizsgálatokhoz teljes RNS frakciót izoláltam 41 szövetmintából [12 GH PitNET; 29 NF PitNET (18 FSH/LH+; 11 HN (7 SF-1+; 3 T-pit+; 1 NC))] (**3. táblázat**) az arra alkalmas NucleoSpin miRNA kit (Machery Nagel) segítségével. Az RNS minták koncentrációját, tisztaságát és integritását NanoDrop 1000 Spektrofotométer, valamint tris-acetát-EDTA-formamid gélelektroforézissel vizsgáltam Biotinum GelGreen hozzáadásával.

*In vitro* sejt pelletből történő kivonásra NucleoSpin miRNA kitet (Machery Nagel), vagy MiRNeasy Mini Kitet (Qiagen) használtam szigorúan követve a mellékelt utasításokat. A minták megfelelőségét részben spektrofotometriás méréssel (NanoDrop 1000 ThermoFisher Scientific) ellenőriztem. Az RNS mintákat felhasználásig -80°C-on tároltam.

## **III. 3. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai - tandem tömegspektrometria**

### **III. 3. 1. Standardok és reagensek**

A mérés során felhasznált vegyszerek mindegyike (víz, acetonitril, hangyasav) megfeleltek a nagyérzékenységű analitikai módszer követelményeinek (VWR International Kft).

A minőségi azonosításhoz 5mC, illetve 5hmC standardokat használtunk (Zymo Research Corporation), a mennyiségi elemzéshez belső standard módszerét alkalmazva citozin-2,4-13C2-15N3 (Sigma Aldrich-Merck) ismert mennyiségét adtuk a mintákhoz.

### **III. 3. 2. Mintaelőkészítés**

A nukleinsav hidrolíziséhez 1,00 µg DNS-t mértünk 10 µL belső standard oldattal (1 µg/mL) 200 µL 98%-os hangyasavban oldathoz, majd 140°C-on forraltuk 90 percen keresztül. Szobahőmérsékletre hűlést követően N<sub>2</sub> segítségével bepárlásra kerültek, majd 200 µL acetonitril: víz (90:10 térfogatarány) elegyben oldva kerültek a HPLC készülékbe injektálásra, mérésenként 10µL.

### **III. 3. 3. Nagy nyomású folyadékkromatográfia tandem tömegspektrométerrel**

A méréseket Perkin-Elmer Flexar FX10 ultraperformance folyadék kromatográfias rendszerhez kötött Sciex 5500 QTRAP tömegspektrométer berendezésen mértük.

A kromatográfias elválasztás Aquity UPLC BEH HILIC (130Å; 1,7µm; 2,1\*100 mm) oszlopon történt (Waters Ltd) gradiens elúciós módszerrel (Eluens A: vizes fázis 2,5 mM ammónium-formiát; eluens B: acetonitril 0,05%-os hangyasav oldata). A gradiens profil programja: 95% B, 1,5 min; B eluens 50%-ra csökkenése 2,2 min alatt, tartás 4,9 percen keresztül, B eluens 95%-ra 0,4 min alatt, majd állandó 95% 5 percen keresztül. A teljes futási idő 14 perc; áramlási sebesség 200 µL/min; az oszlop hőmérséklete a mérés során 35°C.

A tömegspektrométer pozitív elektropray ionizációs üzemmódjában végeztük a detektálást.

### **III. 4. Transzkriptom szekvenálás**

A transzkriptom szekvenáláshoz 1500-2000 ng teljes RNS frakciót tartalmazó mintából PolyA NGS könyvtár készült Illumina NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit segítségével a mellékelt leírást szigorúan követve. A könyvtár tisztítása tisztító gyöngyök segítségével (Purification Beads NEB #E7760S/L) történt. A szekvenálás Illumina Novaseq (NovaSeq 6000 SP 300 cycles (2x150 bp)) platformon futott, 100M PE read/minta beállítással. A bioinformatikai feldolgozás R program segítségével történt Bioconductor edgeR szoftvercsomag alkalmazásával. A mintacsoportok közti eltérő expressziós mintázat

meghatározásához a többszoportos összehasonlításra tekintettel FDR-t (false discovery rate – hamis felfedezési arány) korrekciót alkalmaztunk.

A kapott eredmények értelmezéséhez Genesis 1.8.1 ([https://genome.tugraz.at/genesisclient/genesisclient\\_news.shtml](https://genome.tugraz.at/genesisclient/genesisclient_news.shtml)) valamint a iDEP.91 szoftver (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>) t-SNE (t- distributed stochastic neighbor embedding; t-eloszlású sztohasztikus szomszéd beágyazás) analízisét alkalmaztuk.

Az útvonal analízist génkészlet dúsulási elemzés (gene set enrichment) módszerrel az Rno Reactome program, a gén ontológiai elemzést a Generic GO Term Finder program segítségével hajtottam végre. A kapott eredményeket a Cytoscape 3.2.1 vizualizáltam.

A génexpressziós adatokból a transzkripció faktor aktivitás analíziséhez a TRRUST adatbázist használtuk (<https://www.grnpedia.org/trrust/>).

### III. 5. Individuális génexpressziós vizsgálatok

A gének egyedi expressziójának vizsgálatához a teljes RNS frakciót tartalmazó minták 350 ng-jának felhasználásával High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) protokolljának megfelelően reverztranszkripciót végeztem.

A valós idejű, kvantitatív polimeráz láncreakcióhoz (RT-qPCR) TaqMan génexpressziós assay-eket (Thermo Fisher Scientific) (**5. táblázat**) és TaqMan Universal MasterMix II, no UNG (Thermo Fisher Scientific) mixet használtam. Endogén kontrollként fajspecifikus gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) vagy  $\beta$ -aktin assay-t használtam. A méréseket QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR készüléken futattam (Thermo Fisher Scientific). Az analízist minden esetben a következő formulával végeztem.

$$FC (fold\ change) = \log_2 RQ (relative\ quantity) = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### III. 6. Immunhisztológiai vizsgálatok

A kutatómhoz tartozó immunhisztokémiai vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem I. számú Patológiai és Rákkutatói Intézetben végezték. A vizsgálatokhoz formalin fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) minták kerültek felhasználásra (**3. táblázat - IHK**).

**5. táblázat Felhasznált génexpressziós assayk és azonosítók**

Gén	Egyedi azonosító (Assay ID)	
	<i>Homo sapiens</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
DNMT1	Hs00945875_m1	Rn007009664_m1
TET1	Hs04189344_g1	Rn01428192_m1
TET2	Hs00325999_m1	Rn01522037_m1
TET3	Hs00896441_m1	Rn01725643_m1
UHRF1	Hs01086727_m1	Rn02346366_m1
UHRF2	Hs00380204_m1	Rn01502134_m1
PTTG1	Hs00869689_s1	Rn00574373_m1
TP53	-	Rn00755717_m1
GAPDH	Hs02758991_g1	Rn01775763_g1
$\beta$ -Actin	Hs01060665_g1	-

A szövetek proliferációs viselkedésére utaló Ki-67 fehérje marker immunhisztológiai analizisét rutinszerűen végezték (Leica Bond-Max) anti-Ki-67 antitesttel (Dako MIB1 klón #M7240) majd számolták a pozitív sejtek arányát a mintán belül.

Az 5hmC szemikvantitatív vizsgálata anti-5hmC antitesttel (1:1000; Active Motif #39769) történt, a detektáláshoz Novocastra Novolink Polymer Kit-et (Post Primary Block RE 7111 & Polymer RE 7112) alkalmaztak. Az UHRF kofaktorok vizsgálata a következő antitestekkel történt: anti-UHRF1: PA5-29884; 1:2000; anti-UHRF2: PA5-40969; 1:800; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific overnight 4°C-on. Ezt követően HITOLS-®-MR-T Polymer-t (30011.500T, Histopathology) alkalmazását követően a detektálás 3,3'diaminobenzidin-t (DAB, Vector Laboratories) használatával történt. A szöveti vizualizációt a hematoxilin festés biztosította.

A metszetek festődésének kiértékelése digitalizálást követően történt (P1000 Scanner – Panoramic Scan Software – 3DHISTECH Kft). Kizárólag adenoma eredetű sejtek festődésének értékelését a patológusok a következő pontozás alkalmazásával végezték: negatív, gyenge (+), közepes (++) és erős (+++) festődés, korábbi ajánlásnak megfelelően [120].

### III. 7. Fehérje extrakció és mennyiségi vizsgálat Western blot technikával

Sejttenyészetekből kezelés után korábban használt protokoll alapján jártam el [44, 121]. Egyszeres PBS mosást követően proteáz inhibitorral kiegészített (Thermo Fisher Scientific) M-PER oldatban (Thermo Fisher Scientific) lizáltam jégen. Inkubálást követően az összegyűjtött folyadékot centrifugáltam (14 000 g; 4°C; 20 min). A felülúszóból Bradford féle kalorimetriás fehérje meghatározással (Sigma Aldrich, Merck) végeztem a minták kvantifikálását, majd felhasználásig -80°C-on tároltam.

A fehérjékből 20µg-ot használtam fel mérésenként. A megfelelő térfogat eléréséhez a mintákhoz egyenlő térfogató 5X Laemmler Buffert (BioRad), és UltraPure vizet (Thermo Fisher Scientific) használtam. A fehérjék denaturációjához β-merkaptoetanol (BioRad) hozzáadását követően 90°C-on 5 percig inkubáltam a mintákat. A fehérjék szeparációjához 15%-os nátrium-dodecilszulfátos poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) technikát alkalmaztam, majd 60-90 perc alatt metanollal aktivált polivinilidén difluorid (PVDF) membránra (Thermo Fisher Scientific) blottoltam a fehérjéket. A technika megfelelőségéhez Ponceau festést használtam. A blokkoláshoz 5%-os zsírmentes tejpor oldatban végeztem, ezt követően került rá az elsődleges antitest a következő hígítások alkalmazásával: (anti-TP53 (1C12): #2524, RRID: AB\_33174 (1:1000; Cell Signaling Technology); anti-acetil-TP53 (K382): #bs-0905R RRID: AB\_10855372 (1:500; Bioss Antibodies); anti-PTTG (DCS-280): #4967 RRID: AB\_785382 (1:2000; Santa Cruz Biotechnology), anti-β-aktin #4967, RRID: AB\_330288 (1:1000; Cell Signaling). Az elsődleges antitest oldatokban minimum egy éjszakán (14 h) voltak a membránok. Másnap mosást követően a membránokat egy órán át inkubáltam a tormaperoxidázzal konjugált másodlagos antitestet (kecske anti-nyúl: #P0448 RRID: AB\_2617137 (1:2000; Agilent); vagy kecske anti-egér: #P0447 RRID: AB\_2617137 (1:2000; Agilent) tartalmazó 5%-os tejpor oldatban. Az előhívást SuperSignal West Pico kemilumineszcens szubsztrát előhívó folyadékkal (ThermoFisher Scientific) ChemiDoc XRS+ Imaging System (BioRad) készüléken ImageLab v6.0.1. szoftverrel végeztem. A belső kontroll vizsgálatához a már kötött antitestek emésztését követően β-aktin primer antitestet alkalmaztam (#4967S (1:2000) Cell Signaling Technology) minimum 2 órán át, majd másodlagos antitesttel a korábbiakban leírtak szerint inkubáltam a membránt, ezt követően

végeztem el az előhívást. A kapott jelintenzitások elemzéséhez ImageJ szoftvert használtam (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

### **III. 8. *In vitro* sejtenyészetek**

#### **III. 8. 1. Sejtenyészetek**

Kísérleteimhez két patkány (*Rattus norvegicus*) hypophysis adenoma sejtvonalat használtam fel, tekintettel arra, hogy humán eredetű hypophysis sejtvonal kereskedelmi forgalomban nem elérhető. Az RC-4B/C (CRL-1903) plurihormonális, valamint a GH3 (CCL-82.1) növekedési hormon termelő sejtvonalak fenttartása a forgalmazó (ATCC) által előírt tenyésztési körülmények szerint történt (37°C; 5% CO<sub>2</sub> tartalmú, párásított levegő).

Az RC-4B/C sejtvonalat Dulbecco féle módosított Eagle médium (DMEM; Corning) és  $\alpha$ -Minimum Essential médium ( $\alpha$ MEM; Corning) 1:1 arányú tápfolyadékban tartottam fent, melyet kiegészítettem nem esszenciális aminosavval (0,01mM Sigma-Aldrich); 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazin-etánszulfonsavval (HEPES; 15mM; Sigma-Aldrich); marha szérum albuminnal (0,2 mg/mL; szűrve (0,22 $\mu$ M) Invitrogen); humán epidermális növekedési faktorról (2,5 ng/mL; Gibco), dializált hő-inaktivált marha szérummal (FBS 10v/v%; Gibco) valamint penicillin (100 U/mL) és sztreptomycin (100  $\mu$ G/mL) elegyével (BioSera).

A GH3 növekedési hormont termelő sejtvonal tápoldata F-12K (Corning) alapú médium ló szérummal (15 v/v%; Gibco); marha szérummal (2,5 v/v%; BioSera) és antibiotikummal (50 U/mL penicillin; 50  $\mu$ G/mL sztreptomycin; BioSera) kiegészítve.

Fenntartáshoz minden második napon tápoldatot cseréltem, 90%-os konfluencia szinten passzáltam 10%-os tripszin-EDTA oldattal (BioSera). A kísérleteket 5-20 passzázs számú sejteken végeztem, különböző időpontokban fagyasztott (passzázs szám: 1-8) tenyészetekből kiindulva.

#### **III. 8. 2. *In vitro* farmakológiai kezelések és transzfecciók**

A hypophysis elülső lebenyének *in vitro* sejtenyészeteiből óvatos tripszines emésztést követően egysejt szuszpenzióból hagyományos Bürker kamra segítségével előre optimalizált

számú sejtet inkubáltam 6, 24, illetve 96 lyukú edényekben 24 órán keresztül. A különböző ágensekkel történő kezelések, illetve transzfecció ezt követően történt.

### **III. 8. 2. 1. Decitabin kezelés**

A decitabin (#A10292 Adooq) kezeléshez RC-4B/C esetében  $2,5 \times 10^5$  vagy  $10^4$ , illetve GH3 sejteknél  $3 \times 10^5$  vagy  $10^4$  sejtet kezeltem rendre 6, illetve 96 lyukú edényekben. A 24 óra elteltével  $10 \mu\text{M}$ -os végső koncentrációban adtam hozzá az ágenst, kontrollként a decitabin oldásához is használt dimetil-szulfoxidot (DMSO; Corning) használtam. Az alkalmazott koncentrációban citotoxikus hatás nem volt kimutatható. A hypophysis sejtek egyéb carcinoma sejtekhez képest lassabb osztódására tekintettel, a kezelést követő 7. napon vizsgáltam a tenyészeteket.

### **III. 8. 2. 2. Aszpirin kezelés**

Az acetilszalicilsav (ASA #A5376; Sigma Aldrich, Merck) oldott állapotban gyorsan bomlik, felhasználás előtt közvetlenül készítettem el DMSO (Corning) oldatát minden esetben. Az ASA végkoncentrációja a tápoldatban  $5,0 \text{ mM}$ , a kezelés 72 órán keresztül tartott. A sejtekből RC-4B/C, illetve GH3 sejtvonalakon 6 és 24 lyukú edénybe  $2,5 \times 10^5$  vagy  $3 \times 10^5$  sejt került lyukanként, míg 96 lyukú tenyésztő edénybe  $10^4$  mindkét sejtvonal esetében.

### **III. 8. 2. 3. Plazmid transzfecció**

A vektor konstrukció a *PTTG1* gén (*Rattus norvegicus*) 5' UTR szakaszát (ENSRNOT00000005070.5) 5'→3' irányban tartalmazta (2090 bp), melyet a gyártó (Promega) saját pGL3 promotor vektorába (Promega: #E1761) klónozott, az 5' végén luciferáz riporter fehérje kódoló szakaszával. A plazmid felszaporítása a Természettudományi Kutatóközpont (TTK) Enzimológia Intézetében DH5α *Escherichia coli* sejtekben történt. Ezt követően az izolálást Qiagene Endotoxin free Plasmid Midi Kit segítségével, az ellenőrzést BamHI restrikciós enzimmel való emésztést követő agaróz gél elektroforézissel végeztem.

A plazmid transzfecció korábbi munka alapján [122] 96 lyukú edényben történt, mindkét sejtvonal esetében  $10^4$  sejt került lyukanként. 24 órás inkubálást követően történt a



kotranszfekció Lipofectamin 3000 (ThermoFisher Scientific #L3000008) reagenssel a gyártó előírása alapján 150 ng PTTG1-luc vagy kontroll pGL3-promoter plazmival és 150 ng renilla luciferáz vektorral (pRL-TK, Promega #E2241). A luciferáz aktivitást 24 órával a kotranszfekciót követően mértem Dual-Glo luciferase assay (Promega) segítségével.

### **III. 8. 3. Életképességi vizsgálatok**

A sejtek viabilitásának meghatározásához két különböző elven alapuló módszert alkalmaztunk.

Részben 96 lyukú edényben tenyésztett sejteken a tápoldathoz 10v/v%-ban adott AlamarBlue (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) redox indikátorral mely a sejtszámtól és viabilitástól függő optikai denzitást eredményez. A gyártó által előírt módon (560 nm gerjesztési hullámhossz; 590 nm emissziós hullámhossz) Varioskan plate-readerrel, SkanIt Software 2. 4. 5. RE szoftverrel (Thermo Fisher Scientific). Emellett 6 lyukú tenyésztő edényben kezelt sejtek egysejt szuszpenziójából Bürker kamra segítségével végeztem sejtszámolást, a nem életképes sejtek festéséhez TrypanBlue festéket használtam (0,4%; Gibco, Thermo Fisher Scientific). Az életképességre gyakorolt hatás megállapításához az összes, élő, illetve halott sejtek számát hasonlítottam össze.

### **III. 8. 4. Migrációs teszt**

A sejtek migrációs hajlamának vizsgálatához 24 lyukú edényben tenyésztett sejteket használtam. A sejtek kirakása után 24 órával magas konfluencia értéknél (~80%) a tápoldat óvatos eltávolítását követően a műanyag felületének megsértése nélkül az egysejtrétegen 200 µL-es pipettaheggyel migrációra alkalmas sejtmentes sávot hoztam létre. Mosást követően a tápoldat hozzáadásával történt a sejtek kezelése. A sejtek mozgásának monitorozását 0, 24 és 48 óra elteltével a tenyészet ugyanazon szegmensének fotózásával, majd ennek alapján, korábbi példát követve [123] a szabad területek meghatározásával végeztem el a következő képlet felhasználásával:

CFA (%) (cell free area): sejtmentes terület;

CCA (%) (cell covered area): sejt által benőtt terület  $\equiv$  migrációs ráta.

$$CFA(\%) = \left[ \frac{CFA_{24h/48h}}{CFA_{0h}} \right] * 100;$$

$$CCA(\%) = 100 - CFA(\%).$$

A kiértékelés során az ImageJ 1.53e szoftvert használtam (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

### **III. 8. 5. Áramlási citometria mérések**

A sejtciklus elemzés és Ki-67 fehérje vizsgálatok során BD FACS Lyric áramlási citométer (Becton, Dickinson and Company) került alkalmazásra, az adatelemzés a Lauza 2.1.1. szoftverrel történt (Beckman Coulter).

#### **III. 8. 5. 1. Sejtciklus elemzés**

Aszpirin kezelést követően 500 000 sejt került inkubálásra 0,5 mL propidium jodidot tartalmazó Cycloscope™ Reagent DNS jelölő oldatban (CYT-CS-R-50; Cytognos) (10 perc, szobahőmérséklet, sötét). A DNS tartalom meghatározása minimum 10 000 sejt detektálásával történt.

#### **III. 8. 5. 2. Ki-67 fehérje vizsgálat**

A kezelést követő 72 órával a sejt szuszpenzió (500 000 sejt) 100  $\mu$ L IntraStain reagent A oldattal került inkubációra (15 perc, 25°C, #K2311, Dako-Agilent). Ezt követően a pelletet (5 perc, 400 g, 25°C) foszfát pufferes mosást (PBS, 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7,4) követően összesen 100  $\mu$ L, 0,4%-os TritonX, és 5  $\mu$ L Ki-67 antitestet tartalmazó IntraStain B oldatban kerültek szuszpendálásra (#2352515, RRID: AB\_2920575 Sony Biotechnology). Az előírt 15 perces sötétben történt inkubálást követően az elsővel megegyező mosási lépés következett (5 perc, 400 g, 25°C). A végső szuszpenzió elkészítése 0,5 mL PBS oldatban történt, amely 0,01 mg/mL 2-(4-amidinofenil)-

6-indolkarbamidot (DAPI) tartalmazott. A Ki67 festődés detektálása minimum 50 000 sejt analízisével történt.

### **III. 9. Statisztikai elemzés**

A humán szövetekhez kapcsolódó statisztikai elemzéseket Statistica 12.0 szoftverrel, ANOVA alkalmazásával (Fisher post hoc teszttel) végeztük. A hierarchikus klaszteranalízishez complete linkage clustering és Manhattan féle relatív távolság módszerét alkalmaztuk.

Az ábrák elkészítéséhez, az *in vitro* sejtes kísérletes eredmények kiértékeléséhez a GraphPad Prism 6.01 szoftvert használtuk (GraphPad Software Inc.) Két csoport összehasonlításához párosítatlan, kétszélű Student-féle t-próbát használtuk Welch korrekcióval (HPLC-MS/MS mérések, életképességi teszt, élő/halott sejtszám, qRT-PCR, fehérje mennyiségi vizsgálatok). A metilációs/demetilációs státusz és génexpressziós adatok összevetéséhez Pearson korrelációs tesztet alkalmaztunk.

Az *in vitro* kísérletek mindegyikét legalább háromszor ismételtük, minden kísérletben minimum 3 biológiai párhuzamos minta alkalmazásával.

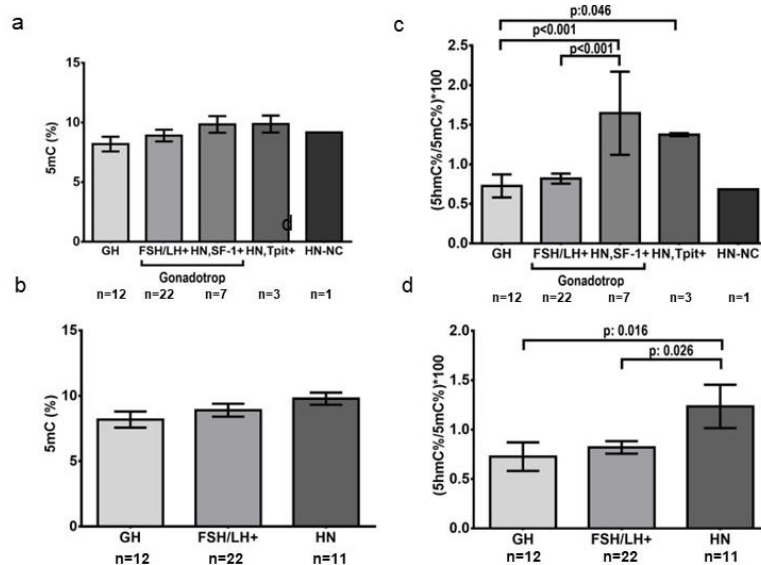
Minden statisztikai próba esetében a  $p < 0,05$  értéket tekintettük statisztikailag szignifikánsnak, az ábrázolásokhoz során a csoport átlagot, és szórását ( $\pm$ SD) használtam.

## IV. EREDMÉNYEK

### IV. 1. Hypophysis neuroendokrin daganatok vizsgálata

#### IV. 1. 1. DNS metilációs/demetilációs státusz

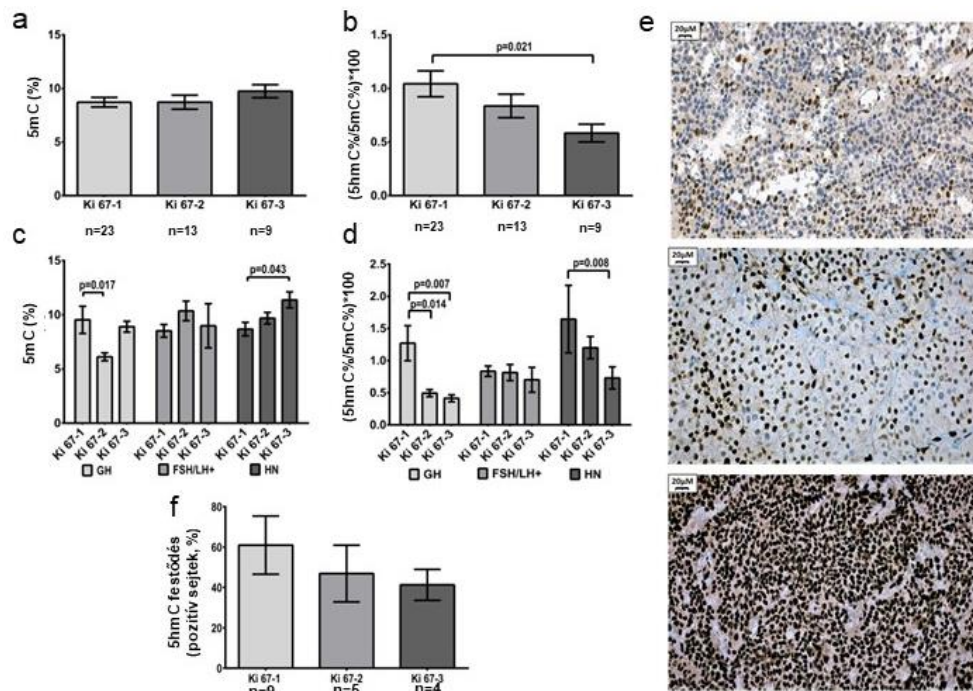
Összesen 45 PitNET mintából izolált genomi DNS frakció felhasználásával hasonlítottuk össze a különböző hisztológiai csoportok 5mC, 5hmC mennyiségét és ezek százalékos arányát (5hmC/5mC). 5mC% tekintetében nem találtunk szignifikáns eltérést a különböző hisztológiai csoportok között. Azonban az FSH/LH+ és HN minták átlagosan magasabb metilációs szintet mutattak a GH csoportnál (**3. ábra/ a-b**). Lényeges különbséget mértünk azonban 5hmC% esetében. HN-SF1+ és HN-Tpit+ csoportokban nagyobb arányban volt jelen az 5hmC, így a két intermedier aránya (5hmC%/5mC%) is magasabb volt, mint FSH/LH+ vagy GH termelő csoportokban (**3. ábra/ c- d**). A két eltérő differenciáltsági állapotú gonadotrop csoport, az FSH/LH+ és HN, SF-1+ csoportok között jelentős különbség volt ( $p < 0,001$ ) a genom demetilációs státuszában (**3. ábra/ c**).



**3. ábra Hypophysis neuroendokrin daganatok DNS metilációs/demetilációs státusza különböző szövettani csoportokban. a-b 5mC%, c-d 5hmC% és 5mC% százalékos aránya. 5hmC: 5-hidroximetilcitozin, 5mC: 5-metilcitozin, GH: növekedési hormont termelő PitNET, FSH/LH+: folliculus stimuláló hormon/luteinizáló hormon pozitív gonadotrop PitNET, HN, SF-1+: hormon negatív, steroidogen faktor 1 pozitív gonadotrop PitNET, HN, Tpit1: hormon negatív, T-box család TBX19 tagjára pozitív, corticotrop PitNET, HN-NC: hormon negatív, null sejtes PitNET [124].**

A PitNET mintákat Ki-67 proliferációs index szerint három csoportra bontottuk (Ki-67-1: 1%-2%; Ki-67-2: 3%-4%, Ki-67-3: >4%). A magas proliferációs indexű minták esetében szignifikánsan alacsonyabb volt az 5hmC%, és a két intermedier aránya (5hmC%/5mC%) ( $p=0,021$ ). Az 5mC% terén lényegi különbséget nem találtunk. Spearman féle rangkorreláció alapján negatív korrelációt állapítottunk meg a DNS demetilációs státuszát leíró 5hmC%/5mC% és a szöveteket jellemző Ki-67 proliferációs index között (Spearman  $R = -0,40$ ;  $p=0,005$ ) (4. ábra/ a-b).

Figyelembe véve a hisztológiai csoportokat és a proliferációs rátát a HN csoporton belül a korábban ismertetett tendencia érvényes (4. ábra/ c-d).



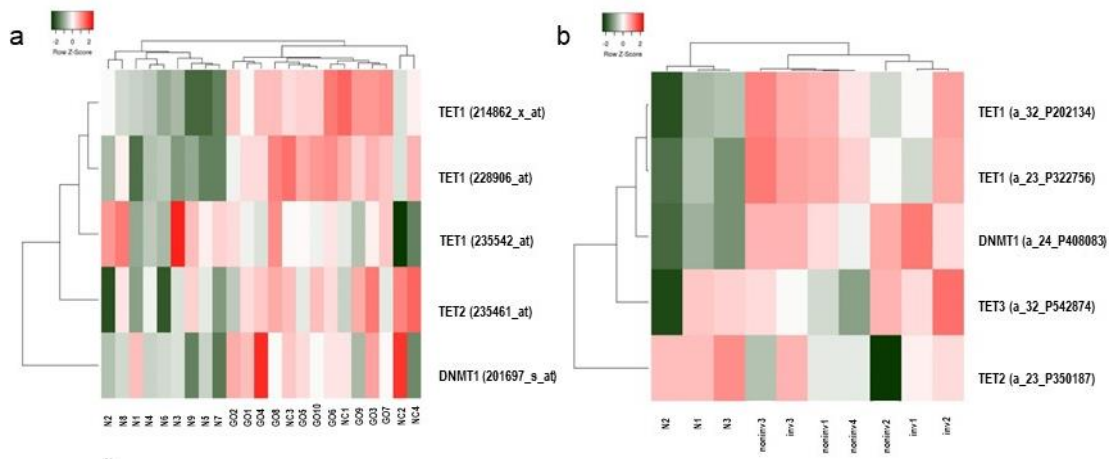
**4. ábra PitNET minták DNS metilációs/demetilációs státusza Ki-67 index függvényében. (a-d)** Szöveti minták DNS metilációs/demetilációs státusza a Ki-67 proliferációs index alapján csoportosítva. Ki-67-1: 1%-2%; Ki-67-2: 3%-4%; Ki-67-3: >4%. (c-d) A GH csoport esetében az esetszámok Ki-67-1  $n=4$ , Ki-67-2  $n=4$ , Ki-67-3  $n=4$ ; FSH/LH+ esetében: Ki-67-1  $n=16$ , Ki-67-2  $n=4$ , Ki-67-3  $n=2$ ; HN mintáknál: Ki-67-1  $n=4$ , Ki-67-2  $n=4$ , Ki-67-3  $n=3$ . (e) Immunhisztokémiai festődés a különböző proliferációs csoportoknak megfelelően. Felső: Ki-67-1-es csoport; középen: Ki-67-2-es csoport; alul: Ki-67-3-as csoport. (f) Az immunhisztokémiai vizsgálatok eredménye a proliferációs státusz szerint csoportosítva [124].

Az immunhisztokémiai vizsgálat segítségével megerősítettük eredményünket, magasabb proliferációs indexű minták esetében alacsonyabb 5hmC festődést detektáltunk (**4. ábra/ e-f**).

Leukocita frakció vizsgálata során nem találtunk eltérést a genom metiláció/demetilációs státuszában a hisztológiai csoportok, differenciáltsági állapot vagy proliferációs aktivitás alapján (**Mellékletek XII. 1.**)

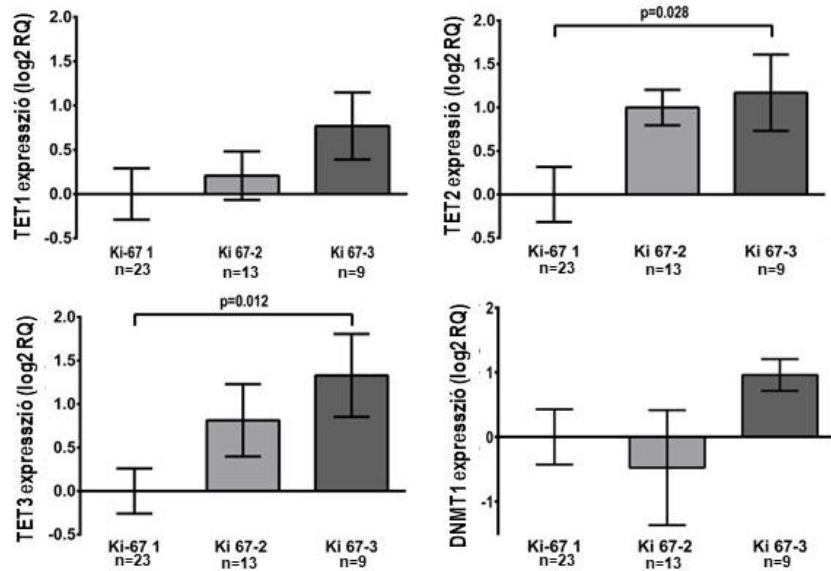
#### IV. 1. 2. A DNS metilációs/demetilációs státuszát kialakító enzimek hypophysis adenomákban

A DNMT és TET enzimes családok tagjainak expressziós mintáját elsőként korábban publikált, a Gén Expressziós Omnibusz (GSE26966 [115], GSE51618 [116]) adatsorokon vizsgáltuk. A *DNMT1* és *TET* gének profiljai egyértelműen elkülönültek a klaszteranalízis alapján (**5. ábra/ a-b**). A gének expressziója magasabb adenoma minták esetében normál szövethez képest, de hisztológia vagy invazivitás szempontjából éles határ nem fedezhető fel.



**5. ábra** *DNMT1* és a *TET* enzimes család génextpressziós profilja korábbi, gén expressziós omnibuszban (GEO) talált korábbi tanulmányok alapján ((a): GSE26966- 9 normál szövet, 10 GO, 4 NC adenoma [115]; (b): GSE51618- 3 normál szövet, 3 invazív, 4 noninvazív daganat [116]). A zöld szín az alacsonyabb, a piros a magasabb expressziós szintet jelöli. A mintákat a Ki-67 proliferációs index alapján csoportosítva. *DNMT1*: DNS metiltranszferáz 1 (DNA methyltransferase 1); *TET1-3*: tet metilcitosin dioxigenáz 1-3 (Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 1-3), *N*: normál szövet, *GO*: gonadotrop PitNET, *NC*: null sejtes PitNET [124].

A *DNMT* és *TET* enzimek expressziójának vizsgálatát az analitikai mérésekhez felhasznált saját szöveteken (n= 41) is elvégeztük kvantitatív valós idejű PCR segítségével (**6. ábra**). A *TET2* és *TET3* gének szignifikánsan nagyobb expressziót mutattak erősen proliferáló szövetek esetében (*TET2* p=0,028; *TET3* p=0,012), *TET1* esetében hasonló tendenciát állapítottunk meg szignifikáns különbség nélkül. A *DNMT1* nem szignifikáns mértékben emelkedett génexpressziót mutat erősen proliferáló szövetekben, alacsony Ki-67 indexű mintákhoz képest.

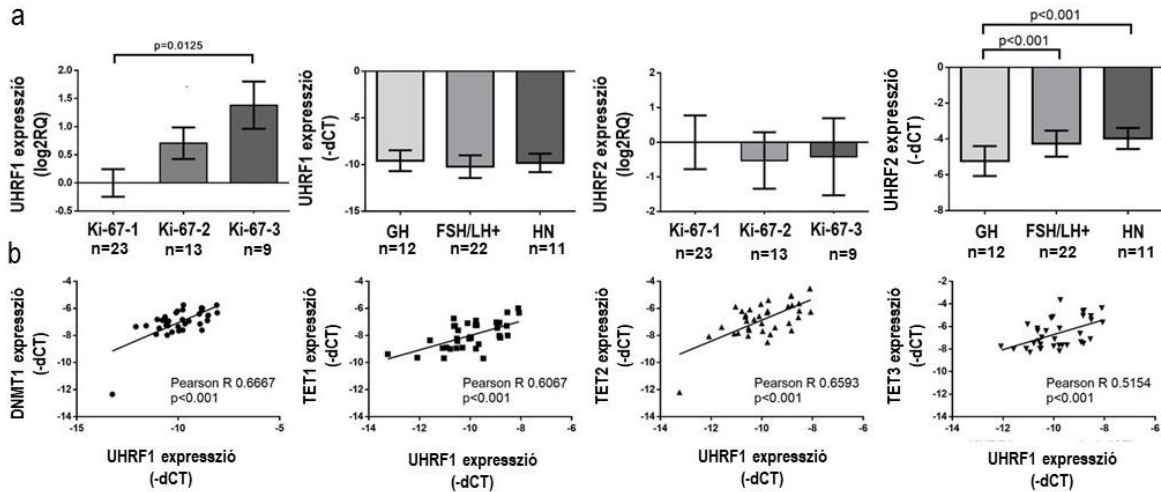


**6. ábra** *DNMT1* és *TET* enzimek génexpressziós profilja saját szöveteken végzett kvantitatív valós idejű PCR alapján. A mintákat a Ki-67 proliferációs index alapján csoportosítva. *DNMT1*: DNS metiltranszferáz 1 (DNA methyltransferase 1); *TET1-3*: tet metilcitozin dioxigenáz 1-3 (Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 1-3) [124].

A kapcsolódó *UHRF1* és *UHRF2* kofaktorok vizsgálata során különbséget találtunk a proliferáció, illetve hisztológiai besorolás tekintetében. Az *UHRF1* kofaktor esetében nem találtunk korrelációt az expresszió mértéke és a minták 5mC% mennyiségével, megállapítottuk, hogy a magas proliferációs indexű minták esetében magasabb *UHRF1* génexpresszió volt (p= 0,0125) (**7. ábra/ a**). Az *UHRF1* génexpressziója pozitívan korrelált a *DNMT1* és a három *TET* enzimével (**7. ábra/ b**). *UHRF2* kofaktor nem mutat összefüggést a minta proliferációs viselkedésével, azonban GH termelő PitNET mintákban az expressziója

szignifikánsan alacsonyabb, mint gonadotrop mintákban (GH- FSH/LH+:  $p < 0,001$ ; GH-HN, SF-1+:  $p < 0,001$ ) (7. ábra/ a). Az *UHRF2* esetében szignifikáns, pozitív korrelációt találtunk az 5hmC% szinttel (Pearson  $R=0,370$ ;  $p=0,026$ ).

Az *UHRF1* és *UHRF2* fehérjék mennyiségét immunhisztokémiai módszerrel vizsgálva nem találtunk összefüggést a hisztológiai vagy proliferációs tulajdonságok alapján ( $p= 0,1428$ ).



**7. ábra (a)** Hypophysis neuroendokrin daganatok *UHRF1* és *UHRF2* kofaktorok gén expressziója a különböző hisztológiai és proliferációs csoportokban. **(b)** Az *UHRF1* gén expressziója pozitívan korrelál a kulcsenzimek expresszióival (*DNMT1* (Pearson  $R=0,6667$ ;  $p < 0,001$ ), *TET1* (Pearson  $R=0,6067$ ;  $p < 0,001$ ), *TET2* (Pearson  $R=0,6593$ ;  $p < 0,001$ ) és *TET3* (Pearson  $R=0,5154$ ;  $p < 0,001$ )) *DNMT1*: DNS metiltranszferáz 1 (DNA methyltransferase 1); *TET1-3*: tet metilcitozin dioxigenáz 1-3 (Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 1-3), *UHRF1*: ubikvitin szerű fehérje PHD és RING Finger doménekkel 1 (Ubiquitin Like With PHD and Ring Finger Domain 1), *UHRF2*: ubikvitin szerű fehérje PHD és RING Finger doménekkel (Ubiquitin Like With PHD and Ring Finger Domain 2) [124].

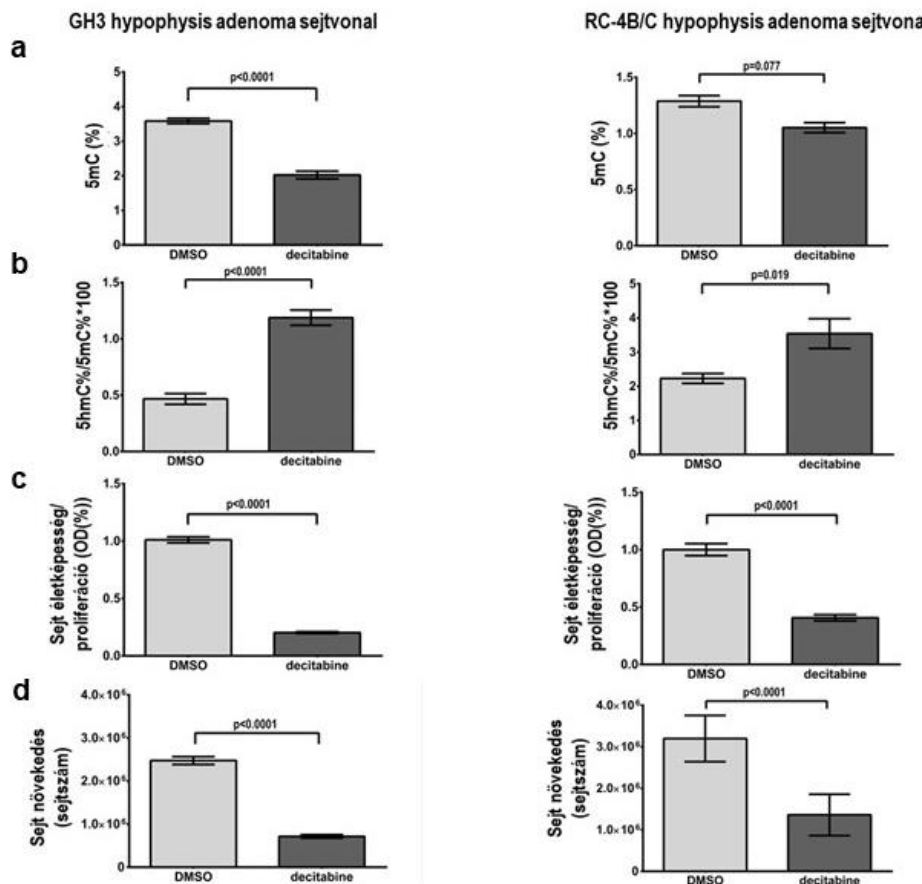
#### IV. 2. Hypophysis neuroendokrin beteges vér mintáinak metilációs profilja

Perifériás vérmintákból izolált DNS minták tömegspektrometriai vizsgálatával korrelációt kerestünk a metilációs/demetilációs státusz és a betegek klinikai adatai között. Vizsgálataink alapján nem volt összefüggés a DNS metiláltsága és a PitNET hisztológiai besorolása vagy proliferációs tulajdonsága között.



### IV. 3. *In vitro* decitabin kezelés

A szöveteken talált 5hmC szintbeli eltérések funkcionális vizsgálatához a decitabint (DNMT1 inhibitor, mely emellett jól ismert módon emeli az 5mC szintet) alkalmaztuk RC-4B/C és GH3 sejtenyészetekeken. Hatására mindkét sejtvonal esetében csökkent 5mC% szintet, és szignifikánsan emelkedett 5hmC% szintet mértünk (Rc-4B/C:  $p < 0,001$ ; GH3:  $p = 0,019$ ) a kontrollként alkalmazott DMSO kezelésen átesett sejtekhez képest (**8. ábra/ a-b**). Ezzel együtt a sejtek életképessége és proliferációja szignifikánsan csökkent az inhibitor hatására (életképesség, és viabilitás: Rc-4B/C:  $p < 0,0001$ ; GH3:  $p < 0,0001$ ) (**8. ábra/ c-d**).

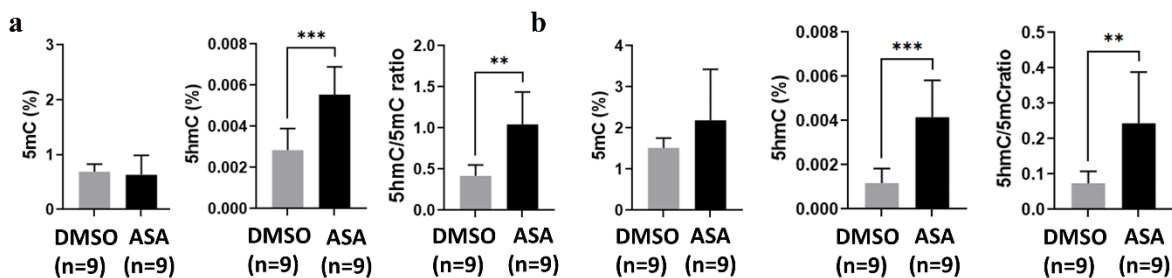


**8. ábra** Decitabin hatása *in vitro* sejtenyészetekre (RC-4B/C és GH3). (a) 5mC mennyiség, (b) 5hmC/5mC százalékos aránya, (c-d) mindkét sejtvonal esetében szignifikánsan csökkentette annak életképességét és osztódását. Csoportonként (a-b)  $n = 9$ , (c-d)  $n = 27$  [124].

#### IV. 4. *In vitro* aszpirin kezelés

##### IV. 4. 1. DNS metilációs/demetilációs státusza

A globális metilációs/demetilációs státusz változását aszpirin kezelést követően szintén HPLC-MS/MS segítségével határoztuk meg RC-4B/C és GH3 sejtvonalakon. Mindkét sejtvonalon hasonló eredményeket kaptunk. RC-4B/C esetében az 5hmC% közel kétszeresére emelkedett ( $p=0,0003$ ), a két fő intermedier aránya (5hmC/5mC) követte ezt a tendenciát ( $p=0,0012$ ) (**9. ábra /a**). GH3 sejtekben az 5hmC% emelkedése drasztikusabb, több mint háromszorosára emelkedett ( $p=0,0005$ ), ehhez hasonlóan az arányok között is nagyobb különbség ( $p=0,0078$ ) adódott (**9. ábra /b**). Az 5mC% esetében szignifikáns különbséget nem találtunk.



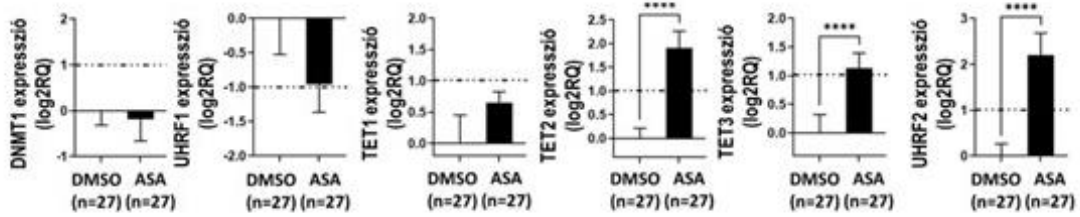
**9. ábra** Aszpirin kezelés hatása *in vitro* sejtvonalakon (a) RC-4B/C és (b) GH3. (\*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$ ) [125].

##### IV. 4. 2. A metilációs profil kialakításában fontos enzimek génkifejeződése

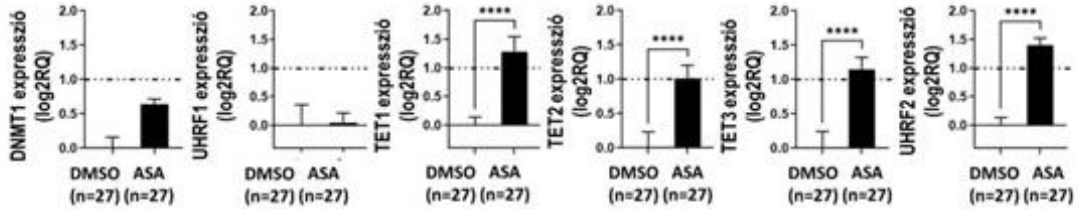
A metilációs profil kialakításában fontos enzimek génexpressziójának meghatározása RT-qPCR segítségével történt. A két sejtvonalon mért génkifejeződések tükrözik az analitikai mérési eredményeket.

Az 5mC% mennyiségét növelő *DNMT1* és *UHRF1* esetében nem tapasztaltunk változást ASA kezelés hatására (**10. ábra/ a-b**), míg az 5hmC% szintjét növelő TET enzimek tekintetében a *TET2*, *TET3*, és kofaktoruk az *UHRF2* expressziója is szignifikáns emelkedést mutat (**10. ábra/ a-b**). A TET enzimek génexpressziója pozitív korrelációt mutat az adott minta 5hmC% szintjével mindkét sejtvonal esetében (**10. ábra/ c**).

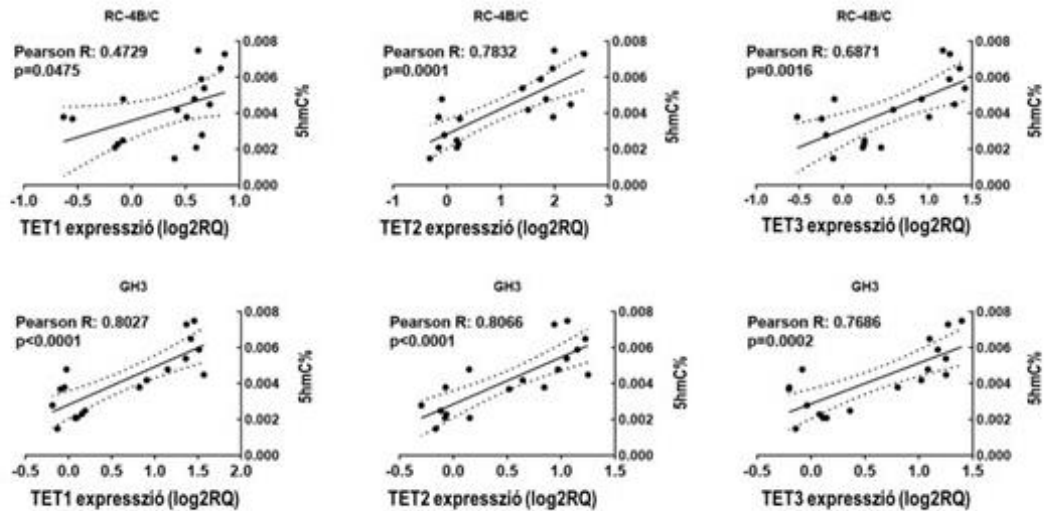
a A metilációs/demetilációs kulcsenzimek génextpressziós változásai RC-4B/C sejtvonalon



b A metilációs/demetilációs kulcsenzimek génextpressziós változásai GH3 sejtvonalon



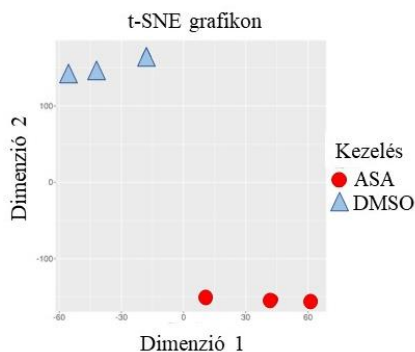
c korreláció a TET enzimek génextpressziója és az 5hmC% között



10. ábra A DNS metilációt/demetilációt katalizáló enzimek génextpressziója hypophysis adenoma sejtvonalak aszpirin kezelését követően. (a) RC-4B/C, és (b) GH3 sejtvonalokon. A TET enzimek génextpressziója és az 5hmC mennyiség közti pozitív korreláció (c) RC-4B/C és GH3 sejtvonalok esetében. DNMT1: DNS metiltransferáz 1 (DNA methyltransferase 1); TET1-3: tet metilcitozin dioxigenáz 1-3 (Ten-Eleven Translocation Methylcytosine Dioxygenase 1-3), (\*\*\*\*:  $p < 0,0001$ ) [125].

#### IV. 4. 3. Transzkriptom analízis

Újgenerációs szekvenálási technikával 2953 gént azonosítottam, melyek szintje szignifikánsan megváltozott ASA hatására (legalább kétszeres különbséggel, FDR  $p < 0,005$ ). Emellett az ASA kezelt és kezeletlen minták a teljes expressziós profil alapján is jól elkülönültek (t-SNE analízis, **11. ábra**).

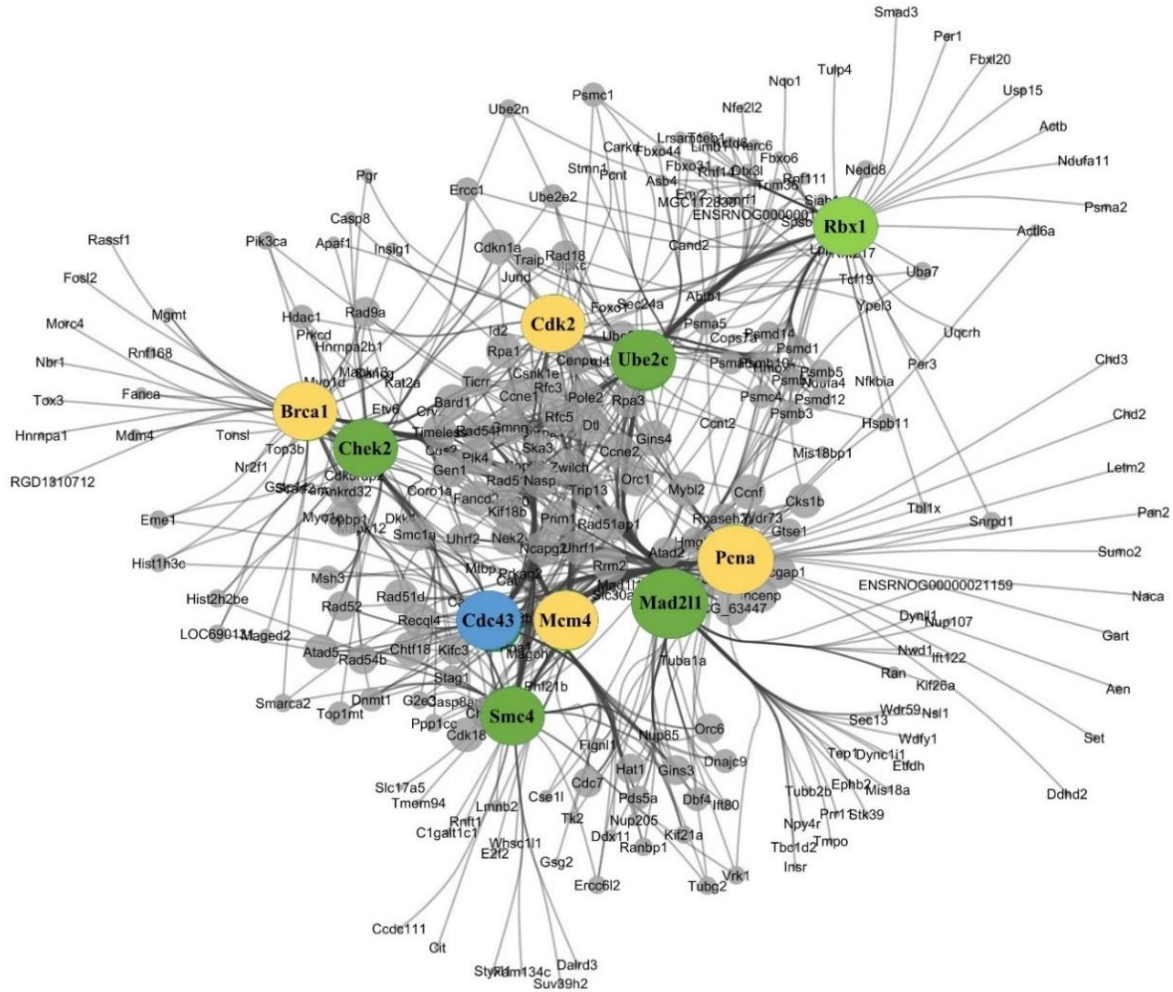


**11. ábra** Aszpirin (ASA) kezelt és kontroll (DMSO) minták expressziós profil jellemzője t-SNE analízist követően [125].

Az útvonal és gén ontológiai elemzés alapján az ASA legnagyobb mértékben a sejtciklusra volt hatással (**6. táblázat**). A géninterakciók elemzése szerint a 10 legfontosabb gén, amelyek az aszpirin daganatellenes hatását közvetíthetik transzkripcionális szinten a *Mad211*, *Pcna*, *Ube2c*, *Mcm4*, *Chek2*, *Brca1*, *Smc4*, *Cdc45*, *Cdk2*, *Rbx1*. Ezek a sejtproliferációt, sejtsztódást, a DNS stabilitást, valamint az ubikvitinizációt szabályozzák (**12. ábra**).

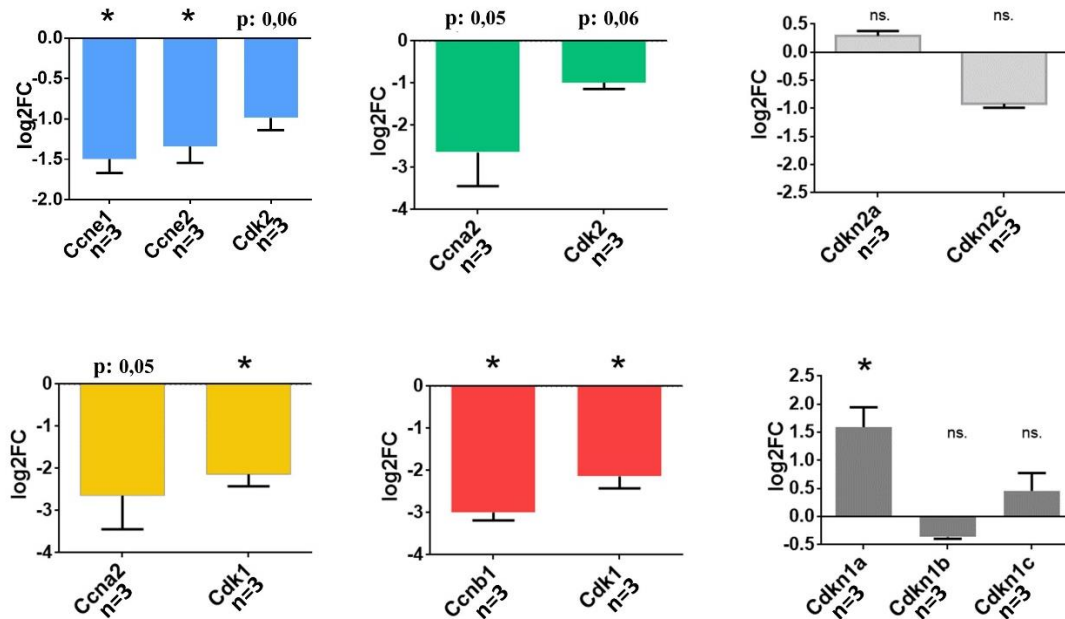
**6. táblázat** Útvonal és gén ontológia analízis első 10 releváns találatja aszpirin kezelést követően (<https://reactome.org/>)

Útvonal azonosító	Útvonal neve	Érintett gének száma	Közvetett gének száma	FDR
RNO-69278	Sejtciklus, mitózis	71	387	4,82e-06
RNO-1640170	Sejtciklus	77	449	7,19e-06
RNO-1430728	Metabolizmus	162	1330	0,00035
RNO-194315	Rho GTPáz szignalizáció	56	324	0,00035
RNO-69306	DNS replikáció	27	102	0,00035
RNO-194840	Rho GTPáz ciklus	28	117	0,00058
RNO-453279	Mitózis G1-G1/S fázis	26	103	0,00058
RNO-69002	DNS replikáció pre-iniciáció	20	65	0,00058
RNO69620	Sejtciklus ellenőrzési pontok	41	218	0,00058
RNO-68886	M fázis	48	283	0,00097



**12. ábra** *Aszpirin hatására megváltozott expressziójú gének hálózat analízise, kiemelve a legfőbb kapcsolati csomópontokat (ún. „hub”-okat) (Mad211 (Mitotic Arrest Deficient 2 Like 1), Pcna (Proliferating Cell Nuclear Antigen), Ube2c (ubikvitin konjugált enzim E2 C - Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 C), Mcm4 (minikromoszóma fenttartó komplex komponens 4 -Minichromosome Complex Component 4), Chek2 (Ellenőrző pont kináz 2 - Checkpoint Kinase 2), Brca1 (emlő és petefészek daganat hajlamosító fehérje 1- Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Protein 1), Smc4 (4-es kromoszóma struktúra fehérjéje - Structural Maintenance Of Chromosome 4), Cdc45 (sejtosztódási ciklus 45 - Cell Division Cycle 45), Cdk2 (ciklin dependens kináz 2 - Cyclin Dependent Kinase 2), Rbx1 (Ring-Box 1). A különböző színek az eltérő folyamatokban részt vevő géneket jelölik (kék: sejtosztódás, sárga: sejtproliferáció, zöld: ubikvitinizáció) [125].*

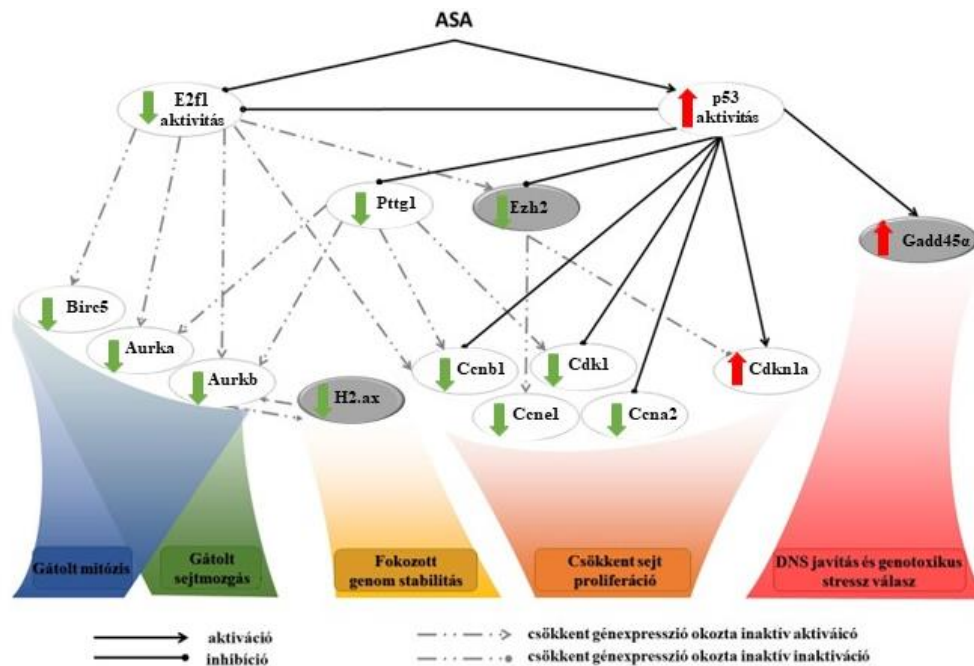
ASA hatására a *CDKN1A* (ciklin dependens kináz inhibitor 1A) emelkedett, a többi sejtciklust szabályozó ciklin és CDK csökkent mennyiségben volt jelen, melyet a csökkent *Ki-67* kifejeződés is alátámasztott ( $\log_2FC = -2,66$ ;  $p = 2,71E-04$ ) (**13. ábra**). Megváltozott expressziós profilt mutatott emellett több proliferációt és genom stabilitást biztosító gén (**7. táblázat, 14. ábra**).



**13. ábra** Az aszpirin hatására megfigyelhető csökkent proliferáció és lassult sejt ciklus mögötti génexpressziós változások. A sejtciklus egyes fázisaihoz tartozó gének különböző színnel (G1: kék; S: zöld; G2: sárga; M: piros), a sejtciklust gátló fehérjék szürke színnel szerepelnek az ábrán. Ccne1: ciklin E (Cyclin E), Cdk2: ciklin dependens kináz 2 (Cyclin Dependent Kinase 2). Ccna: ciklin A (Cyclin A), Cdkn2a: ciklin dependens kináz inhibitor 2A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A), Cdkn2c: ciklin dependens kináz inhibitor 2C (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C), Ccnb1: ciklin B (Cyclin B), Cdk1: ciklin dependens kináz 1 (Cyclin Dependent Kinase 1), Cdkn1a: ciklin dependens kináz inhibitor 1A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A), Cdkn1b: ciklin dependens kináz inhibitor 1B (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1B), Cdkn1c: ciklin dependens kináz inhibitor 1C (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1C) [125].

7. táblázat Aszpirin transzkriptomikai hatása a genom stabilitásra és proliferációra

Gén	Expresszió változás (log <sub>2</sub> CPM)	FDR
<i>Tp53</i>	-0,403135161	0,475431307
<i>E2F1</i>	-1,699322161	0,017677985
<i>Birc5</i>	-1,669861341	0,002634309
<i>Aurka</i>	-2,693827176	0,000112511
<i>Aurkb</i>	-1,994711397	0,009565016
<i>Pttg1</i>	-2,359268022	3,27562E-05
<i>H2ax</i>	-1,59	5,86E-03
<i>Ezh2</i>	-1,187080264	0,067119053
<i>Ccnb1</i>	-2,995668611	1,09241E-06
<i>Ccne1</i>	-1,533242072	0,015933026
<i>Ccna2</i>	-2,642928343	0,050601632
<i>Cdk1</i>	-2,137090443	0,000341413
<i>Cdkn1a</i>	1,591983374	0,003852956
<i>Gadd45a</i>	1,907358455	0,000777632



14. ábra Aszpirin hatása transzkriptomikai szinten a genomi stabilitásra, proliferációra.

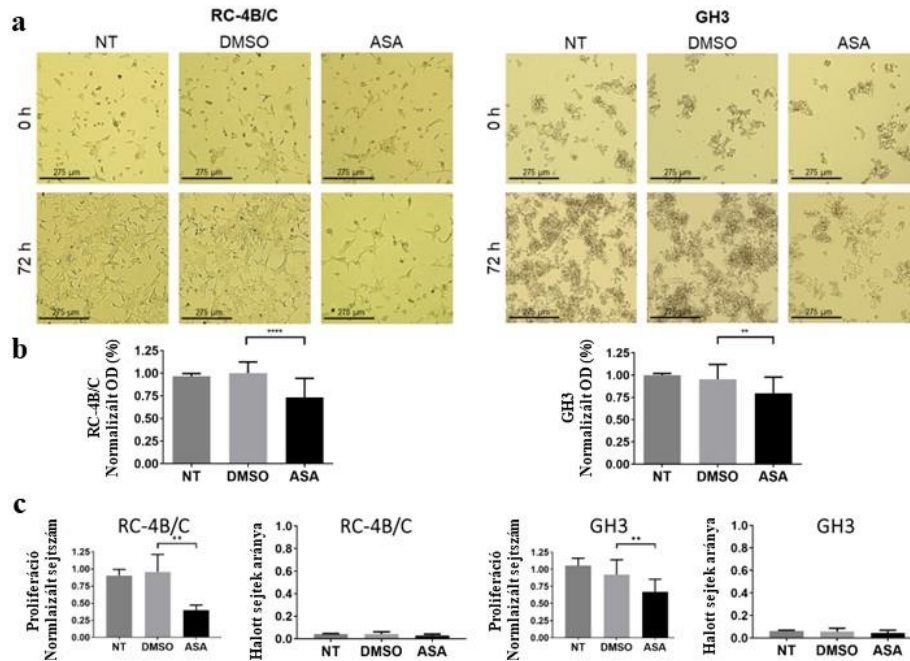
ASA: aszpirin; *Pttg1*: pituitary tumor transforming gene 1; *Ezh2*: enhancer of Zeste Homolog 2; *Birc5*: bakulovirális apoptózis fehérje inhibitor 5 (Baculoviral IAP Repeat Containing 5); *Aurka*: Aurora Kinase A; *Aurkb*: Aurora Kinase B; *H2ax*: H2a.x Variant Histone; *Ccnb1*: ciklin B1 (Cyclin B1); *Ccne1*: ciklin E (Cyclin E); *Cdk1*: ciklin dependens kináz 1 (Cyclin Dependent Kinase 1); *Ccna2*: ciklin A2 (Cyclin A2); *Cdkn1a*: ciklin dependens kináz inhibitor 1A (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A); *Gadd45a*: növekedést gátló DNS károsodás indukált fehérje 45a (Growth arrest and DNA Damage Inducible 45a) [125].

#### IV. 4. 4. *In vitro* funkcionális vizsgálatok

A transzkriptomika eredményeit *in vitro* sejtenyészeteken végzett funkcionális vizsgálatokkal ellenőriztük.

Elsőként megbizonyosodtunk arról, hogy a DMSO, mint szerves oldószer nem fejt-e ki a használt koncentrációban citotoxikus hatást. Megfigyeléseim alatt nem tapasztaltam lényeges eltérést sem sejt morfológiában, sem a sejtek viabilitását tekintve (**15. ábra/ a**).

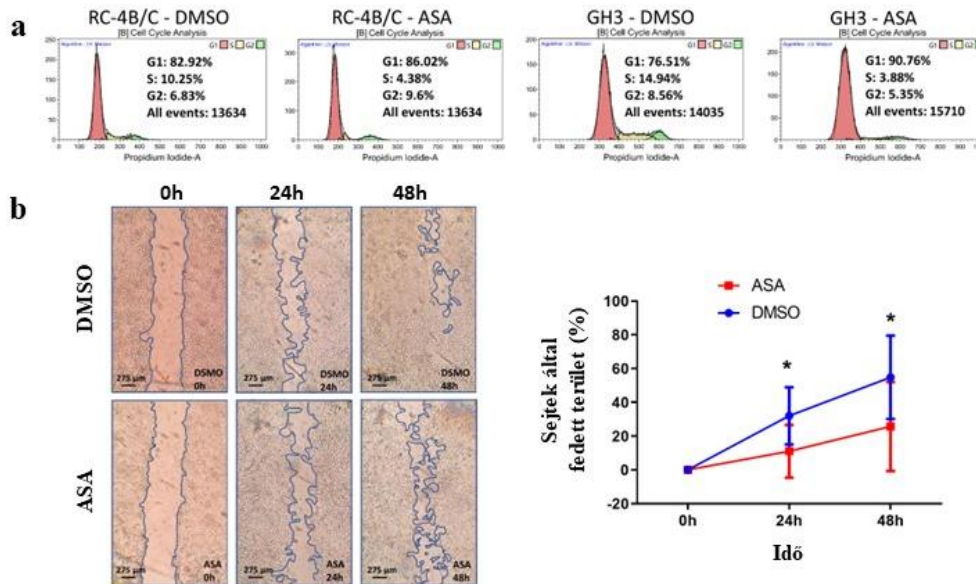
Az RC-4B/C sejtvonalon végzett kísérletek során ASA kezelés hatására szignifikánsan csökkent sejt számot találtunk (46,5%,  $p < 0,00001$ ), emellett a halott sejtek száma elenyésző mértékben emelkedett (**15. ábra/ a**). A GH3 sejtek esetében az ASA kisebb mértékben csökkentette a viabilitást (19,3%,  $p = 0,0028$ ) (**15. ábra/ b**), a halott sejtek aránya az RC-4B/C sejteknél tapasztaltnál volt hasonló.



**15. ábra Aszpirin hatásának validálása *in vitro* sejtenyészeteken.** (a) Morfológiai változások nem figyelhetők meg DMSO vagy ASA hatására. (b) Csökkent proliferáció következtében csökkent jelintenzitás (OD%) ASA kezelés hatására a kontroll mintákhoz képest (kezeletlen, DMSO). (c) ASA hatására csökkent élő sejtszám, proliferáció (RC-4B/C: 46%,  $p < 0,0001$ ; GH3: 80%  $p = 0,028$ ). A halott sejtek számában lényegi eltérés nincs, citotoxikus hatás vagy apoptózis nem figyelhető meg [125].



Az áramlási citometriával végzett sejtciklus elemzés ASA kezelést követően csökkent sejtszámot mutatott S fázisban (Rc-4B/C: ASA: 4,38%, DMSO: 10,25%; GH3: ASA: 2,88%, DMSO: 14,94%) (**16. ábra/ a**). A Ki-67 proliferációs marker fehérjét festve szintén szignifikáns különbséget találtunk ASA kezelést követően (Rc-4B/C: ASA: 0,09%, DMSO: 0,34%; GH3: ASA: 0,34%, DMSO: 1,48%). Az RC-4B/C plurihormonális sejtvonal esetében csökkent migrációs hajlamot mértünk ASA kezelést követően kontroll tenyészetéhez képest (**16. ábra/ b**). (A GH3 sejtvonalon ez nem volt vizsgálható a sejt non-adherens tulajdonsága miatt.)



**16. ábra (a)** Áramlási citometriával végzett sejtciklus elemzés. Csökkent számú sejtben indul el a sejtosztódás folyamata és kevesebb az S fázisban levő sejtek száma ASA kezelést követően DMSO kontroll mintákhoz képest Rc-4B/C (DMSO: 10,25%; ASA: 4,38%) és GH3 (DMSO: 14,94%; ASA: 3,88%) sejtvonalakon. **(b)** ASA kezelés hatására csökkent a sejtek migrációs hajlama 24 óra (34%,  $p=0,01$ ) és 48 óra (47%,  $p=0,02$ ) elteltével [125].

#### IV. 4. 5. Az aszpirin transzkripciós faktorokon keresztüli hatása

A transzkriptomikai adatok felhasználásával vizsgáltuk az aszpirin hatását a transzkripciós faktorok aktivitására. Az elemzés során 12 transzkripciós faktornál állapítottam meg megváltozott aktivitást. Legjelentősebb hatást a Tp53 a génexpressziós változások alapján a Tp53 fehérje aktivitásában találtunk (**8. táblázat**). Ezek közül legjelentősebb hatást a Tp53

fehérjén találtunk. Elemzésünk alapján ASA kezelést követően a Tp53 célfehérjéi közül 25 esetben mértünk szignifikáns expressziós különbséget (**9. táblázat**). Ezek közül a *Pttg1* ( $\log_2FC = -2,36$ ; FDR  $p = 3,275E-05$ ), és a *Birc5* ( $\log_2FC = -1,72$ ; FDR  $p = 0,052$ ) expresszióját csökkentette, míg a *Gagg45a* ( $\log_2FC = 1,90$ ; FDR  $p = 0,0007$ ) emelkedett mennyiségben volt jelen. A *Birc5* mennyiségére közvetetten, az E2F1 transzkripciós faktoron keresztül fejtette ki hatását (**9. táblázat**)

**8. táblázat Aszpirin kezelést követően RNS profil alapján megváltozott aktivitású transzkripciós faktorok.**

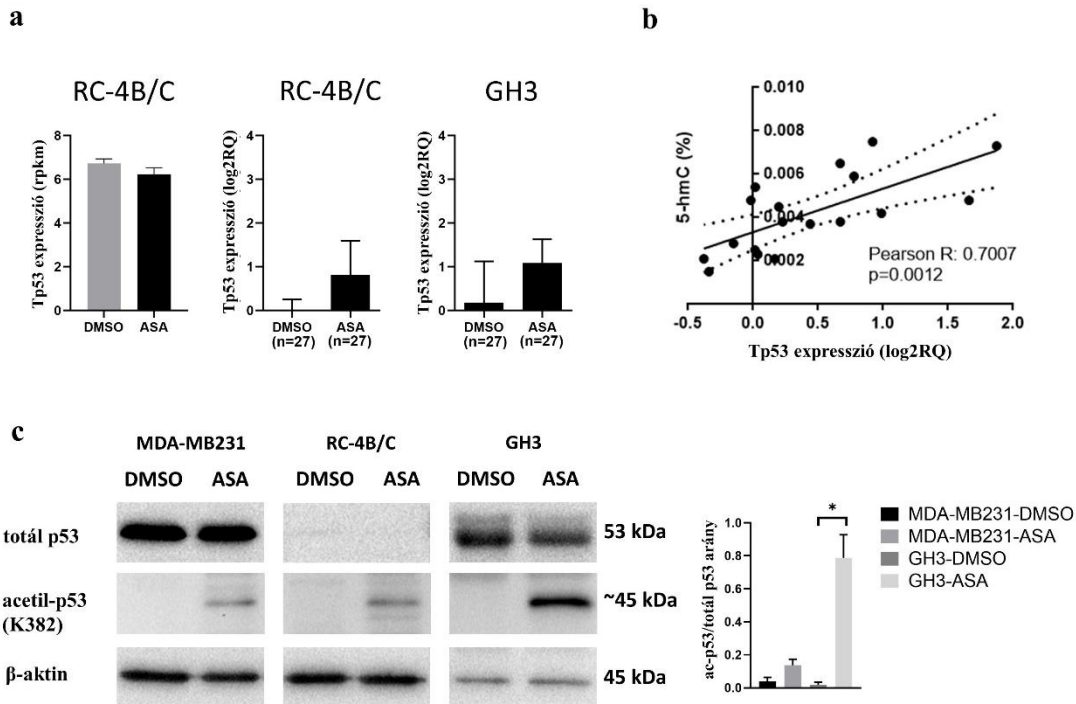
Transzkripciós faktor	P érték	Korrigált P érték	Transzkripciós faktor által szabályozott fehérjék
TP53	9,244E-9	5,28E-06	<i>MCM7; MKI67; FOXM1; AQP3; EGFR; RECQL4; CCNB1; PTTG1; GPNMB; CHEK2; CASP3; E2F7; PDGFRB; PLK3; SMAD3; GADD45A; GDF15; PLK1; CCNA2; PRC1; CDK1; CRYAB; ATF3; MAD1L1; EZH2</i>
E2F1	8,646E-8	2,47E-05	<i>TOP2A; RRM1; RRM2; HSPA5; PLK1; FANCA; CDC6; FOXM1; AURKB; AURKA; DHFR; CCNB1; RAD51; CHEK2; DDIT3; CDK1; MYBL2; KIF2C; MCM5; ECT2; ASF1B</i>
E2F4	1,851E-6	3,52E-04	<i>PLK4; CCNB1; RAD51; PLK1; PCLAF; MCM10; TTK; AURKB</i>
E2F3	5,498E-6	7,85E-04	<i>CCNA2; CCNB1; PLK1; CDK1; CDC6; AURKA</i>
TRP53	1,265E-5	0,001445	<i>PDGFRB; DUSP4; PLK3; SMAD3; MCM7; GADD45A; GDF15; INSR; FOXM1; CKS1B; CCNA2; PER2; CCNB1; GAP43; KRT19; COL2A1; CASP3; PCBP2; PTGDS; ATF3</i>
E2F4	2,181E-5	0,002076	<i>PLK4; MAP1LC3B; RAD51; E2F2; MYBL2</i>
TFAP2A	1,144E-4	0,009333	<i>ACHE; CCNB1; CRABP2; GALNT3; TH; CYP11A1; MCAM; CGA; ADRA1A; CRYAB; EGFR</i>
ATF1	2,953E-4	0,021081	<i>TOP2A; LDHA; MAP1LC3B; TH; SLC20A1; CGA</i>
ATF4	4,086E-4	0,025929	<i>MAP1LC3B; HSPA5; DDIT3; TRIB3; NDC80; ATF3; DDR2</i>
TFDP1	4,440E-4	0,025353	<i>DHFR; RRM1; CDK1; MYBL2</i>
XBP1	7,446E-4	0,038652	<i>ERN1; HSPA5; GAD1; DDIT3; ERP29</i>
ARNT	9,602E-4	0,045694	<i>JUN; GAD1; BHLHE40; AHR; MFSD2A</i>

A Tp53 megváltozott aktivitásának alapja nem a megváltozott génexpresszió, mivel szignifikáns különbséget nem találtunk aszpirin kezelés hatására ( $p = 0,475$ ). Azonban a *Tp53*

génexpressziója pozitív korrelációt mutatott a minták 5hmC% mennyiségével (17. ábra/ b). Ennek alapján a két mért mennyiség között összefüggés állhat fent.

**9. táblázat Expressziós változások a p53 fehérje által szabályozott gének esetében.**

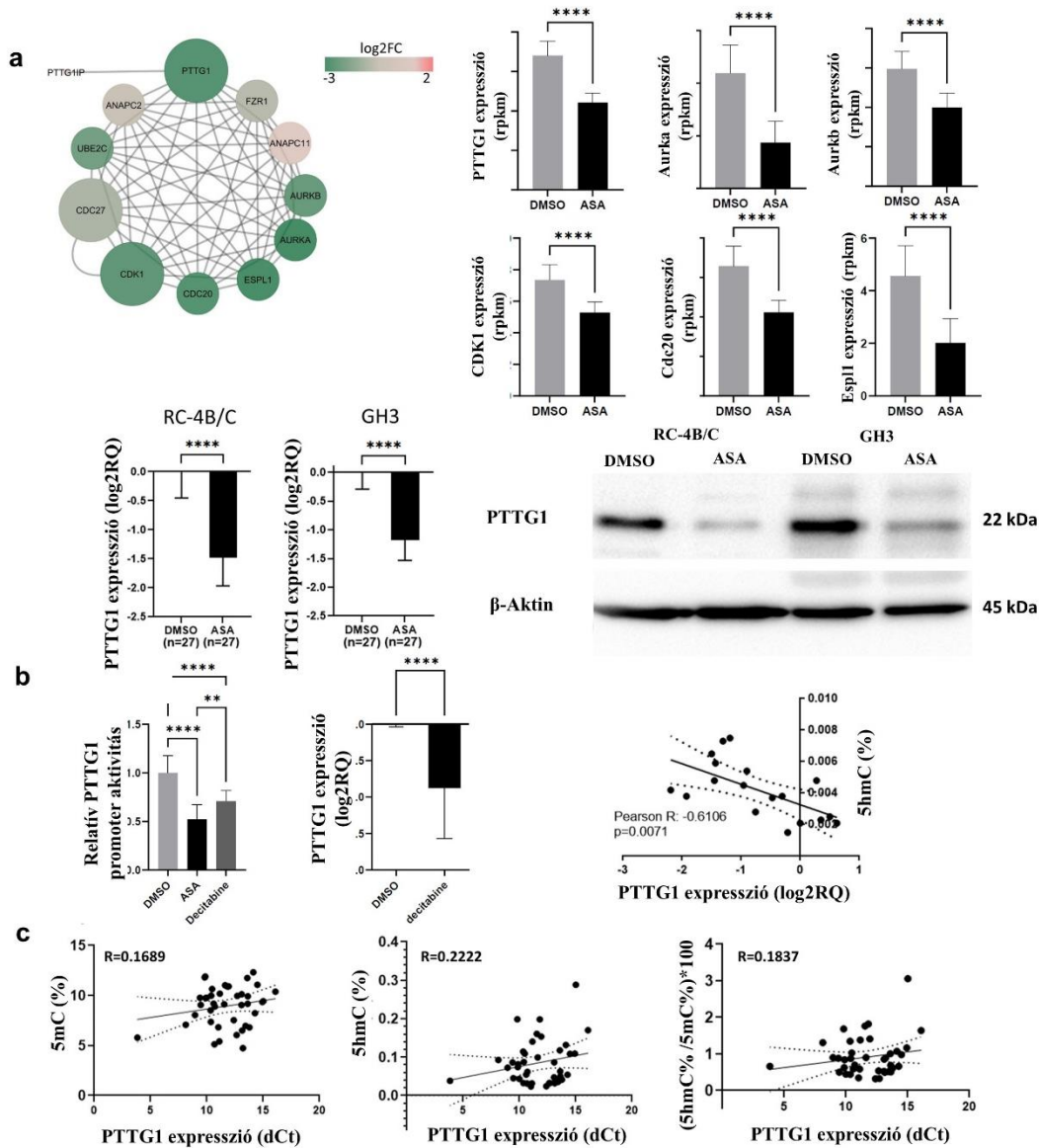
Gén	Gén azonosító	log2FC	p-érték	FDR
<i>Aqp3</i>	ENSRNOG00000009797	-2,30422	5E-05	0,001157
<i>Atf3</i>	ENSRNOG00000003745	3,484486	1,43E-08	1,8E-06
<i>Casp3</i>	ENSRNOG00000010475	-2,04182	1,61E-06	6,51E-05
<i>Ccna2</i>	ENSRNOG00000015423	-2,64293	0,02121	0,050602
<i>Ccnb1</i>	ENSRNOG00000058539	-2,99567	9,47E-09	1,09E-06
<i>Cdk1</i>	ENSRNOG0000000632	-2,13709	1,25E-05	0,000341
<i>Chek2</i>	ENSRNOG00000037509	-1,37363	0,0324	0,083205
<i>Cryab</i>	ENSRNOG00000010524	2,61213	0,000107	0,002052
<i>E2f7</i>	ENSRNOG00000026252	-3,02489	0,000156	0,002484
<i>Egfr</i>	ENSRNOG00000004332	1,951245	0,000199	0,003023
<i>Ezh2</i>	ENSRNOG00000006048	-1,18708	0,01809	0,067119
<i>Foxm1</i>	ENSRNOG00000005936	-2,53223	1,17E-06	5,55E-05
<i>Gadd45a</i>	ENSRNOG00000005615	1,907358	3,82E-05	0,000778
<i>Gdf15</i>	ENSRNOG00000019661	2,696207	2,61E-06	0,000124
<i>GpnmB</i>	ENSRNOG00000008816	2,678566	3,31E-08	2,54E-06
<i>Mad11l</i>	ENSRNOG00000001265	-1,90029	0,000841	0,009182
<i>Mcm7</i>	ENSRNOG00000001349	-2,1472	2,97E-05	0,000535
<i>Mki67</i>	ENSRNOG000000028137	-2,66258	1,47E-05	0,000271
<i>Pdgfrb</i>	ENSRNOG00000018461	2,073018	0,002211	0,014145
<i>Plk1</i>	ENSRNOG00000018815	-2,84073	7,04E-09	8,9E-07
<i>Plk3</i>	ENSRNOG00000018484	1,98987	8,11E-06	0,000296
<i>Pprc1</i>	ENSRNOG00000018561	-0,15577	0,587733	0,749968
<i>Pttg1</i>	ENSRNOG00000003802	-2,35927	5,87E-07	3,28E-05
<i>Recql4</i>	ENSRNOG000000032446	-1,78421	0,000247	0,00399
<i>Smad3</i>	ENSRNOG00000008620	1,545729	0,001247	0,009008
<i>Tp53</i>	ENSRNOG00000010756	-0,40314	0,300957	0,475431



**17. ábra (a)** *Tp53* expresszió változása a transzkriptom adatokban és RT-qPCR segítségével mérve. **(b)** A *Tp53* génexpressziója pozitív korrelációt mutat a minta ASA kezelés következtében megváltozott 5hmC% tartalmával. **(c)** A *Tp53* fehérje mennyiségi vizsgálat eredménye. A *p53* összmenyisége nem változik ASA kezelés hatására, emelkedett mennyiségben van jelen a K382 helyen acetilált *p53* forma, aránya a teljes *Tp53* fehérje mennyiséghez viszonyítva GH3 sejtekben [125].

#### IV. 4. 6. Az aszpirin és a demetilációs státusz hatása a *Pttg1* génexpressziójára

A *Pttg1* a *Tp53* által szabályozott fehérjék egyike, emellett a hypophysis egyik fő onkogénje, ezért képezte további vizsgálataink tárgyát. Megállapítottuk, hogy mind a *Pttg1*, mind az aktivitásához szükséges interakciós fehérje (*Pttg1ip*) expressziója csökken ASA kezelést követően (**18. ábra/ a**). A transzkriptomikai elemzés eredményét, miszerint a *Pttg1* mennyisége mind fehérje mind mRNS szinten csökken igazoltam *in vitro* (**18. ábra/ a**). RC-4B/C sejtekben a fehérje mennyisége körülbelül felére ( $49\% \pm 2\%$ ), GH3 sejtekben harmadára ( $31\% \pm 22\%$ ) csökken (**18. ábra/ a**).



**18. ábra (a)** Aszpirin kezelést követően a *Pttg1* és interakciós fehérjéinek génexpressziós változásai. A *Pttg1* csökkent mennyisége mRNS és fehérje szinten q-RT-PCR és Western blot segítségével vizsgálva. **(b)** A *Pttg1* promotor aktivitás változás luciferáz riporter rendszerrel vizsgálva aszpirin és decitabin kezelést követően. **(c)** Humán szövetek *Pttg1* expressziós vizsgálata. Annak ellenére, hogy nem találtunk összefüggést a citozin intermedierek mennyisége és *Pttg1* génexpressziója között, *in vitro* negatív korreláció állt fent a *Pttg1* expresszió és a minták 5hmC% tartalma között 95%-os konfidencia intervallummal ábrázolva [125].

A *Pttg1* expressziós szintű downregulációját *Pttg1* promoter luciferáz riporter rendszerben vizsgáltuk aszpirin és decitabin kezelést követően (**18. ábra/ b**). Mindkét farmakon csökkentette eltérő mértékben a *Pttg1* promoterének aktivitását (**18. ábra/ b**). ASA kezelést követően negatív korrelációt állapítottunk meg a *Pttg1* génexpressziója és a minta 5hmC% mennyisége között (**18. ábra/ b**).

A humán PitNET minták *Pttg1* expressziója és a genom metilációs/demetilációs státusza között nem találtunk összefüggést (**18. ábra/ c**).

#### IV. 4. 7. Aszpirin által szabályozott gének diszregulációja PitNET mintákban

Az *in vitro* aszpirin kezelést követően megállapított összefüggéseket humán hypophysis neuroendokrin daganatok vonatkozásában korábbi transzkriptom és fehérje expressziós adatokon is validáltuk. Ehhez összesen 76 PitNET és 34 normál szövetminta eredményét használtuk fel. A normál és daganatos mintákban eltérő expressziójú 1620 gént vetettük össze az aszpirin által befolyásoltakkal. Ezeknek több, mint ötöde 22,2% (360 gén - **10. táblázat**) mutatott átfedést. A gének többsége a sejtproliferációt, a sejtciklust és p53 aktivitást befolyásolja, de hatással van a sejtek migrációjára és a genom stabilitásra is.

**10. táblázat PitNET mintákban és aszpirin által diszregulált közös gének elemzése, B&H:** Benjamin-Hochberg FDR korrekció (1) MSigDB C2 BIOCARTA (v7,3); (2) BioSystems: Pathway Interaction Database; (3) BioSystems: KEGG; (4) BioSystems: REACTOME.

	Név	q-érték, FDR, B&H	Szabályozott gének/útvonalak	Szabályozott gének aránya	Forrás
p53 szabályozás	p53 szignalizáció	3,436E-2	5/16	0,3125	(1)
	Közvetett p53 effektor	4,214E-2	15/132	0,113636	(2)
Proliferáció és sejtosztódás útvonalai	Retinoblasztoma	1,025E-6	21/88	0,238636	(1)
	DNS szál hosszabbodás	1,024E-4	11/32	0,34375	(4)
	DNS replikáció	1,217E-3	10/36	0,277778	(3, 1)
	Nukleáris SMAD2/3 szignalizáció	8,391E-3	13/77	0,168831	(2, 1)
	DNS replikáció	3,436E-2	14/111	0,126126	(4)
	Sejtciklus	3,436E-2	15/124	0,120968	(3, 1)
	G1/S sejt ciklus szabályozás	3,436E-2	10/64	0,15625	(1)
Genom stabilitás	ATR aktivitás és replikációs stressz	2,230E-2	8/37	0,216216	(4)

## V. MEGBESZÉLÉS

Az elmúlt évtizedekben a különböző daganatok iniciációjának, progressziójának háttérben a különböző epigenetikai változásokat, ezek közül is kiemelten a DNS metilációját, demetilációját vizsgálták.

Kutatásom során a hypophysis neuroendokrin daganatok epigenetikai változásait vizsgáltam.

A hypophysis neuroendokrin daganatok a harmadik leggyakoribb intrakraniális daganatok. Gyakorisága ellenére a sporadikus PitNET többségének háttérben a kialakulás oka és annak pontos mechanizmusa mai napig sem ismert. Mivel a genetikai változások csak a daganatok töredékére jellemzőek, így egyre nagyobb figyelem helyeződik a patomechanizmus feltárásának érdekében az epigenetikai vizsgálatokra. Az epigenetikai módosulások közül kiemelten vizsgált a DNS metilációja [126].

### V. 1. Hypophysis neuroendokrin daganatok metilációs/demetilációs státusza

Hypophysis neuroendokrin daganatokban korábban publikált lokális és globális vizsgálatok a dedikált régiókra vonatkozóan szolgáltatottak adatot. Emellett pedig a metiláció ellentétes folyamata a demetiláció egyáltalán nem volt vizsgált a két folyamat dinamikus egyensúlyának ellenére sem, elsősorban technikai nehézségek miatt. Kutatásom során az érzékeny és intermedier specifikus HPLC-MS/MS módszerrel az 5mC mellett elsőként vizsgáltuk az 5hmC-t. A két intermedier arányának segítségével a DNS demetilációs profiljára vonatkozó összefüggéseket is elemezni tudtuk. PitNET-ek kapcsán először került vizsgálatra a teljes genomi állomány módosult citozin (5mC és 5hmC) mennyiségének mérése.

Irodalmi példák alapján a karcinogenezis korai stádiumában megfigyelhető genomi hipermetiláció főként a promoterek CpG régióit érinti, gyakran olyan tumorszupresszoroknál, mint *VHL*, *CDKN2A*, *RASSF1A* [3]. Habár az array technikán alapuló kutatások a különböző hisztológiai csoportok esetében számottevő változásokról számoltak be, ezek egyfelől a különböző vizsgálatokban nem egységesek, másrészt a globális DNS metilációs státuszát illetően saját kutatásunk során sem azonosítottunk tendenciózus, szignifikáns eltérést a genomi 5mC% szintben [97–100, 124]. Ennek a különbségnek az oka

lehet a különböző elven alapuló technikák használata, és az ebből eredő citozin intermedier elkülönítése vagy az eltérő genomi lefedettség, illetve a globális és célzott mérések összehasonlíthatatlansága. Az egyetlen, szintén UHPLC-MS/MS-t használó kutatásban a teljes genom 5mC% szintjében szintén nem találtak eltérést normál hypophysis és PitNET minták összehasonlítása során [127]. Ez erősíti azt az eredményeinken alapuló feltevést, hogy PitNET-ek esetében a tumor iniciációja szempontjából a DNS metilációja helyett a demetiláció és annak szabályozása lehet a meghatározó.

Az 5mC mellett a legnagyobb mennyiségben jelenlevő, legmarkánsabb és legstabilabb citozin intermedier az 5hmC. A DNS demetilációs státuszára annak 5hmC% mennyiségéből, valamint az 5mC%-hez viszonyított arányából következtettünk. Az 5hmC mennyisége a szövetek közül az agyban a legmagasabb [22], de nagy mértékben függ a szövet mitotikus aktivitásától és differenciáltsági fokától is. Az alacsonyabb differenciáltsági állapotú, multipotens embrionális őssejtek esetében (hESC) a demetiláció markánsabb, mint a differenciáció későbbi szakaszában [128]. Emellett alapvetően csökkent mennyiségben van jelen daganatos sejtek esetében [22]. Ezzel egybehangzó eredményeket kaptunk, a hormon negatív (HN), alacsonyabb differenciálódási fokú minták esetében magasabb 5hmC% és 5hmC%/5mC% arányt mértünk a hormon pozitív FSH/LH+ és GH+ daganatokhoz képest. Ezen felül a gonadotrop csoporton belül a HN, SF-1+ minták a demetiláció irányába jobban eltoltak (magasabb 5hmC%/5mC% arány), mint az FSH/LH pozitív minták.

A másik tényező, ami nagyban befolyásolja a genom metilációs/demetilációs státuszát a sejtek osztódóképessége, proliferációja. Szöveti mintáink esetében a mitotikus aktivitás mérésére Ki-67 proliferatív fehérje szemikvantitatív immunhisztokémiás meghatározását használtuk. Korábbi megfigyelések alapján erősen proliferáló sejtek esetében az 5hmC csökkent mennyiségben van jelen a vékonybél kripta sejtjeiben [129], a többrétegű laphám bazális sejtjeiben [129] vagy egér embriók neurális progenitor sejtjeiben [130]. Ezt a megállapítást munkám során PitNET minták esetében is igazoltam. Méréseink alapján a magas Ki-67 fehérje mennyiség csökkent demetilációs státusszal (5hmC% és 5hmC%/5mC% arány) társul. Ez a tendencia a GH, illetve HN hisztológiai csoportokra vonatkoztatva külön-külön is megfigyelhető.



A DNS abnormalis metilációja kimutatható például szérumban, vizeletben, de akár köpet mintából is [3]. Korábban prosztata és végbél karcinómák, és különböző leukémiás megbetegedések (CLL, ALL, MM) esetében találtak összefüggést a szöveti mellett a vérből izolált leukocita frakciót vizsgálva a DNS metiláció és a betegség prognózisa között [131–133]. PitNET-ek esetében míg prognosztikus biomarkerként jelölték meg a keringő cfDNS (cell free DNA) frakciót [134], azonban a leukocitákból izolált DNS esetében a metilációs/demetilációs profilban ilyen összefüggést nem találtunk.

Annak vizsgálatára, hogy mi eredményezi a szöveti DNS metilációs státuszának változását, mértük a kialakításban részt vevő enzimek (*DNMT1* és *TET1/2/3*) valamint kofaktoraik (*UHRF1/2*) génexpresszióját. A már ismertett összefüggések miatt főként a proliferációs index szerinti csoportok tekintetében vizsgáltuk az eltéréseket.

A *DNMT1*, ami az örökletes metilációs mintázat kialakításában játszik szerepet, így kulcsfontosságú a mindenkori metilációs mintázat fenttartásában [19]. Irodalmi adatok alapján általánosságban a fokozott DNMT génexpresszió rosszabb prognózissal társul daganatos megbetegedéseknél. PitNET mintákban enyhén emelkedett DNMT expressziót mértek normál szövetekhez képest, agresszív daganatok esetében jelentősebb az eltérés, de a beteg korától, nemétől és a proliferációs indextől független [135]. Saját mintákon végzett vizsgálatok és a GEO adatbázisból kinyert adatok ezzel egybehangzóak: nem mutatnak szignifikáns eltérést a proliferációs index, a hisztológiai csoportosítás vagy invazivitás szerint a felhasznált adatok alapján [115, 116, 135].

A vizsgált dioxigenáz TET enzimekről rendelkezésre álló információ PitNET minták esetében elenyésző. Munkám során a magas Ki-67 pozitivitást mutató szöveteknél, ahol a genomi 5hmC% szint csökkent, magasabb *TET1/2/3* génkifejeződést mértem. Az általunk felismert tendenciát, ahol is a magas *TET* expresszió csökkent 5hmC% szinttel társul korábban vese daganatoknál mutatták ki. Az enzim látszólagos gátlását a felhalmozódott onkometabolit (2-hidroxiglutarát) inhibíciójával magyarázták [136]. PitNET-ek esetében az eltérő tendenciák okának feltárása további vizsgálatokat igényel.

Az *UHRF1* és *UHRF2* kofaktorok, melyek a DNMT és TET enzimek működésének lokalizációját biztosítják, ezáltal a DNS metilációs/demetilációs mechanizmusának alapjai nagyfokú homológiájuk ellenére funkciójukban nem redundánsak [19]. Az *UHRF1* metilációs kofaktor a *CDKN2A*, *CCNA1* fehérjék szabályozása alatt áll, szorosan kapcsolódik a sejtciklushoz, proliferációhoz, valamint kapcsolatot biztosít a DNS metiláció és a hiszton módosulások között [137, 138]. Eredményeink az irodalomban leírtakhoz hasonlóak, vagyis erősen proliferáló szövetek esetében magasabb az *UHRF1* génexpressziója. Az *UHRF2* kofaktor nagyobb affinitással köti az 5hmC-t, ezáltal a demetilációt segíti elő [139]. A különböző proliferatív sajátságú szövetek esetében nem találtunk eltérést az *UHRF2* gén expressziójában, azonban több más kutatáshoz hasonlóan [140] pozitív korrelációt mutattunk ki az 5hmC% mennyisége és a kofaktor expressziója között. Ezek alapján az intermedierekhez hasonlóan a metilációs/demetilációs kofaktorok is potenciális markerei a proliferációs viselkedésnek [138, 141].

## V. 2. *In vitro* decitabin kezelés

A decitabin hipometilációs farmakon, melynek hatására megváltozik a sejtek génexpressziós profilja. Ennek oka a direkt promoter hipometiláció és az ebből adódó indirekt hatások, mivel a decitabin közvetlen hatást gyakorol a hiszton acetilázokra és metilázokra. Ezen hatások eredményeként megváltozik a sejtciklus, a proliferációs és apoptotikus hajlam [41]. A hipometilációs tulajdonsága a genom 5mC% szintjének csökkenése mellett az 5hmC% szint növekedésével jár együtt a *TET* enzimek génexpresszió változása nélkül *in vitro* humán leukémia sejtvonalakon (HL-60, TK6) [142]. Eredményeink a hypophysis daganatokban ezekkel egybehangzóak, csökkent 5mC%, valamint emelkedett 5hmC% társult csökkent életképességgel és proliferációs hajlammal. A decitabint összetett, a DNS metiláción keresztül a fehérjeprofilra gyakorolt hatása alkalmassá teheti a terápia rezisztens PitNET-ek kezelésére.

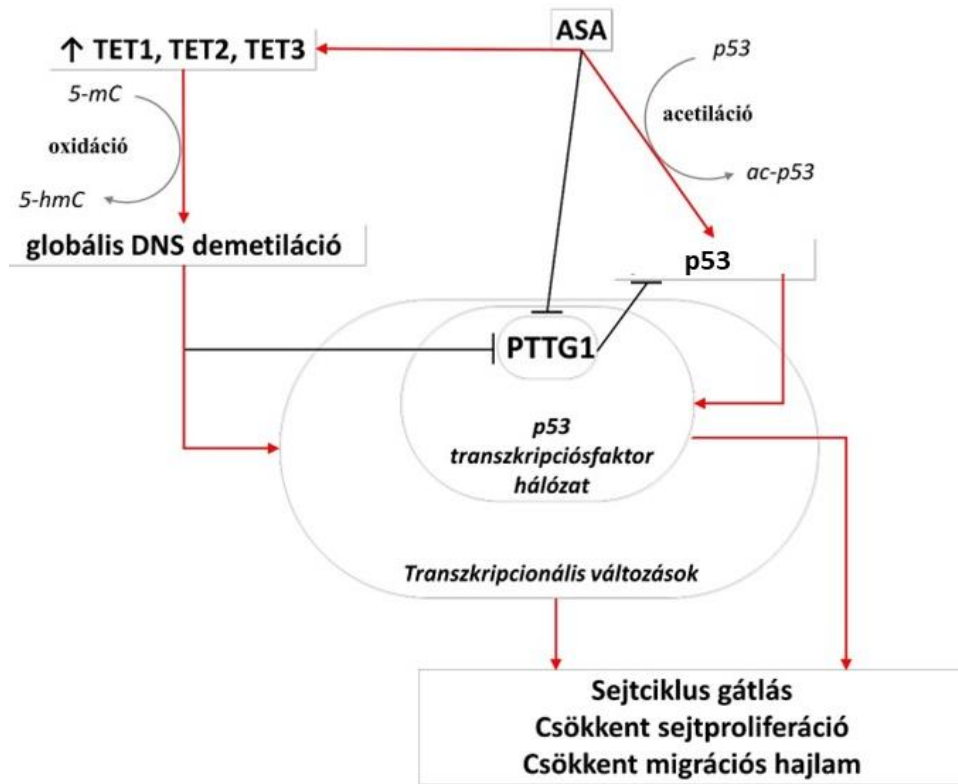
## V. 3. *In vitro* aszpirin kezelés

Az aszpirin egy régóta használt fájdalom és gyulladáscsökkentő szer, melynek egyéb jótékony hatásai közül ismert a daganat prevenció hatása [143, 144]. Ezeket a hatásokat proteomikai és epigenetikai szinten is vizsgálják, de a pontos mechanizmus a mai napig nem

tisztázott [145, 146]. Ennek pontosabb megismerésére végeztem vizsgálatokat hypophysis neuroendokrin tumorokon és sejtvonalakon, korábbi munkánk folytatásaként [44].

Az irodalomban több tumortípus esetében beszámoltak az aszpirin hatásaként csökkent DNS metilációról globális, valamint lokálisan szinten, tumorszupresszorok (*FOXD3*- Forkhead Box D3) és metasztázisban fontos gének (*CDHI*- Cadherin 1) promoter régiójában [45, 147]. Ezt az összefüggést nem minden esetben tudták igazolni [45, 148]. Pan és munkatársai a NSAID (NonSteroidal Anti-Inflammatory Drug; NS398) kezelést követő promoter demetiláció hátterében csökkent *DNMT* génexpressziót találtak *in vitro* tüdő karcinóma sejtvonalakon (A549) [149]. Irodalmi adatok a többi citozin intermedier mennyiségére vonatkozóan aszpirin kezelést követően nem állnak rendelkezésre.

Saját vizsgálataink alapján az aszpirin hatására a genom abszolút 5mC% mennyisége lényegesen nem változik, az 5hmC% szintjében és a két intermedier arányában viszont jelentős különbség van. A korábban leírt DNS metiláz expressziós változást vagy az *UHRF1* kofaktor mennyiségi változását sem tudtuk igazolni, egybehangzóan az 5mC% változatlan mennyiségével. A HPLC-MS/MS mérésekkel egybehangzóan a demetilációt katalizáló *TET* enzimek és az *UHRF2* kofaktor is fokozott expressziót mutatnak mRNS szinten. Ez az emelkedett génexpresszió pozitívan korrelál a genom 5hmC% mennyiségével. A korábban említett *FOXD3* gén kapcsán írtak le olyan mechanizmust, melyben aszpirin hatására a *FOXD3* promoter demetilációja emelkedett, a gén fokozott kifejeződését idézve elő, ami közvetetten csökkent metasztatikus aktivitással járt [147]. Vizsgálataink alapján *Pttg1* fehérje esetében hasonló összefüggés állhat fent. Aszpirin hatására a csökkent *Pttg1* promoter aktivitás csökkent génexpresszióval társul, ami negatív korrelációt mutat a genom 5hmC% mennyiségével. A promoter aktivitás csökkenése decitabin kezelést követően is megfigyelhető. Ez alapján felmerül annak a lehetősége, hogy a korábban ismertetett *FOXD3* génhez hasonlóan a *Pttg1* génexpresszió változása részben az aszpirin kezelés hatására bekövetkező demetiláció következménye (**19. ábra**).



**19. ábra ASA genomikai és epigenetikai hatásának összefoglalása. A demetiláció-PTTG1-Tp53 szabályozó kör.** PitNET mintákban emelkedett TET génexpresszió révén fokozott a demetiláció. A metilációs státuszváltozás következtében megváltozott transzkripcionális aktivitás része a PTTG1 csökkent aktivitása. Emellett az ASA önmagában is csökkenti a PTTG1 promoterének aktivitását, valamint acetilálja a p53 fehérjét, ezáltal fokozza annak stabilitását [150]. A PTTG1 fehérje gátolja a p53 aktivitását, és csökkenti annak stabilitását [151]. ASA kezelés követően ezen hatások együttesen okozzák a tapasztalat sejtciklus, proliferáció és életképesség gátlást, valamint a csökkent migrációs hajlamot [125].

A mért globális demetiláció eredménye a megváltozott génexpressziós profil, amit teljes transzkriptom szekvenálással vizsgáltam. Aszpirin hatására megváltozott mennyiségben jelenlevő gének ötöde (22,2%) mutat átfedést a hypophysis neuroendokrin daganatokban diszreguláltakkal. ASA hatására legmarkánsabban a sejtciklust szabályozó fehérjék változnak annak gátlását, lassítását eredményezve. Emellett a sejtsztódásra és a hipofízis sejtek migrációjára van hatással az aszpirin elemzésünk alapján. Ezeknek az eltéréseknek az igazolását *in vitro* funkcionális vizsgálatokkal is elvégeztük. ASA hatására a megváltozott sejtciklus (ASA hatására emelkedett arány G1 fázisban, az S és G2 fázisokban csökkent a

sejtek aránya, gátolt a G1/S fázisátmenet) csökkent sejtszámot, proliferációt és migrációs aktivitást eredményezett, összességében alacsonyabb Ki-67 fehérje szinttel. A csökkent proliferáció és a kezelés után megfigyelhető erős demetilációs aktivitás megegyezik azzal a tendenciával, amit korábban humán PitNET szöveteken végzett vizsgálataink során találtunk [124]. Az *in vitro* vizsgálatok során tapasztalt migrációs változás háttérében például a csökkent Pttg1 szabályozó fehérje következtében csökkent mennyiségben jelenlevő *Aurka* és *Aurkb* fehérjék állnak. Az *Aurka* a sejt motilitását szabályozza, az *Aurkb* a daganatos sejtek csökkent migrációjáért felel **(19. ábra)** [152, 153].

A transzkriptomikai elemzés részeként olyan transzkripciós faktorokat kerestünk, amik aktivitás változásuk révén magyarázatul szolgálhatnak a megváltozott sejtciklusra vagy demetilációs státuszra. Legnagyobb számban a Tp53 és E2F1 transzkripciós faktorokhoz köthető gének voltak jelen **(19. ábra)**. Az E2F1 a sejtciklust a G1/S fázis átmenetnél szabályozza annak ciklinjein keresztül, emellett fontos szerepe van a DNS replikációban, javításban és az apoptózisban [65]. Az mRNS profil alapján az E2F1 aktivitása ASA hatására csökken, amit az *in vitro* funkcionális vizsgálatok is megerősítettek. A p53 sejtciklus szabályozó fehérje aktivitása az E2F1-gyel szemben emelkedik. Kutatásunk alapján a p53 fokozott aktivitása nem a génexpresszió megváltozásának köszönhető. A fokozott p53 aktivitás az ASA, mint acetilálószer általi módosításra, a 382-es lizin aminosav acetilálására vezethető vissza. Korábbi vizsgálatok alapján ez a módosítás fokozza a fehérje stabilitását és transzkripciós aktivitását [150]. Emellett a p53 fehérje expressziója pozitív korrelációt mutat a genom 5hmC% mennyiségével. Korábbi eredményeink alapján az 5hmC% a csökkent proliferációs aktivitás jele. A két megfigyelés közti kapcsolat magyarázza a fokozott p53 aktivitást, melynek célfehérjéi között szerepel a például a *CDKN1A* (*p21*) [154]. ASA kezelést követően PitNET mintáinkon is emelkedett a CDKN1A expresszió, feltehetően a p53 szabályozásának köszönhetően. Korábban H1 hiszton és variánsai kapcsán állapították meg hogy mennyiségük, és a kromoszómába való beépülésük eltérő indukált pluripotens sejtek és differenciált sejtek között. Abból, hogy a H1 mennyisége magas a kevésbé differenciált szövetekben arra következtettek, hogy ez a hiszton a sejt differenciálódásának folyamatában kulcsfontosságú [155]. Transzkriptomikai elemzésünk során a globális

hisztonmennyiség és a *H2.ax* hiszton variáns génexpressziós szintjében találtunk lényeges csökkenést aszpirin kezelés hatására. A *H2.ax* hiszton variáns a DNS károsodáshoz kapcsolódó útvonalak és folyamatok nagy részének központi eleme [156], így a csökkent mennyisége feltételezésünk szerint az aszpirin genom stabilitásra gyakorolt pozitív hatásának jele.

A PTTG1 onkogén, másnéven szekurin a testvér kromatidok elválasztását szabályozó fehérje. Hatással van a sejtosztódásra, a sejtciklus szabályozásra, a DNS károsodásra és javításra, sejt transzformációra, így meghatározó a daganat kialakulásában és növekedésében is. Elsőként hypophysis szövetből került izolálásra, de emelkedett a génexpressziója többek között emlő-, tüdő- és vastagbélrák esetében is. A PitNET minták közel 90% százalékában fokozottan expresszált a normál szövetekhez képest [157, 158]. ASA kezelést követően a Pttg1 mennyisége csökken. Ezt mRNS szinten új generációs szekvenálással és egyedi RT-qPCR vizsgálattal, fehérje szinten pedig western blottal is igazoltam. Ezek megerősítik azt a megfigyelésünket, miszerint transzkripcionális szinten a Pttg1-hez, mint szabályozó fehérjéhez köthető fehérjék szintén csökkent mennyiségben vannak jelen (**19. ábra**).

A p53 és a PTTG1 kölcsönösen szabályozzák egymást. A p53 a *PTTG1* expresszióját befolyásolja, míg a PTTG1 és interakciós fehérjéje, a PTTG1IP befolyásolják a p53 fehérje stabilitását (**19. ábra**). A két fehérje (p53 és PTTG1) mennyisége negatív korrelációt mutat fej és nyak laphámsejtes karcinómák esetében, ahol a magas szöveti *PTTG1* génexpressziója csökkent túléléssel társult. Ez a PTTG1 egyik, p53-mal összefüggő útvonalának zavarára vezethető vissza [151]. A PTTG1 mellett a p53 fehérje által szabályozott más fehérjék is megváltozott mennyiségben vannak jelen. Például a GADD45 $\alpha$  downregulációján keresztül a PCNA fehérjével való interakcióban csökkenti a proliferációt, DNS javítási mechanizmusok zavarát, és globális genomi demetilációt eredményez [159].

## VI. KÖVETKEZTETÉS

A doktori képzésemhez kapcsolódó munka fő következtetései:

1. Elsőként vizsgáltuk hypophysis neuroendokrin daganatok teljes genomi állományának metilációs/demetilációs státuszát, kialakulásuk okát és összefüggésüket klinikopatológiai tényezőkkel:

a. A hypophysis daganatok szöveti differenciáltsági fokának függvényében eltolt a metiláció-demetiláció folyamata a demetiláció irányában (emelkedett 5hmC és 5hmC/5mC arány).

b. A genom 5hmC% mennyisége összefügg a proliferációs viselkedéssel, magasabb Ki-67 proliferációs marker mennyiség esetében a kisebb mértékű a demetiláció.

c. A hypophysis neuroendokrin daganatokban fokozott demetiláció hátterében felmerült annak lehetősége, hogy a megváltozott demetilációs státuszt az annak kialakításában kulcsfontosságú *TET* enzimek és *UHRF2* kofaktor megváltozott génexpressziója magyarázhatja.

d. Egyéb daganatokkal ellentétben a hypophysis neuroendokrin daganatok klinikopatológiai paraméterei nem mutatnak összefüggést a betegek leukocita DNS metilációs státuszával.

2. *In vitro* sejttenyészeteken vizsgáltam a demetilációt befolyásoló ágensek hatását hypophysis neuroendokrin daganatokban:

a. Decitabin (DNMT gátló, 5hmC szintet emelő klinikumban alkalmazott gyógyszer) hatására a hypophysis neuroendokrin tumorsejtekben emelkedik az 5hmC szintje, mellyel párhuzamosan csökken a proliferációs aktivitás. Ezek alapján a decitabin felmerülhet, mint potenciális kezelési lehetőség terápia rezisztens PitNET-ek esetében.

b. A decitabin mellett kevésbé agresszív, nem szteroid gyulladáscsökkentő aspirin a DNS metilációjának egyensúlyát szintén a demetiláció irányába tolja el és ezzel összefüggésben csökkent sejtproliferációt eredményez PitNET sejtekben. Ez a tendencia a kialakítást végző enzimek és kofaktoraik génexpresszióján is tükröződik.

c. Az aspirin, vizsgálataink alapján, antiproliferatív hatását több szinten fejti ki, melynek hátterében elsőként írtuk le a demetiláció/PTTG1/p53 szabályozó kört. Az Aspirin

tehát 1. *TET* enzimek expresszióján keresztül demetilációt eredményez, 2. promoter szinten gátolja a *PTTG1* expresszióját, és 3. acetiláción keresztül hozzájárul a p53 fehérje fokozott aktivitásához. Emellett, 4. a demetiláción keresztül is befolyásolja a *PTTG1* expresszióját, mely szintén kölcsönhatásban van a p53 működéssel.

d. Mindezek alapján az aszpirin alkalmazása, mint potenciális daganatgátló szer, szintén felmerülhet hypophysis daganatok terápiája során.



## VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A hypophysis neuroendokrin daganatok a gyakori intrakraniális daganatok közé tartoznak. A magas esetszám ellenére nagy hányaduk, s kifejezetten a nemfunkcionáló daganatok kialakulásának oka, és patogenezise tisztázatlan. Ezen ismeretek hiánya a betegség kezelésének nehézségét és a kiújulásának kockázatát nagyban növelik. Doktori képzésem során sporadikus humán hypophysis neuroendokrin daganatok vizsgálatával kerestem olyan DNS metilációs változásokat, melyek segíthetnek megismerni a tumorigenezis folyamatát. A szerzett ismeretek alapján olyan potenciális ágenseket vizsgáltam, amelyek segítséget nyújthatnak a daganat progrediálásának megakadályozásában. Elsőként vizsgáltam a teljes genomi állomány citozin intermediereinek mennyiségét, és egymáshoz viszonyított arányát. A specifikus és szenzitív analitikai módszer felhasználásával analizáltam a hypophysis neuroendokrin daganatok metilációs/demetilációs profilját. Megállapítottam, hogy a demetilációs folyamatok a meghatározóak ebben a daganattípusban. Mértéke összefügg a differenciáltsági fokkal és a proliferációs index-szel, valamint a különböző hisztológiai csoportok esetében is eltérést mutat. A különböző metilációs profil kialakulásának oka, vizsgálataink alapján a kialakító enzimek, és kofaktorainak megváltozott expressziója, aminek változása szoros összefüggést mutat a fő demetilációs citozin intermedier mennyiségével (5hmC). Megállapítottam, hogy a demetilációs farmakon, a decitabin a DNS metilációjának gátlásával csökkenti *in vitro* hypophysis adenoma sejttenyészetek életképességét és sejtosztódását, ezáltal felmerül, mint potenciális alternatíva terápia rezisztens, inoperábilis daganatok esetében. Emellett *in vitro* vizsgáltam az aszpirin epigenetikai hatásait hypophysis adenoma sejtekre. Vizsgálataim alapján az aszpirin egyebek mellett a DNS demetilációjára gyakorol pozitív hatást, melynek háttérében szintén a kialakító TET enzimek és kofaktoruk megváltozott expressziója állhat. Emellett elsőként írtunk le a demetiláció/Pttg1/p53 szabályozó kör működését. Transzkriptomikai elemzéseim alapján aszpirin hatásra megváltozik a p53 és E2F1 transzkripciós faktorok aktivitása, és a részben általuk is szabályozott PTTG1 onkogén expressziója. Ennek eredményeként kedvező hatást gyakorol a sejtek viabilitására, osztódására és migrációs hajlamára. A PTTG1, mint központi hypophysis onkogén mennyiségét az aszpirin transzkripciós szinten közvetlenül is gátolja, ami az aszpirin daganatellenes hatásának alapja lehet hypophysis adenoma sejtek esetében.

## VIII. SUMMARY

Pituitary neuroendocrine tumours (PitNETs) are one of the most common intracranial tumor types. Although the high prevalence, the reason of the sporadic tumor formation and the exact tumorigenesis are still unclear in the most cases. The lack of knowledge, especially in case of nonfunctioning tumors, makes the treatment challenging, particularly in invasive or lately diagnosed cases. During my PhD work I investigated the changes of global DNA methylation/demethylation of sporadic pituitary neuroendocrine tumours, which can help to understand the pathogenesis, and the potential application of epigenetic drugs. For the first time I analysed the amount and ratio of cytosine intermediers on whole genome scale. Using the specific and sensitive analytical method (HPLC-MS/MS) I determined the DNA methylation/demethylation profile of PitNETs. The proportion of methylation and demethylation is association with the rate of differentiation, proliferation and histology, typically in these tumours demethylation is dominant. In the background of the altered profile of gene expression of key enzymes and their cofactors could have been revealed. These changes are in line with the altered level of 5-hydroxymethylcytosine, which is the main demethylation intermedier. I showed that the demethylation agent Decitabine decreased the cell viability and proliferation of pituitary adenoma cells *in vitro*, so it could be considered as a potential therapeutic option in therapy resistant or inoperable PitNETs. I also measured epigenetic effects of acetylsalicylic acid (ASA) on pituitary adenoma cells *in vitro*. ASA affected DNA demethylation positively, which may be mediated by activity changes of TET enzymes and their cofactors. Besides, the transcriptional analysis showed altered activity of p53, E2F1 transcription factors, and revealed the central role of aspirin in the inhibition of PTTG1. We described for the first time in the literature the methylation/demethylation/Pttg1/p53 regulatory network. By these, aspirin resulted in decreased cell proliferation, viability and migration of pituitary cells. ASA decreased the amount of PTTG1, an important pituitary oncogene, both of mRNA and protein level, which could be the main antitumoral effect of ASA on PitNET cells.

**IX. IRODALMI JEGYZÉK**

- [1] S. Ezzat, S. Cheng and S.L. Asa, Epigenetics of pituitary tumors: Pathogenetic and therapeutic implications, *Mol Cell Endocrinol.* 469 (2018), 70–76.
- [2] S. Biswas and C.M. Rao, Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy, *Eur J Pharmacol.* 837 (2018), 8–24.
- [3] J.G. Herman and S.B. Baylin, Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation, *N Engl J Med.* 349 (2003), 2042–2054.
- [4] R.S. Illingworth and A.P. Bird, CpG islands - ‘A rough guide,’ *FEBS Lett.* 583 (2009), 1713–1720.
- [5] L.D. Moore, T. Le and G. Fan, DNA Methylation and Its Basic Function, *Neuropsychopharmacology.* 38 (2013), 23–38.
- [6] A.M. Deaton and A. Bird, CpG islands and the regulation of transcription, *Genes Dev.* 25 (2011), 1010–1022.
- [7] A.P. Bird, CpG-rich islands and the function of DNA methylation, *Nature.* 321 (1986), 209–213.
- [8] A. Bird, DNA methylation patterns and epigenetic memory, *Genes Dev.* 16 (2002), 6–21.
- [9] A.K. Maunakea, R.P. Nagarajan, M. Bilenky, T.J. Ballinger, C. D’Souza, S.D. Fouse, B.E. Johnson, C. Hong, C. Nielsen, Y. Zhao, G. Turecki, A. Delaney, R. Varhol, N. Thiessen, K. Shchors, V.M. Heine, D.H. Rowitch, X. Xing, C. Fiore, M. Schillebeeckx, S.J.M. Jones, D. Haussler, M.A. Marra, M. Hirst, T. Wang and J.F. Costello, Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters, *Nature.* 466 (2010), 253–257.
- [10] Y. Yin, E. Morgunova, A. Jolma, E. Kaasinen, B. Sahu, S. Khund-Sayeed, P.K. Das, T. Kivioja, K. Dave, F. Zhong, K.R. Nitta, M. Taipale, A. Popov, P.A. Ginno, S.

- Domcke, J. Yan, D. Schübeler, C. Vinson and J. Taipale, Impact of cytosine methylation on DNA binding specificities of human transcription factors, *Science*. 356 (2017), eaaj2239.
- [11] M.G. Goll, F. Kirpekar, K.A. Maggert, J.A. Yoder, C.-L. Hsieh, X. Zhang, K.G. Golic, S.E. Jacobsen and T.H. Bestor, Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2, *Science*. 311 (2006), 395–398.
- [12] U. Aapola, K. Kawasaki, H.S. Scott, J. Ollila, M. Vihinen, M. Heino, A. Shintani, K. Kawasaki, S. Minoshima, K. Krohn, S.E. Antonarakis, N. Shimizu, J. Kudoh and P. Peterson, Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family, *Genomics*. 65 (2000), 293–298.
- [13] F. Lyko, The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation, *Nat Rev Genet*. 19 (2018), 81–92.
- [14] M. Bostick, J.K. Kim, P.-O. Estève, A. Clark, S. Pradhan and S.E. Jacobsen, UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells, *Science*. 317 (2007), 1760–1764.
- [15] H. Hashimoto, J.R. Horton, X. Zhang, M. Bostick, S.E. Jacobsen and X. Cheng, The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix, *Nature*. 455 (2008), 826–829.
- [16] M.G. Goll and T.H. Bestor, Eukaryotic cytosine methyltransferases, *Annu Rev Biochem*. 74 (2005), 481–514.
- [17] M. Tahiliani, K.P. Koh, Y. Shen, W.A. Pastor, H. Bandukwala, Y. Brudno, S. Agarwal, L.M. Iyer, D.R. Liu, L. Aravind and A. Rao, Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science*. 324 (2009), 930–935.

- [18] S. Ito, L. Shen, Q. Dai, S.C. Wu, L.B. Collins, J.A. Swenberg, C. He and Y. Zhang, Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine, *Science*. 333 (2011), 1300–1303.
- [19] J. An, A. Rao and M. Ko, TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers, *Exp Mol Med*. 49 (2017), e323.
- [20] C.G. Spruijt, F. Gnerlich, A.H. Smits, T. Pfaffeneder, P.W.T.C. Jansen, C. Bauer, M. Münzel, M. Wagner, M. Müller, F. Khan, H.C. Eberl, A. Mensinga, A.B. Brinkman, K. Lephikov, U. Müller, J. Walter, R. Boelens, H. van Ingen, H. Leonhardt, T. Carell and M. Vermeulen, Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives, *Cell*. 152 (2013), 1146–1159.
- [21] M. Bachman, S. Uribe-Lewis, X. Yang, M. Williams, A. Murrell and S. Balasubramanian, 5-Hydroxymethylcytosine is a predominantly stable DNA modification, *Nat Chem*. 6 (2014), 1049–1055.
- [22] W. Li and M. Liu, Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues, *J Nucleic Acids*. 2011 (2011), 870726.
- [23] S. Ito, A.C. D'Alessio, O.V. Taranova, K. Hong, L.C. Sowers and Y. Zhang, Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification, *Nature*. 466 (2010), 1129–1133.
- [24] N.R. Rose, M.A. McDonough, O.N.F. King, A. Kawamura and C.J. Schofield, Inhibition of 2-oxoglutarate dependent oxygenases, *Chem Soc Rev*. 40 (2011), 4364–4397.
- [25] P. Koivunen and T. Laukka, The TET enzymes, *Cell Mol Life Sci*. 75 (2018), 1339–1348.
- [26] G.P. Pfeifer, W. Xiong, M.A. Hahn and S.-G. Jin, The role of 5-hydroxymethylcytosine in human cancer, *Cell Tissue Res*. 356 (2014), 631–641.

- [27] A. Vasanthakumar and L.A. Godley, 5-hydroxymethylcytosine in cancer: significance in diagnosis and therapy, *Cancer Genet.* 208 (2015), 167–177.
- [28] E. Olkhov-Mitsel and B. Bapat, Strategies for discovery and validation of methylated and hydroxymethylated DNA biomarkers, *Cancer Med.* 1 (2012), 237–260.
- [29] S. Kurdyukov and M. Bullock, DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method, *Biology.* 5 (2016), 3.
- [30] T. Wang, C.E. Loo and R.M. Kohli, Enzymatic approaches for profiling cytosine methylation and hydroxymethylation, *Mol Metab.* 57 (2022), 101314.
- [31] B.D. Strahl and C.D. Allis, The language of covalent histone modifications, *Nature.* 403 (2000), 41–45.
- [32] J.C. Black, C. Van Rechem and J.R. Whetstine, Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact, *Mol Cell.* 48 (2012), 491–507.
- [33] Y. Zhang, Z. Sun, J. Jia, T. Du, N. Zhang, Y. Tang, Y. Fang and D. Fang, Overview of Histone Modification, *Adv Exp Med Biol.* 1283 (2021), 1–16.
- [34] S. Ghisletti, I. Barozzi, F. Mietton, S. Polletti, F. De Santa, E. Venturini, L. Gregory, L. Lonie, A. Chew, C.-L. Wei, J. Ragoussis and G. Natoli, Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages, *Immunity.* 32 (2010), 317–328.
- [35] M.P. Creyghton, A.W. Cheng, G.G. Welstead, T. Kooistra, B.W. Carey, E.J. Steine, J. Hanna, M.A. Lodato, G.M. Frampton, P.A. Sharp, L.A. Boyer, R.A. Young and R. Jaenisch, Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (2010), 21931–21936.
- [36] A. Sawicka and C. Seiser, Sensing core histone phosphorylation - a matter of perfect timing, *Biochim Biophys Acta.* 1839 (2014), 711–718.

- [37] W. Fischle, B.S. Tseng, H.L. Dormann, B.M. Ueberheide, B.A. Garcia, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, H. Funabiki and C.D. Allis, Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation, *Nature*. 438 (2005), 1116–1122.
- [38] M. Morselli, W.A. Pastor, B. Montanini, K. Nee, R. Ferrari, K. Fu, G. Bonora, L. Rubbi, A.T. Clark, S. Ottonello, S.E. Jacobsen and M. Pellegrini, In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse, *ELife*. 4 (2015), e06205.
- [39] M. Montalvo-Casimiro, R. González-Barrios, M.A. Meraz-Rodriguez, V.T. Juárez-González, C. Arriaga-Canon and L.A. Herrera, Epidrug Repurposing: Discovering New Faces of Old Acquaintances in Cancer Therapy, *Front Oncol*. 10 (2020), 605386.
- [40] J.K. Christman, 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy, *Oncogene*. 21 (2002), 5483–5495.
- [41] R.S. Seelan, P. Mukhopadhyay, M.M. Pisano and R.M. Greene, Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on gene expression, *Drug Metab Rev*. 50 (2018), 193–207.
- [42] N. Andreescu, M. Puiu and M. Niculescu, Effects of Dietary Nutrients on Epigenetic Changes in Cancer, *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 1856 (2018), 121–139.
- [43] L. Alfonso, G. Ai, R.C. Spitale and G.J. Bhat, Molecular targets of aspirin and cancer prevention, *Br J Cancer*. 111 (2014), 61–67.
- [44] K. Németh, N. Szücs, S. Czirják, L. Reiniger, B. Szabó, G. Barna, K. Karászi, P. Igaz, Z. Vladimír, M. Korbonits, A.B. Patócs and H. Butz, Survivin as a potential therapeutic target of acetylsalicylic acid in pituitary adenomas, *ONCOTARGET*. 9 (2018), 29180–29192.

- [45] E. Yiannakopoulou, Targeting epigenetic mechanisms and microRNAs by aspirin and other non steroidal anti-inflammatory agents--implications for cancer treatment and chemoprevention, *Cell Oncol Dordr.* 37 (2014), 167–178.
- [46] A. Fernandez, N. Karavitaki and J.A.H. Wass, Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK), *Clin Endocrinol (Oxf)*. 72 (2010), 377–382.
- [47] S. Ezzat, S.L. Asa, W.T. Couldwell, C.E. Barr, W.E. Dodge, M.L. Vance and I.E. McCutcheon, The prevalence of pituitary adenomas, *Cancer*. 101 (2004), 613–619.
- [48] A.F. Daly, M.A. Tichomirowa and A. Beckers, The epidemiology and genetics of pituitary adenomas, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 23 (2009), 543–554.
- [49] A.F. Daly, M. Rixhon, C. Adam, A. Dempegioti, M.A. Tichomirowa and A. Beckers, High Prevalence of Pituitary Adenomas: A Cross-Sectional Study in the Province of Liège, Belgium, *J Clin Endocrinol Metab.* 91 (2006), 4769–4775.
- [50] M.B.S. Lopes, World Health Organization 2017 Classification of Pituitary Tumors, *Endocrinol Metab Clin North Am.* 49 (2020), 375–386.
- [51] C.M. Faltermeier, S.T. Magill, L.S. Blevins and M.K. Aghi, Molecular Biology of Pituitary Adenomas, *Neurosurg Clin N Am.* 30 (2019), 391–400.
- [52] M.R. Gadelha, G. Trivellin, L.C. Hernández Ramírez and M. Korbonits, Genetics of pituitary adenomas, *Front Horm Res.* 41 (2013), 111–140.
- [53] A. Di Ieva, F. Rotondo, L.V. Syro, M.D. Cusimano and K. Kovacs, Aggressive pituitary adenomas--diagnosis and emerging treatments, *Nat Rev Endocrinol.* 10 (2014), 423–435.
- [54] G. Raverot, P. Burman, A. McCormack, A. Heaney, S. Petersenn, V. Popovic, J. Trouillas and O.M. Dekkers, European Society of Endocrinology Clinical Practice



Guidelines for the management of aggressive pituitary tumours and carcinomas, *Eur J Endocrinol.* 178 (2018), G1–G24.

- [55] G.A. Kaltsas, P. Nomikos, G. Kontogeorgos, M. Buchfelder and A.B. Grossman, Clinical review: Diagnosis and management of pituitary carcinomas, *J Clin Endocrinol Metab.* 90 (2005), 3089–3099.
- [56] G.A. Kaltsas and A.B. Grossman, Malignant pituitary tumours, *Pituitary.* 1 (1998), 69–81.
- [57] E.D. Aflorei and M. Korbonits, Epidemiology and etiopathogenesis of pituitary adenomas, *J Neurooncol.* 117 (2014), 379–394.
- [58] S. Melmed, Pathogenesis of pituitary tumors, *Nat Rev Endocrinol.* 7 (2011), 257–266.
- [59] C.S. Moreno, C.-O. Evans, X. Zhan, M. Okor, D.M. Desiderio and N.M. Oyesiku, Novel molecular signaling and classification of human clinically nonfunctional pituitary adenomas identified by gene expression profiling and proteomic analyses, *Cancer Res.* 65 (2005), 10214–10222.
- [60] T. Otto and P. Sicinski, Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy, *Nat Rev Cancer.* 17 (2017), 93–115.
- [61] M. Fedele and A. Fusco, Role of the high mobility group A proteins in the regulation of pituitary cell cycle, *J Mol Endocrinol.* 44 (2010), 309–318.
- [62] D.J. Simpson, N.A. Hibberts, A.M. McNicol, R.N. Clayton and W.E. Farrell, Loss of pRb expression in pituitary adenomas is associated with methylation of the RB1 CpG island, *Cancer Res.* 60 (2000), 1211–1216.
- [63] D.J. Simpson, A.M. McNicol, D.C. Murray, A. Bahar, H.E. Turner, J.A.H. Wass, M.M. Esiri, R.N. Clayton and W.E. Farrell, Molecular pathology shows p16 methylation in nonadenomatous pituitaries from patients with Cushing’s disease, *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 10 (2004), 1780–1788.

- [64] E.L. Denchi, C. Attwooll, D. Pasini and K. Helin, Deregulated E2F Activity Induces Hyperplasia and Senescence-Like Features in the Mouse Pituitary Gland, *Mol Cell Biol.* 25 (2005), 2660–2672.
- [65] S. Fouad, D. Hauton and V. D’Angiolella, E2F1: Cause and Consequence of DNA Replication Stress, *Front Mol Biosci.* 7 (2021), 599332.
- [66] A. Roussel-Gervais, S. Bilodeau, S. Vallette, F. Berthelet, A. Lacroix, D. Figarella-Branger, T. Brue and J. Drouin, Cooperation between cyclin E and p27(Kip1) in pituitary tumorigenesis, *Mol Endocrinol Baltim Md.* 24 (2010), 1835–1845.
- [67] S. Jordan, K. Lidhar, M. Korbonits, D.G. Lowe and A.B. Grossman, Cyclin D and cyclin E expression in normal and adenomatous pituitary, *Eur J Endocrinol.* 143 (2000), R1-6.
- [68] M.G. Hossain, T. Iwata, N. Mizusawa, Z.R. Qian, S.W.N. Shima, T. Okutsu, S. Yamada, T. Sano and K. Yoshimoto, Expression of p18(INK4C) is down-regulated in human pituitary adenomas, *Endocr Pathol.* 20 (2009), 114–121.
- [69] M. Fedele, R. Visone, I. De Martino, G. Troncone, D. Palmieri, S. Battista, A. Ciarmiello, P. Pallante, C. Arra, R.M. Melillo, K. Helin, C.M. Croce and A. Fusco, HMGA2 induces pituitary tumorigenesis by enhancing E2F1 activity, *Cancer Cell.* 9 (2006), 459–471.
- [70] M. Filippella, F. Galland, M. Kujas, J. Young, A. Faggiano, G. Lombardi, A. Colao, G. Meduri and P. Chanson, Pituitary tumour transforming gene (PTTG) expression correlates with the proliferative activity and recurrence status of pituitary adenomas: a clinical and immunohistochemical study, *Clin Endocrinol (Oxf).* 65 (2006), 536–543.
- [71] Y. Stein, V. Rotter and R. Aloni-Grinstein, Gain-of-Function Mutant p53: All the Roads Lead to Tumorigenesis, *Int J Mol Sci.* 20 (2019), 6197.

- [72] K. Thapar, B.W. Scheithauer, K. Kovacs, P.J. Pernicone and E.R. Laws, p53 expression in pituitary adenomas and carcinomas: correlation with invasiveness and tumor growth fractions, *Neurosurgery*. 38 (1996), 765–770; discussion 770-771.
- [73] S.J. Hentschel, Ian E. McCutcheon, W. Moore and F.A. Durity, P53 and MIB-1 immunohistochemistry as predictors of the clinical behavior of nonfunctioning pituitary adenomas, *Can J Neurol Sci J Can Sci Neurol*. 30 (2003), 215–219.
- [74] A. Levy, L. Hall, W.A. Yeudall and S.L. Lightman, p53 gene mutations in pituitary adenomas: rare events, *Clin Endocrinol (Oxf)*. 41 (1994), 809–814.
- [75] M. Musat, M. Korbonits, B. Kola, N. Borboli, M.R. Hanson, A.M. Nanzer, J. Grigson, S. Jordan, D.G. Morris, M. Gueorguiev, M. Coculescu, S. Basu and A.B. Grossman, Enhanced protein kinase B/Akt signalling in pituitary tumours, *Endocr Relat Cancer*. 12 (2005), 423–433.
- [76] D. Larysz, J. Zebracka-Gala, A. Rudnik, K. Hasse-Lazar, M. Kowalska, M. Jarzab, A. Król, S. Szpak-Ulczo, P. Bażowski and B. Jarzab, Expression of genes FOLR1, BAG1 and LAPTM4B in functioning and non-functioning pituitary adenomas, *Folia Neuropathol*. 50 (2012), 277–286.
- [77] C. Tatsi and C.A. Stratakis, The Genetics of Pituitary Adenomas, *J Clin Med*. 9 (2019), E30.
- [78] A. Beckers, L.A. Aaltonen, A.F. Daly and A. Karhu, Familial isolated pituitary adenomas (FIPA) and the pituitary adenoma predisposition due to mutations in the aryl hydrocarbon receptor interacting protein (AIP) gene, *Endocr Rev*. 34 (2013), 239–277.
- [79] C.E. Stiles and M. Korbonits, Familial Isolated Pituitary Adenoma, in: *Endotext*, K.R. Feingold, B. Anawalt, A. Boyce, G. Chrousos, W.W. de Herder, K. Dhatariya, K. Dungan, A. Grossman, J.M. Hershman, J. Hofland, S. Kalra, G. Kaltsas, C. Koch, P. Kopp, M. Korbonits, C.S. Kovacs, W. Kuohung, B. Laferrère, E.A. McGee, R.

McLachlan, J.E. Morley, M. New, J. Purnell, R. Sahay, F. Singer, C.A. Stratakis, D.L. Trencze, and D.P. Wilson, eds., MDText.com, Inc., South Dartmouth (MA), 2000.

- [80] B.W. Scheithauer, E.J. Laws, K. Kovacs, E. Horvath, R.V. Randall and J.A. Carney, Pituitary adenomas of the multiple endocrine neoplasia type I syndrome, *Semin Diagn Pathol.* 4 (1987), 205–211.
- [81] B. Vergès, F. Boureille, P. Goudet, A. Murat, A. Beckers, G. Sassolas, P. Cougard, B. Chambe, C. Montvernay and A. Calender, Pituitary Disease in MEN Type 1 (MEN1): Data from the France-Belgium MEN1 Multicenter Study, *J Clin Endocrinol Metab.* 87 (2002), 457–465.
- [82] J.M. de Laat, O.M. Dekkers, C.R. Pieterman, W.P. Kluijfhout, A.R. Hermus, A.M. Pereira, A.N. van der Horst-Schrivers, M.L. Drent, P.H. Bisschop, B. Havekes, W.W. de Herder and G.D. Valk, Long-Term Natural Course of Pituitary Tumors in Patients With MEN1: Results From the DutchMEN1 Study Group (DMSG), *J Clin Endocrinol Metab.* 100 (2015), 3288–3296.
- [83] J.A. Carney, L.S. Hruska, G.D. Beauchamp and H. Gordon, Dominant inheritance of the complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity, *Mayo Clin Proc.* 61 (1986), 165–172.
- [84] L.S. Weinstein, A. Shenker, P.V. Gejman, M.J. Merino, E. Friedman and A.M. Spiegel, Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome, *N Engl J Med.* 325 (1991), 1688–1695.
- [85] L.M. Mulligan, J.B. Kwok, C.S. Healey, M.J. Elsdon, C. Eng, E. Gardner, D.R. Love, S.E. Mole, J.K. Moore and L. Papi, Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A, *Nature.* 363 (1993), 458–460.
- [86] A. Frederiksen, M. Rossing, P. Hermann, C. Ejersted, R.V. Thakker and M. Frost, Clinical Features of Multiple Endocrine Neoplasia Type 4: Novel Pathogenic Variant and Review of Published Cases, *J Clin Endocrinol Metab.* 104 (2019), 3637–3646.

- [87] A.F. Daly, B. Yuan, F. Fina, J.-H. Caberg, G. Trivellin, L. Rostomyan, W.W. de Herder, L.A. Naves, D. Metzger, T. Cuny, W. Rabl, N. Shah, M.-L. Jaffrain-Rea, M.C. Zatelli, F.R. Faucz, E. Castermans, I. Nanni-Metellus, M. Lodish, A. Muhammad, L. Palmeira, I. Potorac, G. Mantovani, S.J. Neggers, M. Klein, A. Barlier, P. Liu, L. Ouafik, V. Bours, J.R. Lupski, C.A. Stratakis and A. Beckers, Somatic mosaicism underlies X-linked acrogigantism syndrome in sporadic male subjects, *Endocr Relat Cancer*. 23 (2016), 221–233.
- [88] F. Guerrero-Pérez, C. Fajardo, E.T. Vela, O. Giménez-Palop, A.L. Gil, T. Martín, N. González, J.J. Díez, P. Iglesias, M. Robledo and C. Villabona, 3P association (3PAs): Pituitary adenoma and pheochromocytoma/paraganglioma. A heterogeneous clinical syndrome associated with different gene mutations, *Eur J Intern Med*. 69 (2019), 14–19.
- [89] C.O. Evans, M.R. Brown, J.S. Parks and N.M. Oyesiku, Screening for MEN1 tumor suppressor gene mutations in sporadic pituitary tumors, *J Endocrinol Invest*. 23 (2000), 304–309.
- [90] L. Cazabat, J. Bouligand, S. Salenave, M. Bernier, S. Gaillard, F. Parker, J. Young, A. Guiochon-Mantel and P. Chanson, Germline AIP mutations in apparently sporadic pituitary adenomas: prevalence in a prospective single-center cohort of 443 patients, *J Clin Endocrinol Metab*. 97 (2012), E663-670.
- [91] M. Losa, P. Mortini, A. Pagnano, M. Detomas, M.F. Cassarino and F. Pecori Giraldi, Clinical characteristics and surgical outcome in USP8-mutated human adrenocorticotrophic hormone-secreting pituitary adenomas, *Endocrine*. 63 (2019), 240–246.
- [92] K. Yacqub-Usman, A. Richardson, C.V. Duong, R.N. Clayton and W.E. Farrell, The pituitary tumour epigenome: Aberrations and prospects for targeted therapy, *Nat Rev Endocrinol*. 8 (2012), 486–494.

- [93] D.J. Simpson, J.E. Bicknell, A.M. McNicol, R.N. Clayton and W.E. Farrell, Hypermethylation of the p16/CDKN2A/MTSI gene and loss of protein expression is associated with nonfunctional pituitary adenomas but not somatotrophinomas, *Genes Chromosomes Cancer*. 24 (1999), 328–336.
- [94] A. Bahar, D.J. Simpson, S.J. Cutty, J.E. Bicknell, P.R. Hoban, S. Holley, M. Mourtada-Maarabouni, G.T. Williams, R.N. Clayton and W.E. Farrell, Isolation and Characterization of a Novel Pituitary Tumor Apoptosis Gene, *Mol Endocrinol*. 18 (2004), 1827–1839.
- [95] D.J. Simpson, R.N. Clayton and W.E. Farrell, Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion, *Oncogene*. 21 (2002), 1217–1224.
- [96] Z.R. Qian, T. Sano, K. Yoshimoto, S. Yamada, A. Ishizuka, N. Mizusawa, H. Horiguchi, M. Hirokawa and S.L. Asa, Inactivation of RASSF1A tumor suppressor gene by aberrant promoter hypermethylation in human pituitary adenomas, *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 85 (2005), 464–473.
- [97] C.V. Duong, R.D. Emes, F. Wessely, K. Yacqub-Usman, R.N. Clayton and W.E. Farrell, Quantitative, genome-wide analysis of the DNA methylome in sporadic pituitary adenomas, *Endocr Relat Cancer*. 19 (2012), 805–816.
- [98] M.P. Salomon, X. Wang, D.M. Marzese, S.C. Hsu, N. Nelson, X. Zhang, C. Matsuba, Y. Takasumi, C. Ballesteros-Merino, B.A. Fox, G. Barkhoudarian, D.F. Kelly and D.S.B. Hoon, The Epigenomic Landscape of Pituitary Adenomas Reveals Specific Alterations and Differentiates Among Acromegaly, Cushing’s Disease and Endocrine-Inactive Subtypes, *Clin Cancer Res*. 24 (2018), 4126–4136.
- [99] P. Kober, J. Boresowicz, N. Rusetska, M. Maksymowicz, K. Goryca, J. Kunicki, W. Bonicki, J.A. Siedlecki and M. Bujko, DNA methylation profiling in nonfunctioning pituitary adenomas, *Mol Cell Endocrinol*. 473 (2018), 194–204.

- [100] C. Ling, M. Pease, L. Shi, V. Punj, M.S. Shiroishi, D. Commins, D.J. Weisenberger, K. Wang and G. Zada, A Pilot Genome-Scale Profiling of DNA Methylation in Sporadic Pituitary Macroadenomas: Association with Tumor Invasion and Histopathological Subtype, *PLOS ONE*. 9 (2014), e96178.
- [101] P. Kober, J. Boresowicz, N. Rusetska, M. Maksymowicz, A. Paziewska, M. Dąbrowska, J. Kunicki, W. Bonicki, J. Ostrowski, J.A. Siedlecki and M. Bujko, The Role of Aberrant DNA Methylation in Misregulation of Gene Expression in Gonadotroph Nonfunctioning Pituitary Tumors, *Cancers*. 11 (2019), 1650.
- [102] Y. Gu, X. Zhou, F. Hu, Y. Yu, T. Xie, Y. Huang, X. Zhao and X. Zhang, Differential DNA methylome profiling of nonfunctioning pituitary adenomas suggesting tumour invasion is correlated with cell adhesion, *J Neurooncol*. 129 (2016), 23–31.
- [103] A. García-Martínez, J. Sottile, L. Sánchez-Tejada, C. Fajardo, R. Cámara, C. Lamas, V.M. Barberá and A. Picó, DNA Methylation of Tumor Suppressor Genes in Pituitary Neuroendocrine Tumors, *J Clin Endocrinol Metab*. 104 (2019), 1272–1282.
- [104] N. Välimäki, C. Schalin-Jääntti, A. Karppinen, A. Paetau, L. Kivipelto, L.A. Aaltonen and A. Karhu, Genetic and Epigenetic Characterization of Growth Hormone–Secreting Pituitary Tumors, *Mol Cancer Res*. 17 (2019), 2432–2443.
- [105] A. Ebrahimi, J. Schittenhelm, J. Honegger and H.J. Schluesener, Histone Acetylation Patterns of Typical and Atypical Pituitary Adenomas Indicate Epigenetic Shift of these Tumours, *J Neuroendocrinol*. 23 (2011), 525–530.
- [106] S. Bilodeau, S. Vallette-Kasic, Y. Gauthier, D. Figarella-Branger, T. Brue, F. Berthelet, A. Lacroix, D. Batista, C. Stratakis, J. Hanson, B. Meij and J. Drouin, Role of Brg1 and HDAC2 in GR trans-repression of the pituitary POMC gene and misexpression in Cushing disease, *Genes Dev*. 20 (2006), 2871–2886.
- [107] W. Wang, L. Fu, S. Li, Z. Xu and X. Li, Histone deacetylase 11 suppresses p53 expression in pituitary tumor cells, *Cell Biol Int*. 41 (2017), 1290–1295.

- [108] I.P.P. Grande, P.V.G.H. Amorim, A.C.T.B. Freire, R.S. Jallad, N.R. Musolino, V.A. Cescato, G.O. da Silva, M.D. Bronstein and E.B. Trarbach, Differential gene expression of sirtuins between somatotropinomas and nonfunctioning pituitary adenomas, *Pituitary*. 21 (2018), 355–361.
- [109] T. Li, H. Huang, B. Huang, B. Huang and J. Lu, Histone acetyltransferase p300 regulates the expression of human pituitary tumor transforming gene (hPTTG), *J Genet Genomics Yi Chuan Xue Bao*. 36 (2009), 335–342.
- [110] S. Ezzat, X. Zhu, S. Loeper, S. Fischer and S.L. Asa, Tumor-derived Ikaros 6 acetylates the Bcl-XL promoter to up-regulate a survival signal in pituitary cells, *Mol Endocrinol Baltim Md*. 20 (2006), 2976–2986.
- [111] K. Yacqub-Usman, C.V. Duong, R.N. Clayton and W.E. Farrell, Preincubation of pituitary tumor cells with the epidrugs zebularine and trichostatin A are permissive for retinoic acid-augmented expression of the BMP-4 and D2R genes, *Endocrinology*. 154 (2013), 1711–1721.
- [112] K. Yacqub-Usman, C.V. Duong, R.N. Clayton and W.E. Farrell, Epigenomic silencing of the BMP-4 gene in pituitary adenomas: a potential target for epidrug-induced re-expression, *Endocrinology*. 153 (2012), 3603–3612.
- [113] Y. Xue, R. Chen, W. Du, F. Yang and X. Wei, RIZ1 and histone methylation status in pituitary adenomas, *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 39 (2017), 1010428317711794.
- [114] S.B. DeVore, C.H. Young, G. Li, A. Sundararajan, T. Ramaraj, J. Mudge, F. Schilkey, A. Muth, P.R. Thompson and B.D. Cherrington, Histone Citrullination Represses MicroRNA Expression, Resulting in Increased Oncogene mRNAs in Somatolactotrope Cells, *Mol Cell Biol*. 38 (2018), e00084-18.
- [115] K.A. Michaelis, A.J. Knox, M. Xu, K. Kiseljak-Vassiliades, M.G. Edwards, M. Geraci, B.K. Kleinschmidt-DeMasters, K.O. Lillehei and M.E. Wierman,



- Identification of growth arrest and DNA-damage-inducible gene beta (GADD45beta) as a novel tumor suppressor in pituitary gonadotrope tumors, *Endocrinology*. 152 (2011), 3603–3613.
- [116] J. Feng, L. Hong, Y. Wu, C. Li, H. Wan, G. Li, Y. Sun, S. Yu, P. Chittiboina, B. Montgomery, Z. Zhuang and Y. Zhang, Identification of a subtype-specific ENC1 gene related to invasiveness in human pituitary null cell adenoma and oncocytomas, *J Neurooncol*. 119 (2014), 307–315.
- [117] D.G. Morris, M. Musat, S. Czirják, Z. Hanzély, D.M. Lillington, M. Korbonits and A.B. Grossman, Differential gene expression in pituitary adenomas by oligonucleotide array analysis, *Eur J Endocrinol*. 153 (2005), 143–151.
- [118] M.S. Elston, A.J. Gill, J.V. Conaglen, A. Clarkson, J.M. Shaw, A.J.J. Law, R.J. Cook, N.S. Little, R.J. Clifton-Bligh, B.G. Robinson and K.L. McDonald, Wnt Pathway Inhibitors Are Strongly Down-Regulated in Pituitary Tumors, *Endocrinology*. 149 (2008), 1235–1242.
- [119] X. Zhan and D.M. Desiderio, Signaling pathway networks mined from human pituitary adenoma proteomics data, *BMC Med Genomics*. 3 (2010), 13.
- [120] I. Krencz, A. Sebestyen, J. Papay, Y. Lou, G.F. Lutz, T.L. Majewicz and A. Khor, Correlation between immunohistochemistry and RICTOR fluorescence in situ hybridization amplification in small cell lung carcinoma, *Hum Pathol*. 93 (2019), 74–80.
- [121] H. Butz, K. Németh, D. Czenke, I. Likó, S. Czirják, V. Zivkovic, K. Baghy, M. Korbonits, I. Kovalszky, P. Igaz, K. Rác and A. Patócs, Systematic Investigation of Expression of G2/M Transition Genes Reveals CDC25 Alteration in Nonfunctioning Pituitary Adenomas, *Pathol Oncol Res POR*. 23 (2017), 633–641.
- [122] H. Butz, I. Likó, S. Czirják, P. Igaz, M.M. Khan, V. Zivkovic, K. Bálint, M. Korbonits, K. Rác and A. Patócs, Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of

microRNA in human sporadic pituitary adenomas, *J Clin Endocrinol Metab.* 95 (2010), E181-191.

- [123] H. Butz, P.M. Szabó, H.W.Z. Khella, R. Nofech-Mozes, A. Patocs and G.M. Yousef, miRNA-target network reveals miR-124as a key miRNA contributing to clear cell renal cell carcinoma aggressive behaviour by targeting CAV1 and FLOT1, *Oncotarget.* 6 (2015), 12543–12557.
- [124] B. Szabó, K. Németh, K. Mészáros, N. Szücs, S. Czirják, L. Reiniger, H. Rajnai, I. Krencz, K. Karászi, L. Krokker, A.B. Patócs and H. Butz, Demethylation status of somatic DNA extracted from pituitary neuroendocrine tumors indicates proliferative behavior, *J Clin Endocrinol Metab.* In press (2020), In press.
- [125] B. Szabó, K. Németh, K. Mészáros, L. Krokker, I. Likó, É. Saskói, K. Németh, P.T. Szabó, N. Szücs, S. Czirják, G. Szalóki, A. Patócs and H. Butz, Aspirin mediates its antitumoral effect through inhibiting PTTG1 in pituitary adenoma, *J Clin Endocrinol Metab.* (2022), dgac496.
- [126] W.E. Farrell, Epigenetics of pituitary tumours: an update, *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 21 (2014), 299–305.
- [127] Y. Xu, Y. Niu, K. Deng, H. Pan, F. Feng, F. Gong, W.-M. Tong, S. Chen, L. Lu, R. Wang, H. You, Y. Yao and H. Zhu, Changes in DNA 5-Hydroxymethylcytosine Levels and the Underlying Mechanism in Non-functioning Pituitary Adenomas, *Front Endocrinol.* 11 (2020), 361.
- [128] A. Szwagierczak, S. Bultmann, C.S. Schmidt, F. Spada and H. Leonhardt, Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010), e181.
- [129] M.C. Haffner, A. Chaux, A.K. Meeker, D. Esopi, J. Gerber, L.G. Pellakuru, A. Toubaji, P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, W.G. Nelson, G.J. Netto, A. DeMarzo and S. Yegnasubramanian, Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly

reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers, *Oncotarget*. 2 (2011), 627–637.

- [130] M.A. Hahn, R. Qiu, X. Wu, A.X. Li, H. Zhang, J. Wang, J. Jui, S.-G. Jin, Y. Jiang, G.P. Pfeifer and Q. Lu, Dynamics of 5-Hydroxymethylcytosine and Chromatin Marks in Mammalian Neurogenesis, *Cell Rep*. 3 (2013), 291–300.
- [131] F. Ciccarone, E. Valentini, M. Malavolta, M. Zampieri, M.G. Bacalini, R. Calabrese, T. Guastafierro, A. Reale, C. Franceschi, M. Capri, N. Breusing, T. Grune, M. Moreno-Villanueva, A. Bürkle and P. Caiafa, DNA Hydroxymethylation Levels Are Altered in Blood Cells From Down Syndrome Persons Enrolled in the MARK-AGE Project, *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 73 (2018), 737–744.
- [132] A. Grelus, D.V. Nica, I. Miklos, V. Belengeanu, I. Ioiart and C. Popescu, Clinical Significance of Measuring Global Hydroxymethylation of White Blood Cell DNA in Prostate Cancer: Comparison to PSA in a Pilot Exploratory Study, *Int J Mol Sci*. 18 (2017).
- [133] M. Starczak, E. Zarakowska, M. Modrzejewska, T. Dziaman, A. Szpila, K. Linowiecka, J. Guz, J. Szpotan, M. Gawronski, A. Labejszo, A. Liebert, Z. Banaszkiwicz, M. Klopocka, M. Foksinski, D. Gackowski and R. Olinski, In vivo evidence of ascorbate involvement in the generation of epigenetic DNA modifications in leukocytes from patients with colorectal carcinoma, benign adenoma and inflammatory bowel disease, *J Transl Med*. 16 (2018), 204.
- [134] G.A. Herrgott, K.P. Asmaro, M. Wells, T.S. Sabedot, T.M. Malta, M.S. Mosella, K. Nelson, L. Scarpace, J.S. Barnholtz-Sloan, A.E. Sloan, W.R. Selman, A.C. deCarvalho, L.M. Poisson, A. Mukherjee, A.M. Robin, I.Y. Lee, J. Snyder, T. Walbert, M. Rosenblum, T. Mikkelsen, A. Bhan, J. Craig, S. Kalkanis, J. Rock, H. Noushmehr and A.V. Castro, Detection of tumor-specific DNA methylation markers in the blood of patients with pituitary neuroendocrine tumors, *Neuro-Oncol*. 24 (2022), 1126–1139.

- [135] H.-S. Ma, E.L. Wang, W.-F. Xu, S. Yamada, K. Yoshimoto, Z.R. Qian, L. Shi, L.-L. Liu and X.-H. Li, Overexpression of dna (Cytosine-5)-methyltransferase 1 (dnmt1) and dna (cytosine-5)-methyltransferase 3a (dnmt3a) is associated with aggressive behavior and hypermethylation of tumor suppressor genes in human pituitary adenomas, *Med Sci Monit.* 24 (2018), 4841–4850.
- [136] K. Chen, J. Zhang, Z. Guo, Q. Ma, Z. Xu, Y. Zhou, Z. Xu, Z. Li, Y. Liu, X. Ye, X. Li, B. Yuan, Y. Ke, C. He, L. Zhou, J. Liu and W. Ci, Loss of 5-hydroxymethylcytosine is linked to gene body hypermethylation in kidney cancer, *Cell Res.* 26 (2016), 103–118.
- [137] J. Chu, E.A. Loughlin, N.A. Gaur, S. SenBanerjee, V. Jacob, C. Monson, B. Kent, A. Oranu, Y. Ding, C. Ukomadu and K.C. Sadler, UHRF1 phosphorylation by cyclin A2/cyclin-dependent kinase 2 is required for zebrafish embryogenesis, *Mol Biol Cell.* 23 (2012), 59–70.
- [138] S. Polepalli, S.M. George, R. Valli Sri Vidya, G.S. Rodrigues, L. Ramachandra, R. Chandrashekar, D.N. M, P.P.N. Rao, R.G. Pestell and M. Rao, Role of UHRF1 in malignancy and its function as a therapeutic target for molecular docking towards the SRA domain, *Int J Biochem Cell Biol.* 114 (2019), 105558.
- [139] T. Zhou, J. Xiong, M. Wang, N. Yang, J. Wong, B. Zhu and R.-M. Xu, Structural basis for hydroxymethylcytosine recognition by the SRA domain of UHRF2, *Mol Cell.* 54 (2014), 879–886.
- [140] H. Lu, S. Bhoopatiraju, H. Wang, N.P. Schmitz, X. Wang, M.J. Freeman, C.L. Forster, M.R. Verneris, M.A. Linden and T.C. Hallstrom, Loss of UHRF2 expression is associated with human neoplasia, promoter hypermethylation, decreased 5-hydroxymethylcytosine, and high proliferative activity, *Oncotarget.* 7 (2016), 76047–76061.

- [141] H. Sidhu and N. Capalash, UHRF1: The key regulator of epigenetics and molecular target for cancer therapeutics, *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med.* 39 (2017), 1010428317692205.
- [142] B. Chowdhury, A. McGovern, Y. Cui, S.R. Choudhury, I.-H. Cho, B. Cooper, T. Chevassut, A.C. Lossie and J. Irudayaraj, The hypomethylating agent Decitabine causes a paradoxical increase in 5-hydroxymethylcytosine in human leukemia cells, *Sci Rep.* 5 (2015), 9281.
- [143] J. Ma, Z. Cai, H. Wei, X. Liu, Q. Zhao and T. Zhang, The anti-tumor effect of aspirin: What we know and what we expect, *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother.* 95 (2017), 656–661.
- [144] C. Patrono and B. Rocca, Aspirin and Other COX-1 inhibitors, *Handb Exp Pharmacol.* (2012), 137–164.
- [145] R.N. Pinckard, D. Hawkins and R.S. Farr, In vitro Acetylation of Plasma Proteins, Enzymes and DNA by Aspirin, *Nature.* 219 (1968), 68–69.
- [146] M.H. Tatham, C. Cole, P. Scullion, R. Wilkie, N.J. Westwood, L.A. Stark and R.T. Hay, A Proteomic Approach to Analyze the Aspirin-mediated Lysine Acetylome, *Mol Cell Proteomics MCP.* 16 (2017), 310–326.
- [147] H. Guo, J. Liu, Q. Ben, Y. Qu, M. Li, Y. Wang, W. Chen and J. Zhang, The aspirin-induced long non-coding RNA OLA1P2 blocks phosphorylated STAT3 homodimer formation, *Genome Biol.* 17 (2016), 24.
- [148] K. Wallace, M.V. Grau, J.A. Levine, L. Shen, R. Hamdan, X. Chen, J. Gui, R.W. Haile, E.L. Barry, D. Ahnen, G. McKeown-Eyssen, J.A. Baron and J.P.J. Issa, Association between folate levels and CpG island hypermethylation in normal colorectal mucosa, *Cancer Prev Res Phila Pa.* 3 (2010), 1552–1564.

- [149] M.-R. Pan, H.-C. Chang, L.-Y. Chuang and W.-C. Hung, The nonsteroidal anti-inflammatory drug NS398 reactivates SPARC expression via promoter demethylation to attenuate invasiveness of lung cancer cells, *Exp Biol Med Maywood NJ*. 233 (2008), 456–462.
- [150] S.M. Reed and D.E. Quelle, p53 Acetylation: Regulation and Consequences, *Cancers*. 7 (2014), 30–69.
- [151] M.L. Read, B. Modasia, A. Fletcher, R.J. Thompson, K. Brookes, P.C. Rae, H.R. Nieto, V.L. Poole, S. Roberts, M.J. Campbell, K. Boelaert, A.S. Turnell, V.E. Smith, H. Mehanna and C.J. McCabe, PTTG and PBF Functionally Interact with p53 and Predict Overall Survival in Head and Neck Cancer, *Cancer Res*. 78 (2018), 5863–5876.
- [152] G. Bertolin and M. Tramier, Insights into the non-mitotic functions of Aurora kinase A: more than just cell division, *Cell Mol Life Sci CMLS*. 77 (2020), 1031–1047.
- [153] L. Porcelli, G. Guida, A.E. Quatrone, T. Cocco, L. Sidella, I. Maida, R.M. Iacobazzi, A. Ferretta, D.A. Stolfi, S. Strippoli, S. Guida, S. Tommasi, M. Guida and A. Azzariti, Aurora kinase B inhibition reduces the proliferation of metastatic melanoma cells and enhances the response to chemotherapy, *J Transl Med*. 13 (2015), 26.
- [154] G. Ai, R. Dachineni, D.R. Kumar, S. Marimuthu, L.F. Alfonso and G.J. Bhat, Aspirin acetylates wild type and mutant p53 in colon cancer cells: identification of aspirin acetylated sites on recombinant p53, *Tumor Biol*. 37 (2016), 6007–6016.
- [155] J.-M. Terme, B. Sesé, L. Millán-Ariño, R. Mayor, J.C.I. Belmonte, M.J. Barrero and A. Jordan, Histone H1 variants are differentially expressed and incorporated into chromatin during differentiation and reprogramming to pluripotency, *J Biol Chem*. 286 (2011), 35347–35357.
- [156] J. Yuan, R. Adamski and J. Chen, Focus on histone variant H2AX: To be or not to be, *FEBS Lett*. 584 (2010), 3717–3724.

- [157] J. Tfelt-Hansen, D. Kanuparthi and N. Chattopadhyay, The Emerging Role of Pituitary Tumor Transforming Gene in Tumorigenesis, *Clin Med Res.* 4 (2006), 130–137.
- [158] Y. Tong and T. Eigler, Transcriptional targets for pituitary tumor-transforming gene-1, *J Mol Endocrinol.* 43 (2009), 179–185.
- [159] R.E. Tamura, J.F. de Vasconcellos, D. Sarkar, T.A. Libermann, P.B. Fisher and L.F. Zerbini, GADD45 proteins: central players in tumorigenesis, *Curr Mol Med.* 12 (2012), 634–651.

**X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE****X. 1. A doktori értekezéshez felhasznált saját publikációk jegyzéke**

**Szabó B**, Németh K, Mészáros K, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, Krencz I, Rajnai H, Karászi K, Krokker L, Patócs A, Butz H (2020). Demethylation status of somatic DNA extracted from pituitary neuroendocrine tumors indicates proliferative behavior. *J Clin Endocrinol Metab*, dgaa156.

**Szabó B**, Németh K, Mészáros K, Krokker L, Likó I, Saskői É, Németh K, Szabó PT, Szücs N, Czirják S, Szalóki G, Patócs A, Butz H (2022). Aspirin mediates its antitumoral effect through inhibiting PTTG1 in pituitary adenoma. *J Clin Endocrinol Metab*, dgac496.

**X. 2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó 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**, 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 ENDOCR METAB*, 104:4151–4168.

Németh K, Darvasi O, Likó I, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, **Szabó B**, Kurucz P, 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.

Krokker L, **Szabó B**, Németh K, Tóháti R, Sarkadi B, Mészáros K, Patócs A, Butz H (2021). Three Dimensional Cell Culturing for Modeling Adrenal and Pituitary Tumors. *Pathol Oncol Res*, 27:640676.

Németh K, Mészáros K, **Szabó B**, Butz H, Arányi T, Szabó PT (2021). A relative quantitation method for measuring DNA methylation and hydroxymethylation using guanine as an internal standard. *Anal Methods*, 13:4614–4622.



## **XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Dr. Butz Henriettnek**, aki amellet, hogy szakmai tudásával segítette munkámat, személyes támogatásával biztosította annak létrejöttét. Emellett köszönöm példaértékű szorgalmát, amiből reményeim szerint további szakmai életemhez erőt merítettem.

Köszönettel tartozom **Prof. Dr. Patócs Attilának**, hogy szakmai tanácsai, és tudása mellett lehetőséget biztosított, hogy eleinte az Endokrin Genetikai Laboratóriumban, majd a Klinikai Genetikai és Endokrinológiai Laboratóriumban végezhessem munkámat.

Köszönöm **Prof. Dr. Igaz Péternek** és **Prof. Dr. Vásárhelyi Barnának**, hogy intézeteikben, a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján, majd a Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetében támogatásuknak hála végezhettem munkámat.

Köszönöm **Dr. Czirják Sándornak** az Országos Klinikai Idegtudományi Intézet idegsebész főorvosának a humán minták begyűjtésében nyújtott segítségét.

Hálás köszönettel tartozom **Dr. Mészáros Katalinnak**, valamint **Dr. Szabó Pál Tamásnak** és **Németh Krisztinának**, akik az analitikai mérések elvégzésében, azok kiértékelésében és értelmezésében segítették munkámat.

Köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Rákkutató Intézetében **Dr. Sebestyén Annának**, és munkatársainak, **Dr. Reiniger Lillának**, **Dr. Krencz Ildikónak**, **Dr. Rajnai Hajnalkának** és **Karászi Katalinnak** a szöveti immunhisztokémiai vizsgálatokban nyújtottak segítséget.

Köszönöm **Dr. Szalóki Gábornak** az áramlási citometriás mérésekben nyújtott segítséget.

Emellett köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikájának endokrin munkacsoportjának, kiemelten **Dr. Szücs Nikolette** adjunktus asszonynak a betegminták gyűjtésében nyújtott segítségéért.

Köszönöm az Klinikai Genetikai és Endokrinológiai Laboratórium korábbi és jelenlegi posztdoktor kutatóinak, PhD hallgatóinak és asszisztenseknek a szakmai segítségét, tanácsokat, és az ideális munkakörnyezetet. Kiemelten szeretném megköszönni **Dr. Saskói**

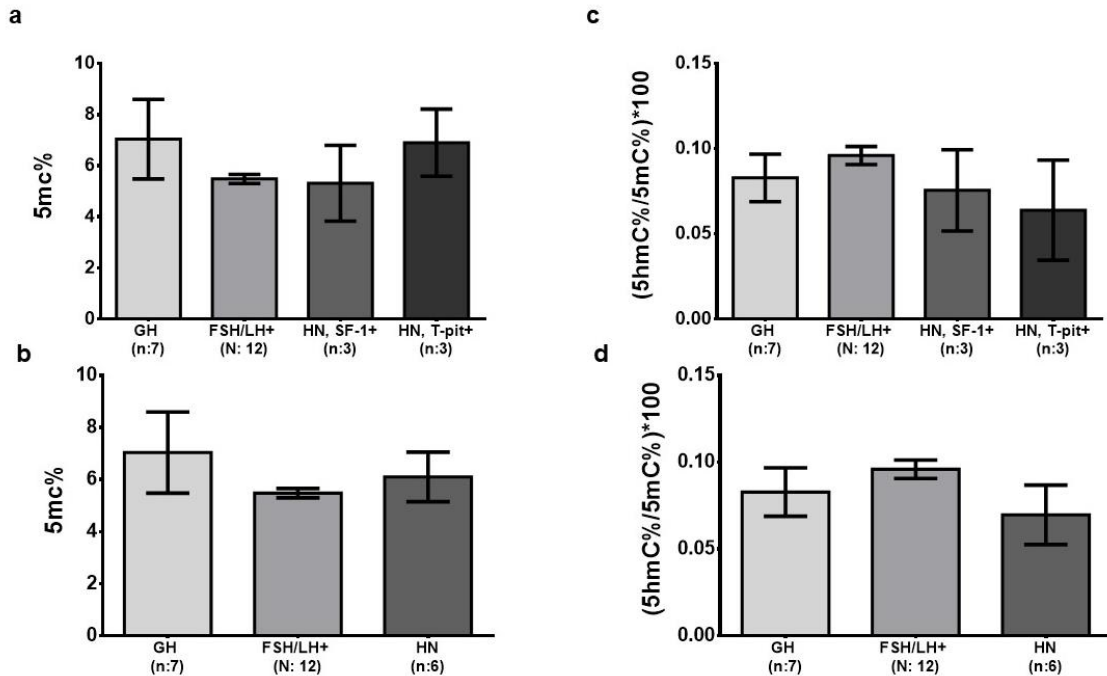
**Évának és Krokker Lillának** a rengeteg segítséget, valamint **Dr. Doleschall Mártonnak, Dr. Nyíró Gábornak, Dr. Fülöpné Németh Kingának, Dr. Turai Péternek,** és **Benkő Mariann-nak,** hogy munkámat segítették szakmai tanácsaikkal, barátságukkal és megértésükkel.

Szeretném megköszönni azoknak, akik név szerint nem kerültek említésre, azonban az évek során bármilyen módon segítették munkámat.

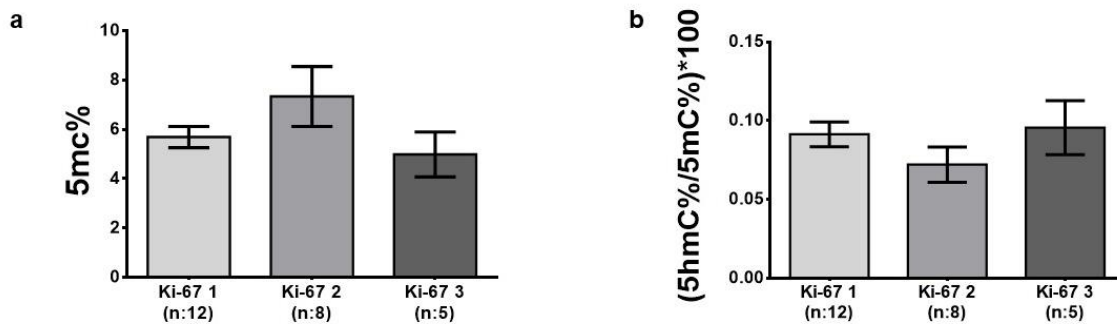
A fentiek mellett rendkívüli hálával tartozom **férjemnek** és **gyermekeimnek** az elmúlt években nyújtott segítségért, támogatásért, türelemért és biztos lelki háttérért, melyek nélkül munkám nem készülhetett volna el. Köszönöm **szüleimnek, testvéreimnek** és az egész **családomnak,** hogy támogattak és bíztattak. Köszönöm **barátaimnak,** akik szakmai és személyes támogatásuk révén segítették munkámat.

## XII. MELLÉKLETEK

### XII. 1. Leucocyta frakció DNS metilációs/demetilációs vizsgálatának eredményei



**20. ábra** PitNET szövetekhez kapcsolódó vérminták leukocita frakciójának metilációs/demetilációs státuszának vizsgálata. **a-b** 5mC%, **c-d** 5hmC% és 5mC% százalékos aránya. 5hmC: 5-hidroximetilcitozin, 5mC: 5-metilcitozin, GH: növekedési hormont termelő PitNET, FSH/LH+: follikulus stimuláló hormon/luteinizáló hormon pozitív gonadotrop PitNET, HN, SF-1+: hormon negatív, steroidogen faktor 1 pozitív gonadotrop PitNET, HN, Tpit1: hormon negatív, T-box család TBX19 tagjára pozitív, corticotrop PitNET, HN-NC: hormon negatív, null sejtes PitNET.



**21. ábra** PitNET szövetekhez kapcsolódó vérminták DNS metilációs/demetilációs státusza Ki-67 index függvényében. Ki-67-1:1%-2%; Ki-67-2:3%-4%; Ki-67-3: >4%.