

A DNS metiláció/demetiláció státusz jelentőségének vizsgálata hypophysis neuroendokrin daganatokban

Doktori Tézisek

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. Sótónyi Péter, D.Sc., Ph.D., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Nagy Géza, D.Sc., Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Ponyi Péter Ph.D.

Budapest

2022

Bevezetés

A DNS metilációja az alapvető biológiai folyamatok közé tartozik (X kromoszóma inaktiváció, gén imprinting), de a tumorigenezisben is fontos szerepet játszik.

A DNS metilációja a citozin nukleotidok metil szubsztitúciója, a demetilációja a metil csoport eliminálása a genomból. A szubsztitúciót a DNS metil-transzferáz (DNMT) enzimek katalizálják, melyek közül a DNMT1 a replikációt követően aktív. Kofaktorai a SAM (S-adenozil metionin) és az UHRF1 (Ubiquitin Like With PHD and Ring Finger Domain 1). A metil csoport eliminálását többlépcsős oxidáción keresztül a TET (Ten- Eleven Translocation Methylcytosin Dioxygenases) enzimek katalizálják, melyek fontos kofaktorai az UHRF2 (Ubiquitin Like With PHD and Ring Finger Domain 2) és a 2-oxoglutarát. Az 5-metilcitozinból (5mC) először 5-hidroximetilcitozin (5hmC), majd 5-formilcitozin (5fC), végül 5-karboxicitozin (5caC) keletkezik. Az oxidált formák közül a legnagyobb mennyiségben az 5hmC van jelen a genomban. Az 5mC a citozin nukleotidok átlagosan 5%-át, az 5hmC kevesebb, mint 1%-át jelentik.

A metiláció a gének szabályozó (promóter) régióinak magas citozin-guanin tartalmú szegmenseire jellemző. Általában transzkripcionális represszióhoz vezet, így a génkifejeződés szabályozása céljából változik a sejtciklus és a differenciálódás során.

A DNS metilációjának vizsgálatára vonatkozó irodalmi adatok ellentmondásosak.

Legelterjedtebben használt technikák (biszulfit konverziót követő Sanger vagy új generációs szekvenálás, gyöngy, vagy array hibridizáció) esetében a citozin intermedierek elkülönítése nem megoldott. Ez nagy nyomású folyadék kromatográfiával kötött tömegspektrometriával (HPLC-MS/MS) oldható meg egy lépésben.

A DNS metiláció szerepe a tumorigenezisben általános, így terápiás célpont. Egyik lehetőség a DNMT szelektív gátlása. Ezek közül klinikumban is használt citozin analóg a decitabin, ami a DNS-be beépülve irreverzibilisen köti a DNMT1 enzimet. Másik lehetőség a régóta használt farmakonok epigenetikai hatásainak megismerése és kiaknázása. Ezek közül ígéretes farmakon a nem szteroid fájdalom-, és gyulladáscsökkentő aszpirin.

A hypophysis neuroendokrin daganatok (PitNET) a gyakori intrakraniális daganatok közé tartoznak (1:1064), a hypophysis elülső lebenyének daganatai.

Morbiditásuk oka a térfoglalás és az endokrin rendszerre gyakorolt hatás. Klasszifikációjuk alapja a termelt hormon(ok), mellett a kiindulási sejtvonalra jellemző transzkripciós faktor(ok) jelenléte. Így különítenek el szomatotrop (GH (PRL); PIT-1) laktotrop (PRL; PIT-1 és ER) thyrotrop (TSH; PIT-1 és GATA-2), corticotrop (ACTH; T-PIT), és gonadotrop (FSH/LH; SF-1 és GATA-2 és ER) daganatokat. A transzkripciós faktorok segítségével a hormon negatív (HN) minták is elkülöníthetők.

Hypophysis neuroendokrin daganatok metilációs mintázatára vonatkozóan egyedi gének hipermetilációját (*CDKN2A*, *GADD45γ*, *PTAG*) írták le. Teljes genom vizsgálatából néhány tanulmány született, melyek kevés egybehangzó eredményeik egyike, hogy a hormont nem termelő daganatok metilációja a legmagasabb. Emellett megállapították a hormontermelésben érintett gének szerepét. A többi citozin intermedierre vonatkozóan nincs adat.

Célkitűzés

A túlnyomórészt sporadikus (95%) megjelenésű daganatok háttérében, főként a nem funkcionális daganatok esetében kiváltó genetikai okot nem azonosítottak, így egyre hangsúlyosabbá váltak az epigenetikai, így a DNS metilációs vizsgálatok.

1) Képzésem során célom a PitNET-ek teljes genomjának metilációs/demetilációs státuszának meghatározása, és annak klinikopatológiai paraméterekkel való összefüggésének vizsgálata, mint esetleges biomarker.

2) A DNS metiláció demetilációs eltérések háttérében álló enzimcsaládok és azok aktivitásához szükséges kofaktorok génexpressziós vizsgálata.

3) A felismert összefüggések vizsgálata hypophysis sejtvonalakon epigenetikai hatású farmakonokkal.

a) A DNMT1 szelektív inhibitor, a decitabin vizsgálata a sejtek túlélésére és életképességére.

b) Az aszpirin (ASA) hatása a sejtosztódásra, proliferációra, és hatásmechanizmusának pontosabb megismerése.

Módszerek

A kutatómunkám során felhasznált 57 PitNET szövetminta az Országos Klinikai Idegtudományi Intézetből került begyűjtésre 2007-2017 között kutatócsoportunk által. Ezt követően a minták RNS stabilizációs reagensben (RNA later) -80°C -on voltak tárolva. A klinikai diagnózis a WHO 2017-es irányelveinek megfelelően került meghatározásra. A rutin (hormon, Ki-67 proliferációs marker), és saját beállított (transzkripciós faktorok, 5hmC) immunhisztokémiai vizsgálatokat a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Rákkutató Intézetében végezték.

Eredményeim validálásához korábbi publikációkhoz tartozó génexpressziós és proteomikai eredményeket is felhasználtam.

Két hypophysis neuroendokrin daganat sejtvonalon (Rc-4B/C, GH3) végeztem *in vitro* kísérleteket, melyeken vizsgáltam a két farmakon, a decitabin ($5\mu\text{M}$, 7 nap) és az ASA (5mM , 3 nap) hatását. A kontroll az oldáshoz is használt DMSO volt.

DNS, valamint RNS izolálást humán szövetekből és *in vitro* sejt pellettekből végeztem. A DNS-ből ezt követően

HPLC-MS/MS (ESI) segítségével történt a citozin, 5mC, és 5hmC mennyiségi meghatározása, amikből a metilációs (5mC) és demetilációs $((5hmC\%/5mC\%) * 100)$ profilra vontam le következtetést.

A teljes RNS frakcióból reverz transzkripciót követően egyedi gének génexpresszióját TaqMan assay segítségével vizsgáltam (*DNMT1*, *TET1-3*, *UHRF1-2*). Ezen kívül *in vitro* aszpirin kezelést követően Rc-4B/C sejtekből izolált RNS frakcióból transzkriptom szekvenálás történt (NEBNext Ultra II Directional RNA Library Kit, Illumina Novaseq 6000).

In vitro sejttenyészeteken a fentiek mellett életképességi vizsgálatokat végeztem két különböző elven alapuló technikával, valamint scratch teszttel elemeztem ASA kezelést követően a sejtek migrációs hajlamát. A sejtciklus analízise, illetve a Ki-67 fehérje mennyiségi meghatározása áramlási citometriával történt. Az ASA *PTTG1* gén promoterére gyakorolt hatását *PTTG1* promoter luciferáz riporter rendszerben vizsgáltuk, ahol az aktivitás változást Luciferase assay-vel mértük.

Fehérje mennyiségi vizsgálatához Western blotot végeztem anti-TP53, anti-acetil-TP53, anti-PTTG1, anti- β -aktin.

Eredmények

Humán PitNET szövetek teljes genomjának vizsgálata során az 5mC szintjében lényeges különbséget nem mértünk sem a különböző hisztológiai csoportok, sem az eltérő proliferációs aktivitású minták között. Lényeges különbséget állapítottunk meg a demetilációt jellemző 5hmC/5mC arányban. A HN csoport esetében a demetiláció jelentősebb mértékű, mint FSH/LH+ vagy GH termelő daganatok esetében. Emellett a két különböző differenciáltsági állapotú gonadotrop csoport (FSH/LH+; HN, SF-1) között szintén szignifikáns különbséget mértünk. Proliferációs aktivitás tekintetében a genom 5hmC tartalma csökken az emelkedő proliferációs aktivitással. Ez az összefüggés hisztológiai csoportbontást követően is megfigyelhető, valamint immunhisztokémiai vizsgálatok is alátámasztják.

A DNS metiláció/demetilációs profilt kialakító enzimek (*DNMT1*, *TET1-3*) génexpressziója korábban publikált adatok alapján nem mutat összefüggést a hisztológiával vagy invazivitással. Saját vizsgálataink alapján megállapítottuk, hogy míg a *DNMT1* expressziója

lényegesen nem változik a proliferációs aktivitással, addig a *TET* enzimek mindegyikének emelkedik az mRNS szintje a magasabb Ki-67 pozitivitással. Az *UHRF1* nem mutat összefüggést a genom 5mC szintjével, azonban az *UHRF2* pozitívan korrelál a genom 5hmC szintjével.

A metilációs/demetilációs profil és a proliferáció közti összefüggés vizsgálatára decitabin kezelést végeztünk *in vitro*. Ennek eredményeként az irodalomban szereplő csökkent 5mC, emelkedett 5hmC szinteket kaptuk, aminek hatására csökkent a sejtek viabilitása, osztódóképessége mindkét sejtvonalon.

In vitro ASA kezelést követően a genom 5mC szintje jelentősen nem változott, míg az 5hmC mennyisége jelentősen emelkedett. A metilációs/demetilációs profilt kialakító enzimek génexpressziós vizsgálata ezzel egybehangzóan a *DNMT1* és *UHRF1* esetében nem mutatott különbséget, míg a három *TET* enzim és *UHRF2* esetében szignifikáns emelkedést mutatott ASA hatására. A *TET* enzimek génexpressziója pozitív korrelációt mutat a genom 5hmC szintjével.

A transzkriptom szekvenálás során az ASA és a kontroll minták elkülönültek (t-SNE analízis). Az eltérően expresszált gének (Bioconductor edgeR csomag) segítségével vizsgáltuk az ASA hatásmechanizmusát, ehhez útvonal, valamint hálózat analízist és transzkripció faktor aktivitás elemzését használtuk.

Az útvonal és génontológiai elemzés (Gene Ontology, KEGG) alapján az ASA legnagyobb mértékben a sejtciklusra van hatással, amit a Ki-67 csökkent mennyisége is jelzett. Ennek alátámasztására *in vitro* funkcionális vizsgálatokat végeztem, melyek során bizonyítottam a sejtek csökkent viabilitását, osztódóképességét ASA kezelést követően. Az áramlási citometriás mérés megerősítette a Ki-67 fehérje pozitivitás csökkenését. Emellett ASA kezelést követően a sejtek csökkent migrációs hajlamát is megállapítottam.

A hálózat elemzés alapján a 10 legtöbb interakcióban szereplő gén a sejtproliferációt, sejtosztódást, a DNS stabilitást és az ubikvitinizációt szabályozzák.

A megváltozott génexpressziós profil 12 transzkripció faktorral megváltozott aktivitásához köthető. Ezek közül

legmeghatározóbb a Tp53, melynek 25 célgénje is megváltozott expressziót mutat.

Vizsgálataink alapján az aktivitás változás oka nem a génexpresszió emelkedése, hanem a fehérje acetilációja a K382 pozícióban. Annak alapján, hogy a genom 5hmC% szintjével pozitív korrelációt mutat a *Tp53* mRNS mennyisége a két paraméter között összefüggés állhat fent.

A Tp53 által szabályozott gének egyike a *Pttg1*, ami ezzel együtt a hypophysis tumorigenezisben a fő onkogének közé tartozik. Vizsgálataink alapján mind a *Pttg1*, mind az interakciós fehérjéi csökkent mennyiségben vannak jelen ASA kezelést követően. *Pttg1* esetében ezt *in vitro* kísérletekben RT-qPCR és Western blottal igazoltam mRNS és fehérje szinten. A downregulációt *Pttg1* promoter luciferáz riportter rendszerben vizsgáltuk aszpirin és decitabin kezelést követően. A két farmakon eltérő mértékben, de csökkentette a promoter aktivitását. A *Pttg1* expressziója negatív korrelációt mutat a genom 5hmC% szintjével.

Humán PitNET-ek esetében nem találtam összefüggést a genom metilációs vagy demetilációs státusza és a *Pttgl* expressziója között.

Az *in vitro* ASA kezelés hatását vettem össze humán PitNET minták korábbi transzkriptomikai és fehérje expressziós adataival (76 PitNET, 34 normál hypophysis). Az ASA kezelést követően megváltozott expressziójú, és a PitNET-ekben diszregulált géneket 22,2%-os átfedést találtunk. A gének többsége a sejtproliferációt, sejtciklust, a p53 aktivitást befolyásolja, de a genom stabilitásra és a sejtek migrációjára hatók is szerepeltek.

Következtetések

1) Elsőként vizsgáltam hypophysis neuroendokrin daganatok teljes genomi állományának metiláció/demetilációs státuszát, annak a klinikopatológiai paraméterekkel való összefüggését, és a kialakulás okát. Megállapítottam, hogy PitNET-ek esetében a DNS demetilációja, és annak szabályozása a mérvadó, annak mértéke nagyban függ a differenciáltsági foktól, és a proliferációs aktivitástól.

2) A demetilációs folyamat hátterében az annak kialakításában meghatározó *TET* enzimek és *UHRF2* kofaktor megváltozott génexpressziója állhat.

3) Az *in vitro* sejttenyészeteken végzett vizsgálatok alapján a demetilációt befolyásoló ágensek hatásai hypophysis daganat sejtekben:

a) A klinikumban is használt decitabin hatására emelkedik a genom 5hmC szintje, ezzel párhuzamosan csökken a sejtek proliferációs aktivitása. Ezek alapján felmerülhet, mint potenciális terápiás lehetőség terápia rezisztens PitNET-ek esetében.

b) Kevésbé agresszív, nem szteroid gyulladáscsökkentő, az aszpirin (ASA) a

metiláció/demetilációs egyensúlyt szintén a demetiláció irányába tolja el. Ezzel együtt csökkent sejtproliferációhoz vezet. A fokozott demetilációval egybehangozóak a kialakító enzimek és kofaktor expressziói.

c) Az aszpirin vizsgálataink alapján több szinten fejti ki antiproliferatív hatását. Ennek részeként elsőként írtuk le a demetiláció/*PTTG1*/p53 szabályozó kört, ahol 1. az ASA a *TET* enzimek expresszióján keresztül demetilációt okoz, 2. a *PTTG1* expressziót promotor szinten gátolja, 3. demetiláción keresztül is befolyásolja a *PTTG1* expressziót, valamint 4. acetiláción keresztül hozzájárul a p53 fehérje fokozott aktivitásához, amire a csökkent *PTTG1* expresszió szintén pozitív hatással van.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájához kapcsolódó közlemények

B. Szabó, K. Németh, K. Mészáros, N. Szücs, S. Czirják, L. Reiniger, H. Rajnai, I. Krencz, K. Karászi, L. Krokker, A. Patócs and H. Butz, Demethylation Status of Somatic DNA Extracted From Pituitary Neuroendocrine Tumors Indicates Proliferative Behavior, *J Clin Endocrinol Metab.* **105** (2020), DOI: 10.1210/clinem/dgaa156.

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), DOI: 10.1210/clinem/dgac496.

A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények

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

K. Németh, O. Darvasi, I. Likó, N. Szücs, S. Czirják, L. Reiniger, B. Szabó, P.A. Kurucz, L. Krokker, P. Igaz, A.B. Patócs and H. Butz, Next-generation sequencing identifies

novel mitochondrial variants in pituitary adenomas, *J ENDOCRINOL INVEST.* **42** (2019), 931–940.

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

K. Németh, N. Szücs, S. Czirják, L. Reiniger, B. Szabó, G. Barna, K. Karászi, P. Igaz, Z. Vladimir, 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.

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