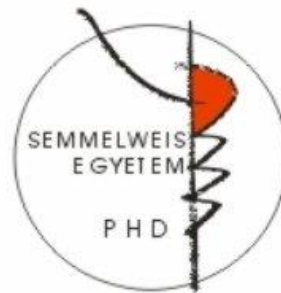


Genetikai és epigenetikai biomarkerek hypophysis adenomákban

Doktori értekezés

Fülöpné Németh Kinga

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs
Dr. Hubina Erika, Ph.D., főorvos

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

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Putz Zsuzsanna, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Takács Krisztina, Ph.D., tanszékvezető egyetemi docens

Budapest
2019

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
I. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR)	9
I.1. Hypophysis adenomák gyakorisága és típusai	9
I.2. Hypophysis adenomákban leggyakrabban észlelt molekuláris eltérések.....	10
I.2.1. Genetikai mutációk a családi halmozódást mutató hypophysis adenomákban	10
I.2.2. Genetikai mutációk a sporadikus hypophysis adenomákban	12
I.2.3. Epigenetikai tényezők	13
I.2.4. MikroRNS szabályozás	15
I.2.5. Jelátviteli útvonalak.....	16
I.2.6. Apoptózis útvonal.....	18
I.2.7. A sejtciklus	20
I.3. Biomarkerek.....	21
I.3.1. A hypophysis adenomák diagnózisa	21
I.3.2. Hypophysis adenoma biomarkerek	22
I.3.3. Keringő mikroRNS biomarkerek	25
I.4. Terápiás lehetőségek hypophysis adenomákban	26
I.4.1. A TRAIL indukált apoptózis mint terápiás lehetőség	27
I.4.2. Az aszpirin daganatellenes hatása	28
I.4.3. A survivin szerepe	30
I.4.4. Az YM155 survivin inhibitor kis molekula	31
I.5. A humán mitochondriális genom	32
I.5.1. Mitochondriális variánsok különböző daganatszövetekben.....	32
I.5.2. Újgenerációs szekvenálás alkalmazása a mitochondriális genom vizsgálatára	33
II. CÉLKITŰZÉSEK.....	35
III. MÓDSZEREK.....	37
III.1. Betegminták.....	37
III.2. Nukleinsav izolálás.....	41
III.2.1. DNS izolálás sejt- és szövetmintákból	41
III.2.2. RNS izolálás sejt-, szövet- és plazmamintákból	41
III.3. Extracelluláris vezikulák izolálása és elemzése.....	41
III.4. Hagyományos és újgenerációs szekvenálás	42

III.4.1.	DNS könyvtárkészítés	42
III.4.2.	Kis RNS könyvtárkészítés	43
III.4.3.	Újgenerációs szekvenálás	43
III.4.4.	Sanger szekvenálás	43
III.5.	Gén- és miRNS expressziós mérések RT-qPCR alapú módszerekkel	44
III.5.1.	Expressziós profil meghatározás TaqMan Low Density Array kártyával	44
III.5.2.	Egyedi mRNA és miRNA expresszió meghatározás RT-qPCR technikával	45
III.6.	Fehérje expressziós vizsgálatok	46
III.6.1.	Western blot analízis	46
III.6.2.	Immunhisztokémia	47
III.7.	Sejtenyészeteken végzett <i>in vitro</i> vizsgálatok	47
III.7.1.	Sejtenyésztés	47
III.7.2.	<i>In vitro</i> kezelések	48
III.7.3.	Életképesség és proliferációs assay	48
III.7.4.	Apoptózis és DNS fragmentációs assay	49
III.7.5.	Apoptózis és sejtciklus vizsgálat áramlási citometriával	50
III.7.6.	Plazmid transzfekció	50
III.7.7.	siRNA transzfekció	51
III.8.	Xenograft kísérlet	51
III.9.	Bioinformatikai és statisztikai módszerek	52
III.9.1.	A mitochondriális genom szekvenálásának bioinformatikai elemzése	52
III.9.2.	A mikroRNA szekvenálás bioinformatikai elemzése	52
III.9.3.	Statisztikai elemzések	53
IV.	EREDMÉNYEK	54
IV.1.	A hypophysis adenomák mitochondriális genomjának elemzése	54
IV.1.1.	A teljes mitochondriális genom vizsgálata újgenerációs szekvenálással	54
IV.1.2.	A mitochondriális variánsok validálása Sanger szekvenálással	60
IV.2.	Keringő miRNA biomarkerek keresése hypophysis adenomás betegekben .	60
IV.2.1.	Plazma miRNA és isomiR profil elemzése újgenerációs szekvenálással	62
IV.2.1.1.	<i>Hypophysis adenomás betegek plazma miRNA profiljának összehasonlítása</i> 62	
IV.2.1.2.	<i>Plazma isomiR-ek összehasonlítása a különböző csoportokban</i>	62
IV.2.1.3.	<i>Hypophysis adenoma specifikus miRNA-ek</i>	63

IV.2.2. Pre-, és posztoperatív plazmában előforduló miRNS-ek összehasonlítása.....	66
IV.2.2.1. A preoperatív és késői posztoperatív mintapárok elemzése újgenerációs szekvenálással.....	66
IV.2.2.2. Kiválasztott miRNS-ek validálása egyedi RT-qPCR-rel.....	69
IV.2.2.3. A miR-143-3p szintjének változása a tumor eltávolítását követően.....	72
IV.2.2.4. Extracelluláris vezikula (EV) asszociált miRNS-ek.....	74
IV.3. Új terápiás lehetőségek keresése hypophysis adenomákban	75
IV.3.1. A survivin és a TRAIL expressziójának vizsgálata hypophysis adenoma szöveteken	75
IV.3.2. A TRAIL indukált apoptózis vizsgálata <i>in vitro</i> hypophysis adenoma sejtvonalon.....	77
IV.3.3. Az acetil-szalicilsav hatásának vizsgálata <i>in vitro</i> hypophysis adenoma sejtvonalakon.....	77
IV.3.3.1. Az acetil-szalicilsav hatása a sejtek életképességére és az apoptózisra.....	77
IV.3.3.2. A survivin expressziójának változása acetil-szalicilsav kezelésre.....	79
IV.3.3.3. Az acetil-szalicilsav kezelés hatása a sejtciklusra	79
IV.3.4. Az acetil-szalicilsav sejtszámcsökkentő hatásának háttérben álló mechanizmus vizsgálata	79
IV.3.4.1. A survivin gátlás hatása a hypophysis adenoma sejtekre.....	80
IV.3.4.2. Az acetil-szalicilsav kezelés survivin-független hatása a sejtciklusra	80
IV.3.4.3. A survivin túlexpresszáltatásának hatása a hypophysis adenoma sejtekre ...	82
IV.3.5. Hypophysis adenoma xenograft modell létrehozása.....	82
V. MEGBESZÉLÉS.....	84
V.1. Mitochondriális génvariánsok azonosítása és klinikai összefüggéseinek vizsgálata hypophysis adenomákban.....	84
V.2. Keringő miRNS-ek vizsgálata hypophysis adenoma biomarkerek azonosítása céljából.....	87
V.3. Új terápiás célpontok keresése és <i>in vitro</i> vizsgálata hypophysis adenomákban.....	91
VI. KÖVETKEZTETÉSEK.....	95
VII. ÖSSZEFOGLALÁS.....	97
VIII. SUMMARY	98

IX. IRODALOMJEGYZÉK.....	99
X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	129
X.1. Az értekezés témájához kapcsolódó saját publikációk jegyzéke	129
X.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó saját publikációk jegyzéke.....	129
XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	131
XII. MELLÉKLETEK	133

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACTH	adrenocorticotrop hormon
Ago	Argonauta
AIP	aril hidrokarbon receptor-kölcsönható fehérje
ANOVA	varianciaelemzés
ASA	acetyl-szalicilsav, aszpirin
ATCC	Amerikai Sejtgyűjtemény (American Type Culture Collection)
AURKB	Aurora kináz B
BSA	szarvasmarha szérum albumin
cAMP	ciklikus adenzin monofoszfát
CCNA2	ciklin A2
CDC25	cell division cycle 25 gén
CDK2	ciklin dependens kináz 2
CDKN1B	ciklin dependens kináz inhibitor 1B
CDKN2A	ciklin dependens kináz inhibitor 2A
CNC	Carney-complex
COX	ciklooxigenáz
CPC	chromosome passenger complex
DMEM	Dulbecco-féle módosított Eagle-féle médium
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	deoxiribonukleinsav
DR4	halálreceptor 4
DR5	halálreceptor 5
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EGF	epidermális növekedés faktor (epidermal growth factor)
EV	extracelluláris vezikula
FasL	Fas ligand
FBS	magzati borjúsérum
FC	fold change
FGF2	fibroblaszt növekedési faktor 2
FIPA	familiáris izolált hypophysis adenoma

FSH	follikulus stimuláló hormon
G1 fázis	1-es növekedési fázis
G2 fázis	2-es növekedési fázis
GADD45 γ	growth arrest and DNA damage-inducible 45 γ
GATK	Genome Analysis Toolkit
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
GH	növekedési hormon
GHRH	növekedési hormont felszabadító hormon
GHPA	GH termelő hypophysis adenoma
GNAS1	Gs protein α alegységének génje
GSK β	glikogén szintáz kináz β
HA	hypophysis adenoma
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-piperazin-1-etánszulfonsav
HMGA2	high mobility group AT-hook 2
HN	hormon negatív
iAP	apoptózist gátló fehérjék (inhibitor of apoptosis proteins)
IHK	immunhisztokémia
IL6	interleukin-6
INCENP	belső centromer protein
KO	knockout
LH	luteinizáló hormon
MAP	mitogén aktivált protein
MAPK	MAP kináz
MEG3	maternal imprinted gene 3
MEK	MAP kináz kináz, MAPKK
MEM α	Minimum Essential Medium α
MEN1	1-es típusú multiplex endokrin neoplázia
MEN4	4-es típusú multiplex endokrin neoplázia
MT-CYB	citokróm b
MT-ND1	NADH-dehidrogenáz 1
MT-ND4	NADH-dehidrogenáz 4
mTor	mammalian target of rapamycin

NEAA	nem-esszenciális aminosavak
NF1	neurofibromin-1
NFPA	nem-funkcionáló hypophysis adenoma
NGS	újgenerációs szekvenálás
NIH	National Institute of Health
nt	nukleotid
PBS	phosphate buffered saline, foszfát puffer
pCDK2	foszfo-CDK2
PI3K	foszfatidil inozitol 3 kináz
PI3KCA	PI3K katalitikus alegysége
Pit-1	pituitary-specific positive transcription factor 1
PRKAR1A	protein kináz A 1 alfa reguláló alegység
PRL	prolaktin
PTTG	pituitary tumor transforming gene
PVDF	polivinilidén-difluorid
RB1	retinoblasztoma
RET	rearranged during transfection
RNS	ribonukleinsav
ROC	receiver operating characteristic
RT-qPCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
S fázis	szintézis fázis
SCID	súlyos kombinált immunhiány
SDHD	szukcinát-dehidrogenáz D
SF-1	splicing factor 1
siRNS	kis interferáló ribonukleinsav
SNV	egy pontos nukleotid variáns
Sp1	specificity protein 1
TBS	Tris-buffered saline
TBST	Tween-20 tartalmú TBS oldat
TEM	transzmissziós elektronmikroszkóp
TGF β	tumor growth factor β
TLDA	TaqMan Low Density Array

TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TP53	tumor protein 53
TRAIL	TNF-szerű apoptózis indukáló ligand
tRNS	transzfer RNS
TRPS	tunable resistive pulse sensing
TSH	pajzsmirigy stimuláló hormon
UMI	egyedi molekuláris index
VEGF	vaszkuláris endotheliális növekedési faktor
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organization)
X-LAG	X-kapcsolt akrogigantizmus

I. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR)

I.1. Hypophysis adenomák gyakorisága és típusai

A hypophysis adenomák az intrakraniális tumorok 10-15%-át alkotják. Előfordulásuk eléri az 1/1000 esetet, amellyel a gyakori daganattípusok közé tartoznak (Asa és Ezzat 1998; Daly és mtsai 2006; Fernandez és mtsai 2010). Térfoglalásuk, és az endokrin rendszerre gyakorolt hatásuk miatt morbiditásuk jelentős (Dworakowska és Grossman 2009).

Méretük alapján elkülöníthetjük a valamivel gyakoribb (57,4%), 10 mm-nél kisebb mikro-, és a 10 mm-es, vagy annál nagyobb méretű makroadenomákat (42,6%). Utóbbiak mérete extrém esetben a 4-5 cm-t is meghaladhatja (Daly és mtsai 2006).

A hypophysis adenomák megközelítőleg 70%-a hormonálisan aktív, úgynevezett funkcionális adenoma, amelyek hormontermelésük révén klinikai tüneteket okoznak (például akromegáliát, Cushing-kórt), míg 30%-uk klinikailag nem-funkcionáló (hormonálisan inaktív) adenoma. Ezekben a sejtek hormontermelése csak az eltávolítást követő immunhisztokémiai vizsgálattal mutatható ki. A hypophysis tumorok általában monoklonális eredetűek, és a szekretált hormon(ok) milyenségét a tumor szövettani eredete határozza meg, mely alapján elkülönítünk somatotrop (növekedési hormont (GH) és/vagy prolaktint (PRL) termelő), lactotrop (általában prolaktint, ritkán fokálisan növekedési hormont termelő), thyrotrop (pajzsmirigy stimuláló hormont (TSH) termelő), corticotrop (adrenocorticotrop hormont (ACTH) termelő) és gonadotrop (follikulus stimuláló hormont (FSH) és/vagy luteinizáló hormont (LH) termelő) eredetű adenomákat. Egyes adenomák többféle hormont is termelhetnek (plurihormonális adenomák), míg mások immunhisztokémiai festéssel is negatívak minden hormonra (Al-Shraim és Asa 2006; Osamura és mtsai 2017; Nishioka és Inoshita 2018).

A hypophysis daganatok osztályozása során az Egészségügyi Világszervezet (WHO) által kiadott ajánlások az irányadók. Sokáig a 2004-ben megjelent klasszifikációs rendszer volt a mérvadó, ám 2017-ben kiadtak egy újabb módosítást, amely a hypophysis adenomák csoportosítását alapjaiban változtatja meg, és a korábbi rutin módszereken felül további vizsgálatokat igényel (Mete és Lopes 2017).

A korábbi osztályozási rendszer a klinikai diagnózis alapján két nagy csoportot különít el: a hormontermelő (funkcionális) és a hormonálisan inaktív (nem-funkcionáló) adenomákat. Utóbbiakon belül az immunhisztokémiai vizsgálattal a hormonfestődés alapján altípusokat különböztet meg (Al-Shraim és Asa 2005). Az új klasszifikáció ezzel szemben a csoportosítás alapjának a daganat sejttani eredetét tekinti, amelyhez az elülső lebeny hormonjainak (GH, PRL, FSH, LH, ACTH, TSH) rutin vizsgálata mellett transzkripciós faktorok immunhisztokémiai vizsgálatát is javasolja, különösen a hormon negatív (HN) adenomák esetében. Az új definíció szerint például „null sejtes” adenoma csak az a HN adenoma lehet, amely a vizsgált transzkripciós faktorokra (SF-1, Pit-1 és T-pit) sem mutat pozitivitást (Mete és Lopes 2017).

A hypophysis carcinomák nagyon ritkák, az összes hypophysis tumor megközelítőleg 0,1%-át teszik ki. Elkülönítésük morfológiai tényezők alapján nem lehetséges, diagnózisuk kizárólag a már meglévő áttétek azonosításán alapul (Kaltsas és mtsai 2005; Mete és Lopes 2017).

I.2. Hypophysis adenomákban leggyakrabban észlelt molekuláris eltérések

A hypophysis daganatok kialakulásával kapcsolatban két fő elmélet létezik. Az egyik szerint a daganatok kialakulásának hátterében a hypothalamus primer neuroszekréción zavar (például GHRH (GH felszabadító hormon) túltermelés), míg a másik szerint a hypophysis sejtekben fellépő elváltozások állnak. Ezutóbbi mellett szól a monoklonális eredet, és hogy a daganatsejtekben egyre több molekuláris elváltozás jelenlétét sikerül igazolni. A két jelenség együttes előfordulása is lehetséges, például hogy a hypophysis sejtekben bekövetkező változások révén kialakuló daganat növekedését a hypothalamus megváltozott hormontermelése serkenti (Alexander és mtsai 1990; Herman és mtsai 1990; Rác 2011).

I.2.1. Genetikai mutációk a családi halmozódást mutató hypophysis adenomákban

A hypophysis adenomák 95%-ban sporadikusan fordulnak elő, mindössze 5%-uk familiáris megjelenésű (Daly és mtsai 2009).

Az öröklődő hypophysis adenomák patogenezise viszonylag jól ismert, kialakulásukért alapvetően négy gén, a *MEN1* (multiplex endokrin neoplázia 1), a *CDKN1B* (ciklin dependens kináz inhibitor 1B), a *PRKARIA* (protein kináz A 1 alfa reguláló alegység), és az *AIP* (aril hidrokarbon receptor-kölcsönható fehérje) csírasejtes mutációit teszik felelőssé. Emellett az utóbbi években a hypophysis adenomák kialakulásával kapcsolatba hozták az *SDH* (szukcinát-dehidrogenáz) gének mutációit (Xekouki és mtsai 2010; Xekouki és Stratakis 2012), és az X kromoszómán megjelenő mikroduplikációkat is (X-LAG, X-kapcsolt akrogigantizmus) (Scherthaner-Reiter és mtsai 2016), valamint egy Cushing kórban szenvedő páciens esetében, aki *MEN1* mutációra negatív volt, *RET* (rearranged during transfection) mutációt azonosítottak (Naziat és mtsai 2013). Mindazonáltal a fentiek hypophysis adenomák kialakulásában betöltött szerepének pontos megértése további vizsgálatokat igényel (Lecoq és mtsai 2015).

A familiáris hypophysis adenomák megközelítőleg 60%-a *MEN1* szindrómához társul (Scheithauer és mtsai 1987). Ez egy autoszomális dominánsan öröklődő kórkép, oka elsősorban a *MEN1* gén csírasejtes mutációja, ami miatt a menin tumorszuppresszor fehérje inaktiválódik. Az ezt hordozó betegek körülbelül 40%-ánál fordul elő hypophysis adenoma, míg megközelítőleg 20%-uknál ez a betegség első manifesztációja (Vergès és mtsai 2002).

A *MEN1* szindrómához hasonló fenotípust a *MEN1* mutációra negatív betegek egy részében (megközelítőleg 3%-ában) *CDKN1B* mutáció okozza, az ehhez tartozó klinikai kórképet *MEN4* vagy *MENX* szindrómának nevezzük (Pellegata és mtsai 2006). A *CDKN1B* a p27 sejtciklus szabályozásában résztvevő tumorszuppresszor fehérjét kódolja (Lee és Pellegata, 2013). A *MEN1* szindrómás betegek körülbelül 37%-ában fordul elő általában GH, PRL, ACTH termelő, vagy nem-funkcionáló hypophysis adenoma (Alrezk és mtsai 2017).

Ritkán előforduló szindróma a Carney-complex (CNC), melynek kialakulásáért az esetek megközelítőleg 73%-ában a *PRKARIA* tumorszuppresszor gén valamely mutációját teszik felelőssé. Ez közel 100%-os penetranciát mutat, vagyis jelenlétében szinte minden esetben kialakul a betegség (Kirschner és mtsai 2000; Scherthaner-Reiter és mtsai 2016). A betegek körülbelül 10%-ában fordul elő hypophysis adenoma, amely általában GH vagy GH/PRL termelő és gyakran alakul ki akromegália vagy gigantizmus, ritkán

hiperprolaktémia. A kialakult adenoma ritkábban TSH+ vagy LH+, de ezek klinikai tüneteket nem okoznak (Pack és mtsai 2000).

A szintén ritkán előforduló McCune-Albright szindróma a *GNAS1* gén (G_s protein α alegységének génje) mutációja révén alakul ki, és a betegek 20-30%-ánál akromegáliás tünetekkel társul. Csírasejtesen autoszomális dominánsan öröklődő betegség, de leggyakrabban nem öröklődő, hanem szomatikus mutációként jelentkezik.

Emellett az 1-es típusú neurofibromatózishoz (NF1) is társulhat hypophysis adenoma, ám ebben az esetben az *NF1* (neurofibromin-1) gén hypophysis adenoma kialakulásában betöltött szerepe nem tisztázott. A *DICER1* tumorszuppresszor gén mutációja révén kialakuló DICER1 szindrómához pedig ACTH termelő hypophysis blasztóma társulhat (Caimari és Korbonits, 2016).

Az *AIP* tumorszuppresszor gén mutációi familiáris izolált hypophysis adenomát (FIPA) okoznak. Az ilyen formában megjelenő adenomák körülbelül 20%-áért az *AIP* gén valamely mutációja a felelős, és ezek leggyakrabban GH és/vagy PRL termelő, ritkábban nem-funkcionáló adenomák (Beckers és mtsai 2013).

I.2.2. Genetikai mutációk a sporadikus hypophysis adenomákban

A familiáris esetekkel ellentétben a sporadikus hypophysis adenomák kialakulásának molekuláris háttere sokkal kevésbé tisztázott.

A *MEN1*, a *CDKN1B*, a *PRKARIA* és az *AIP* gének mutációi a sporadikus adenomák esetén ritkán fordulnak elő, és kóroki szerepük nem igazolt (Evans és mtsai 2000; Iwata és mtsai 2007; Kaltsas és mtsai 2002; Raitila és mtsai 2007; Scherthaner-Reiter és mtsai 2016; Yamasaki és mtsai 2003). Ugyanez igaz a klasszikus tumorszuppresszor génekre (pl. *TP53*, *RBI*) és onkogénekre (pl. *HRAS*, *MYC*), melyek mutációi más daganatokkal ellentétben, csak ritkán azonosíthatók, és a jelenlegi kutatások alapján ezek patogenezisben betöltött szerepe csak másodlagos (Honda és mtsai 2003; Levy és mtsai 1994; Vandeva és mtsai 2010).

Külön csoportot alkotnak azok a sporadikus adenomák, melyekben csírasejtesen előfordul valamilyen hajlamosító mutáció, de családi halmozódás nem ismert. Ez

leggyakrabban *AIP* mutációt jelent, melynek prevalenciája a sporadikus adenomákkal rendelkező betegek között megközelítőleg 4%-os, ennél valamivel gyakoribb (8-18%-os) a makroadenomával vagy gigantizmussal diagnosztizált gyerekek és fiatal felnőttek körében (Lecoq és mtsai 2015). Ezt követi a *MEN1* mutáció, így a genetikai diagnózis felállításakor elsősorban a fenti gének vizsgálata lehet indokolt, míg a *CDKN1B* és a *PRKARIA* mutációk szűrése azokban az esetekben merülhet fel, ahol a hypophysis adenomán kívül más tumorok vagy egyéb endokrin manifesztáció is megjelenik (Lecoq és mtsai 2015).

A másik típusba tartoznak azok a sporadikus adenomák, amelyeknél csírarsejtesen nem fordul elő ismert hajlamosító mutáció, viszont szomatikusan kimutatható valamilyen genetikai és/vagy epigenetikai eltérés (Lecoq és mtsai 2015; Melmed 2011). Ezek jóval gyakoribbak, a *MEN1* mutáció például csírarsejtesen alig, 0,6-2,6%-ban fordul elő, a GH, PRL, ACTH termelő és nem-funkcionáló adenomák körülbelül 18%-ában viszont kimutatható a tumorsejtekben (Rácz 2011; Trouillas és mtsai 2008).

A *GNAS1* gén mutációk hatására a cAMP (ciklikus adenzin monofoszfát) termelés megnövekszik, ez serkenti a GH szintézist, és a GH termelő sejtek szaporodását. Ennek megfelelően a sporadikusan előforduló GH termelő adenomák 30-40%-ában kimutatható, míg a többi típusban csak elvétve fordul elő (Lania és mtsai 2010; Rácz, 2011). Az ACTH termelő adenomákban az USP8 deubikvitináz enzim mutációja a jellemző, amely megközelítőleg 60%-ukban azonosítható. Ezen tumorokra általában a kisebb méret, jobb prognózis, viszont intenzívebb ACTH termelés jellemző (Ma és mtsai 2015). A hypophysis adenomák 20-40%-ában kimutatható a PI3K katalitikus alegységét érintő (*PI3KCA*) pontmutáció, vagy kópiaszám növekedés (Lin és mtsai 2009). Emellett a hypophysis oncocytomák körülbelül 60%-ában fordul elő mutáció a Légzési Komplex I összetevőinek génjeiben. Ezen mitochondriális DNS mutációk összefüggést mutatnak a daganatok jóindulatú viselkedésével (Porcelli és mtsai 2010).

I.2.3. Epigenetikai tényezők

Mivel a hypophysis adenomákban kevés genetikai mutáció azonosítható, feltételezhető, hogy a megváltozott génexpressziós mintázatokban és így a daganatok patogenezisében más, például epigenetikai folyamatok is részt vesznek.

Az epigenetikai módosulás olyan folyamat, melynek során a génexpresszió megváltozása nem genetikai mutációnak köszönhető, a nukleotid sorrend változatlan marad. Legyakoribb ilyen módosulás a CpG dinucleotidokban gazdag régiókban, ún. CpG szigeteken történő DNS metiláció, amely egy promóter régió metiláltsága esetén rendszerint az adott gén expressziójának csökkenését okozza. Más epigenetikai módosulások is léteznek, például a hiszton modifikáció, a genetikai imprinting és a nem-kódoló transzkripciós regulátorok, mint a mikroRNS-ek (miRNS-ek), melyeket egy külön alponthban részletesen tárgyalok (lsd. **I.2.4. fejezet**).

Nem-funkcionáló és somatotrop hypophysis adenomákban kimutatták, hogy a *p16* gén metilációja a ciklin dependens kináz inhibitor 2A (CDKN2A) gátlása révén szerepet játszik a patogenezisben (Farrell, 2005). Egy másik tanulmányban megállapították, hogy a gén metilációja a nem-funkcionáló adenomák 70%-ában (32/46), a somatotrop adenomáknak pedig a 9,5%-ában (2/21) fordult elő, egészséges hypophysis szövetben viszont egyáltalán nem volt azonosítható (0/15) (Simpson és mtsai 1999).

Több gén esetében is kimutatták, hogy a hypophysis adenomában csökkent kifejeződésük a promóter hipermetilációjának köszönhető, ilyen például a *MEG3* (maternal imprinted gene 3) (J. Zhao és mtsai 2005), a *CDKN2A* (Yoshino és mtsai 2007), a *GADD45 γ* (growth arrest and DNA damage-inducible 45 γ) és a retinoblasztóma (*RBI*) gén (Jiang és Zhang 2013). Ugyanakkor arra vonatkozó eredmények is vannak, hogy a promóter hipermetilációja a *TERT* gén (telomerase reverse transcriptase) esetében annak emelkedett expressziójával jár együtt (Köchling és mtsai 2016). Pease és munkatársai 2013-as összefoglalójukban összesen 16 olyan tumorszuppresszor gént gyűjtöttek össze, amelyek expressziója DNS metiláció révén módosult a hypophysis adenomákban. Ezen gének nagy részének olyan alapvető folyamatokban van szerepe, mint az apoptózis, a sejtciklus, vagy a DNS hibajavítás, így megváltozott expressziójuk révén ezen útvonalak működése is felborulhat, amelynek jelentős szerepe lehet a daganatok kialakulásában és fejlődésében (Pease és mtsai 2013).

A *HMGA2* (high mobility group AT-hook 2) sejtciklust szabályozó gén hypophysis adenomákban való fokozott kifejeződése is epigenetikai módosulásoknak köszönhető, melynek egyik lehetséges mechanizmusa a mikroRNS-ek általi reguláció (D'Angelo és mtsai 2015).

A genetikai módosulásokkal ellentétben, az epigenetikai eltérések általában reverzibilisek, így ezek jelenlétének és szerepének pontosabb megismerése lehetőséget ad az erre irányuló célzott terápiák felkutatására.

I.2.4. MikroRNS szabályozás

A mikroRNS-ek (miRNS-ek) olyan, 19-25 nukleotid (nt) hosszú, nem-kódoló RNS molekulák, amelyek az alapvető szabályozó funkciók (például a sejtosztódás, a sejthalál és a sejt differenciálódás) finomhangolásában vesznek részt. Szabályozó szerepüket a gének poszttranszkripcionális módosítása révén fejtik ki úgy, hogy az mRNS 3' nem-transzlálódó (UTR) régiójához kapcsolódva az mRNS degradációját vagy a transzlációt gátlását okozzák (Bartel, 2004; Lai, 2002). A miRNS-célgén felismerés szekvencia-komplementaritás alapján történik, és alapvetően az érett miRNS 5' végén elhelyezkedő 7-8 nt hosszú, úgynevezett seed régió határozza meg, bár a legfrissebb kutatások szerint a miRNS 3' végének is fontos szerepe van a célgénhez való kötődésben. Egy célgént több miRNS is szabályozhat, és egy miRNS-nek rengeteg célpontja lehet, így ezek a kis szabályozó molekulák egész jelátviteli útvonalak működésére hatással vannak (Chipman és Pasquinelli, 2019).

Számos daganattípussal kapcsolatban írtak már le az egészséges szövethez képest megváltozott miRNS mintázatot, és vizsgálták, hogy ennek szerepe lehet-e a daganat kialakulásában (Calin és mtsai 2002; Farazi és mtsai 2013). A miRNS-ek elengedhetetlenül fontosak a normális hypophysis fejlődés során (Schneeberger és mtsai 2012; Zhang és mtsai 2010) is, és már hypophysis adenomákban is több miRNS megváltozott expresszióját azonosították (Bottoni és mtsai 2007a; Butz és mtsai 2011a, 2010; Cheunsuchon és mtsai 2011; D'Angelo és mtsai 2012; Liang és mtsai 2013; Mao és mtsai 2010a; Zatelli és Uberti 2008), amelyeknek feltehetően szerepe van a patogenezisben is (Gadelha és mtsai 2013; Németh és mtsai 2018b; Zhang és Xu 2016).

A miRBase miRNS adatbázis alapján jelenleg közel 2000 humán miRNS gént ismerünk (miRBase v22, frissítve: 2018. március) (Griffiths-Jones, 2004). Az újgenerációs szekvenálások fejlődésével nemcsak az új miRNS-ek azonosítása gyorsult fel, hanem lehetővé vált egy adott miRNS szekvencia variánsainak, az úgynevezett isomiR-ek azonosítása is (Lee és mtsai 2010). Ez alapvetően hosszbeli eltérés a 3' vagy 5' végen (3p

isomiR, 5p isomiR) vagy nukleotidcsere (SNP isomiR), illetve ezek kombinációi (Neilsen és mtsai 2012). Általánosságban elmondható, hogy a 3p isomiR-ek gyakoribbak, mint az 5p isomiR-ek, amely feltehetően az 5' végen elhelyezkedő seed szekvencia fontosságának köszönhető. Az újabb kutatások alapján egyre inkább úgy tűnik, hogy az isomiR-ek nemcsak a biogenezis során végbemenő enzimatikus hasítások tökéletlenségének szükségtelen melléktermékei, hanem funkcionális jelentőséggel bírnak (Tan és mtsai 2014; Tan és Dibb 2015; Wyman és mtsai 2011).

I.2.5. Jelátviteli útvonalak

A hypophysis adenomákban számos onkogén és tumorszuppresszor gén megváltozott expresszióját azonosították, melyek esetében felmerül a kérdés, hogy ezek a daganat kialakulásának okai vagy következményei lehetnek.

A hypophysis adenomák mintegy 90%-ában kimutatható a más tumorokban is gyakori *PTTG* (pituitary tumor transforming gene) onkogén fokozott kifejeződése (Salehi és mtsai 2008; Zhan és Desiderio 2010). Szintén emelkedett expressziót mutat egy másik onkogén, az *FGF2* (fibroblaszt növekedési faktor 2), és mindkét gén expressziója pozitívan korrelál a tumor invazivitásával (Ezzat és mtsai 1995; Zhan és Desiderio 2010). Eközben olyan tumorszuppresszor gének csökkent kifejeződését is azonosították, mint a *GADD45 γ* , az *AIP* és a *KISS1* (Jiang és Zhang 2013; Martínez-Fuentes és mtsai 2011; Zhang és mtsai 2002).

A génexpressziót befolyásoló módosulások révén azonban nemcsak egy-egy gén kifejeződése változik meg, hanem azok downstream molekulái révén egész jelátviteli útvonalak is módosulhatnak. Ezek vizsgálata pontosabb képet adhat arról, hogy milyen folyamatok vezetnek a daganatok kialakulásához és progressziójához.

A már korábban említett, gyakran előforduló *GNAS1* gén mutációja aktiválja például az adenilát cikláz jelátviteli útvonalat (cAMP szint emelkedést okoz), amely fokozza növekedési hormon termelést. Leírtak olyan esetet is, ahol az agresszív prolaktin termelő daganat – feltehetően a *GNAS1* mutáció hatására – GH termelő daganattá alakult (Lania és mtsai 2010).

A hypophysis adenomákban megváltozott jelátviteli útvonalak *in silico* elemzése során kimutatták, hogy a megváltozott mitochondriális működés, az oxidatív stressz, a sejtciklus szabályozás és a MAPK (mitogén aktivált protein kináz) jelátvitel abnormalitásai összefüggésbe hozhatók a hypophysis adenomák patogenezisével (Zhan és Desiderio, 2010).

Ezen felül a MAPK kaszkád és a PI3K/Akt/mTor jelátviteli útvonalak aktiválódását is megfigyelték (Monsalves és mtsai 2014).

Az Akt a PI3K (foszfatidil inozitol 3 kináz) hatására aktiválódik, melynek révén egy sor fehérje foszforilálódik, ezáltal olyan mechanizmusokat indítva be, amelyek során a proapoptotikus folyamatok gátlódnak, az antiapoptotikus folyamatok pedig felerősödnek. Az útvonal révén aktiválódó mTor (mammalian target of rapamycin) olyan molekulákon keresztül fokozza a sejtprolifерációt és a növekedést, mint a ciklin D, a myc és a VEGF (vaszkuláris endotheliális növekedési faktor), így másodlagosan a sejtciklus működésében való eltéréseket is észlelhetünk (Monsalves és mtsai 2014).

Az Akt ezen felül a downstream molekulái, például a GSK β révén kapcsolatban áll a Wnt/ β -katenin jelátviteli útvonallal is, amelyet már a hypophysis adenomák patogenezisével is kapcsolatba hoztak (Elston és mtsai 2008).

Az agresszív daganattípusok esetében gyakori a *Ras* mutáció, ami a gén fokozott expresszióját eredményezi. A *Ras* mutációk hypophysis adenomákban nagyon ritkán kimutathatók, viszont más mechanizmusok révén létrejött emelkedett *Ras* expresszió előfordul, amely feltehetőleg a Raf/MEK/ERK jelátvitel felerősödött aktiválódásának köszönhető, ugyanis ezen útvonal több molekulájának fokozott kifejeződése is megfigyelhető (Suojun és mtsai 2012; Zhan és Desiderio 2010). A Raf a MEK (MAPKK, MAP kináz kináz) aktiválásán keresztül foszforilálja az ERK (MAPK) fehérjét, amely így a sejtmagba jut és ott transzkripciós faktorok aktiválása révén serkenti a sejtek növekedését. Az útvonal felerősödése növeli a ciklin D expresszióját, így hatással van a sejtciklus működésére, valamint kölcsönhatásban van a PI3K jelátviteli útvonallal is.

Egyre több kutatási eredmény mutat arra, hogy az embrionális fejlődésben nagyon fontos szerepet játszó két útvonal, a Wnt és a Notch jelátvitel is felerősödik a hypophysis adenomákban (Moreno és mtsai 2005; Neto és mtsai 2005).

Ezeket felül több tanulmányban is vizsgálták a TGF β (tumor növekedési faktor β) útvonal csökkent aktivitását hypophysis adenomákban, amelyért egyrészt upstream mechanizmusokat, mint a Raf/MEK/ERK és PI3K útvonalakat (Petiti és mtsai 2015), másrészt poszttranszkripcionális miRNS regulátorokat tesznek felelőssé (Butz és mtsai 2011a).

Jól látható tehát, hogy az említett jelátviteli útvonalak egymással szoros összefüggésben, együttesen hatnak, és bár a különböző útvonalak molekulái nehezen szétválaszthatók egymástól, az apoptózis és a sejtciklus folyamatának kifejezetten fontos szerepe lehet a patogenezisben, ezért ezeket külön alponthoz is tárgyalom.

I.2.6. Apoptózis útvonal

Az apoptózis, vagyis a programozott sejthalál az a folyamat, melynek révén a sejtek szigorúan szabályozott módon bomlanak le megőrizve ezzel a szervezet épségét.

Két fő útvonala különíthető el: a belső (intrinsic) vagy mitokondriális és a külső (extrinsic) útvonal. Különböző módon ugyan, de mindkét útvonal végeredménye, hogy a kromatin kondenzálódik, a DNS degradálódik, a sejtről először kisebb részek fűződnek le, majd végül teljesen szétesik, és anyagainak a környező sejtek veszik fel. A folyamatot a nekrozissal ellentétben nem kíséri gyulladás. Az apoptózisnak fontos szerepe van a szöveti homeosztázis fenntartásában és a szervfejlődésben, beleértve a hypophysis fejlődését is (Saraga-Babic és mtsai 2008). Éppen ezért, ha a folyamat szabályozása felborul, annak komoly patológiás következményei lehetnek, mint a fejlődési rendellenességek, autoimmun és neurodegeneratív betegségek, vagy daganatok kialakulása (Guzzo és mtsai 2014).

A külső útvonalban alapvetően a halálreceptorok, az ezekhez kötődő adapterek és a kaszpáz kaszkád aktiválódása, míg a belső útvonalban a *Bcl-2* géncsalád tagjai, és a citokróm c mitochondriumból való felszabadulása játszanak fontos szerepet.

A külső útvonal egy ligandum (TNF, FasL, TRAIL) halálreceptorhoz (TNFR, Fas, DR4, DR5) való kötődésével aktiválódik, majd az ezekhez kötődő adapterek, és a kaszpáz kaszkád aktiválódása révén folytatódik a folyamat. A kaszpázok az apoptózis fő mediátorai. Funkciójuk alapján elkülönítünk iniciátor és effektor kaszpázokat. Míg az iniciátor kaszpázokat a proapoptotikus szignálok, az effektor kaszpázokat az iniciátor kaszpázok aktiválják. Az apoptózis során végbemenő morfológiai változásokért elsősorban az effektor kaszpázok felelősek (Budihardjo és mtsai 1999).

A mitochondriális útvonalat olyan intra-, vagy extracelluláris szignálok aktiválhatják, mint a DNS károsodás, a hipoxia, vagy az oxidatív stressz (Jin és El-Deiry, 2005). Az útvonal aktiválódása tulajdonképpen a proapoptotikus és antiapoptotikus szignálok proapoptotikus irányba való eltolódásának eredménye. Fontos szerepe van a *Bcl-2* géncsaládnak, melynek antiapoptotikus tagjai a *Bcl-2*, a *Bcl-xL*, a *Bcl-w*, a *Bfl-1*, a *Brag-1*, az *Mcl-1* és az *A1*, proapoptotikus tagjai pedig a *Bax*, a *Bad*, a *Bak*, a *Bcl-xS*, a *Bid*, a *Bik* és a *Hrk*. A *Bcl-2* géncsalád tagjai által termelt fehérjék felelősek a mitochondrium membránjának épségéért, illetve permeabilitásának megváltozásáért. Csatornákat és lyukakat formálva citokróm c felszabadulást okozhatnak, ezzel serkentve az apoptózist (Papadimitriou 2000). A külső és belső útvonal a kaszpáz-3 effektor kaszpáz aktiválása révén kapcsolódik össze.

Egyes elképzelések szerint a hypophysis adenomák patogenezise során az apoptózis folyamata gátlódik, azaz a sérült, vagy megváltozott működésű sejtek eltávolítása gátlódik, ezért a mitózis-apoptózis egyensúly a mitózis javára tolódik el, és a megváltozott működésű, hibás sejtek felszaporodhatnak (Chen és mtsai 2008).

Kevés tanulmány foglalkozik az apoptózis vizsgálatával hypophysis adenomákban, és ezek eredményei néhány szempontból ellentmondásosak, ezért megoszlanak a vélemények arról, hogy az apoptózis mérése alkalmas-e az adenomák viselkedésének előrejelzésére.

Egyes tanulmányok megállapították, hogy a nem-funkcionáló adenomákban alacsonyabb az apoptotikus index, mint a hormonálisan aktívokban, ahogy a makroadenomákban a mikroadenomákhoz képest is, valamint hogy ez összefüggést mutat a *Bcl-2* és a *Bax* fehérje expressziókkal (Sambaziotis és mtsai 2003). Más tanulmányok szerint viszont

éppen a GH termelő adenomákban alacsonyabb az apoptotikus index a nem-funkcionálókhoz képest (Green és mtsai 1997). A magas apoptotikus aktivitás az agresszivitás jó prognosztikai markere lehet (Kontogeorgos, 2006), mivel kimutatták, hogy az agresszívabb, gyógyszer-rezisztensebb adenomákban az apoptózis erősebb, valamint hogy a *Bcl-2* antiapoptotikus gén alacsonyabb expressziót mutat a hypophysis carcinomákban az adenomákhoz és a nem tumoros mintákhoz képest (Kulig és mtsai 1999; Sambaziotis és mtsai 2003). Más vizsgálatokban azonban azt tapasztalták, hogy az apoptotikus aktivitás alapján nem becsülhető meg előre a tumor növekedése (Ibrahim és mtsai 2004), vagy a kiújulás valószínűsége (Nakabayashi és mtsai 2001).

I.2.7. A sejtciklus

A sejtciklus az a folyamat, melynek során az eukarióta sejtek megkétszerezik DNS állományukat, majd két genetikailag egyező utódsejtté osztódnak. A DNS megkettőződés az S (szintézis) fázisban történik. Ez előtt és után is egy-egy növekedési fázis van (G1 és G2 fázis), ezt a három fázist együttesen interfázisnak nevezzük. A G2 után az M (mitózis) fázis következik, melynek végén létrejön a két leánysejt.

A hypophysis adenomák patogenezisében fontos szerepe lehet a sejtciklust szabályozó molekulák megváltozott működésének, mint például a ciklinek, a ciklin függő kinázok (CDK) és a CDK inhibitorok megváltozott expressziójának. Ezek háttérben gyakran állnak a már említett epigenetikai tényezők, mint a DNS metiláció és a miRNS szabályozás (Robertson és Heaney 2016).

Kimutatták például, hogy a miR-15a és a miR-16-1 a ciklin D gátlása révén befolyásolja a G1/S átmenetet (Bottoni és mtsai 2005). Munkacsoportunkban végzett korábbi vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a nem-funkcionáló hypophysis adenomákban megváltozik a G2/M átmenet génjeinek expressziója, melyben a *WEE1* és a *CDC25* gének szabályozása révén a miRNS-ek is fontos szerepet játszanak (Butz és mtsai 2017, 2010). A HMGA fehérjékről, melyek fokozott expressziója egér modellben hypophysis adenoma kialakulásához vezet, szintén kimutatták, hogy miRNS szabályozás alatt állhatnak (Fedele és mtsai 2005, 2002; Jiang és Zhang 2013). Mindemellett más tanulmányok is megerősítették, hogy a hypophysis adenomákban a miRNS-ek deregulációja és a sejtciklus felborulása között szoros kapcsolat van (T. Zhang és mtsai 2017).

A CDK inhibitorok csökkent expressziójának következménye többek között a ciklin D-CDK4/6 komplex és a ciklin E-CDK2 komplex túlzott aktivációja, ami a retinoblasztóma fehérje foszforiláció általi inaktiválásához vezet, amely így nem köti az E2F transzkripciós faktort, ennek következményeként pedig a sejtproliferáció felerősödik a hypophysis adenomákban (Robertson és Heaney 2016). Megfigyelték azt is, hogy a p18 CDK inhibitor csökkent kifejeződése hypophysis adenomákban összefüggést mutat a gigantizmus kialakulásával (Hossain és mtsai 2009), míg a p27 expressziójának visszaesése korrelál a ciklin E kifejeződés növekedésével, valamint egérmódelben a p27 inaktiválása hypophysis tumor kialakulásához vezet (Lee és mtsai 2002; Sapochnik és mtsai 2016).

A HMGA fehérjéknek a sejtciklus szabályozása mellett szerepük van a sejtosztódásban, a TP53 molekulán keresztül részt vesznek a DNS hibajavításban, és az apoptózisban, a SMAD fehérjéken keresztül pedig a TGF β jelátvitelben is. Mindezek alátámasztják, hogy a hypophysis adenomákban azonosított molekuláris eltérések szoros összefüggésben állnak egymással, vizsgálatuk komplex, rendszer szemléletű megközelítést igényel annak megértésére, hogy ezen változások, és egymásra való hatásuk hogyan vesz részt a daganatok kialakulásában és progressziójában.

I.3. Biomarkerek

I.3.1. A hypophysis adenomák diagnózisa

A klinikai tüneteket okozó funkcionális hypophysis adenomák esetében a diagnózis a klinikai kórkép és a vérből mért hormonszintek alapján állítható fel. Enyhe klinikai tünetek esetén azonban gyakran még ez is évekig eltarthat. Ennél jóval nehezebb a nem-funkcionáló adenomák diagnózisa, melyek klinikai tüneteket nem okoznak, jelenlétükre gyakran más okból végzett képalkotó eljárások során derül fény (incidentalómák), vagy akkor, amikor a tumor eléri a látóideg kereszteződést (chiasma opticum) ezáltal látásromlást, látótér kiesést, vagy akár vakságot is okozhat (Molitch 2017).

Más daganatos megbetegedésekhez hasonlóan a hypophysis adenomák esetében is esszenciális, hogy a tumor minél korábbi fázisban felfedezésre kerüljön, hiszen a kisebb méretű, a környező szöveteket még nem infiltráló daganat sebészi eltávolítása sokkal

hatékonyabb. A nem-funkcionáló adenomák esetében éppen ezért, a gyakran késői diagnózisnak köszönhetően, alacsonyabb a műtét utáni teljes gyógyulás valószínűsége, a kiújulás gyakorisága magas, amely előre nem is prediktálható (Roelfsema és mtsai 2012). Ezekben lehetnek segítségünkre az elmúlt években hatalmas figyelmet kapó biológiai markerek (biomarkerek).

I.3.2. Hypophysis adenoma biomarkerek

A biomarkerek a fiziológiás és patológias folyamatok, valamint a terápiára adott válasz követésére alkalmas, objektíven mérhető molekulák (Biomarkers Definitions Working Group 2001). Az elmúlt évek kutatásai során nagyon nagy szerepet kaptak a tumorbiológiában, mivel gyakran nemcsak a korai diagnózist (diagnosztikus biomarkerek), hanem a daganatok osztályozását (prognosztikus biomarkerek) is lehetővé teszik. Segítségükkel megbecsülhető az esetleges terápiás válasz (prediktív biomarkerek), így előremozdíthatják a személyre szabott terápia kialakítását. Ezen felül alkalmasak lehetnek a kezelésre adott válasz monitorozásában is (farmakodinamiás biomarkerek).

A diagnosztikus biomarkerek jellemzői a fajlagosság (specifitás), amely a negatív teszteredményű páciensek között a valóban negatívok aránya, és az érzékenység (szenzitivitás), amely a valóban pozitív esetek aránya a pozitív eredményűek között. A két érték közötti kapcsolatot grafikusán a ROC (receiver operating characteristic) görbével jeleníthetjük meg (Kulasingam és Diamandis 2008).

Az első daganat-specifikus biomarkert már 1847-ben azonosították (Jones 1847), ám igazi áttörést a XX. században megjelenő nagy áteresztőképességű vizsgálómódszerek hoztak. Az újgenerációs szekvenálási technikák megjelenése és gyors fejlődése révén több száz, vagy akár több ezer potenciális marker egyidejű vizsgálata vált lehetővé.

A hypophysis adenomákban a szövettani vizsgálat során immunhisztokémiai festéssel azonosítják a hypophysis elülső lebenyének hormonjait. Emellett a WHO 2017-es klasszifikációs rendszere kiegészítésként transzkripciós faktorok immunhisztokémiai vizsgálatát is javasolja (részletesen lsd. **I.1. fejezet**) (Mete és Lopes 2017).

Ezek mellett az eltávolított daganatokból szintén immunhisztokémiai módszerrel mindig meghatározásra kerül a Ki-67 proliferációs index. Sok tanulmány szerint, ha ez >3%, az

a tumor agresszív viselkedésére utal, és a daganat könnyebb kiújulását is jelezheti. A Ki-67 index önmagában való alkalmazása viszont az ellentétes eredmények miatt vitatott (Salehi és mtsai 2009). Ez elsősorban annak köszönhetőek, hogy a különböző vizsgálatok az „agresszív” és „invazív” adenomákra eltérő definíciókat alkalmaznak, emiatt nagy szükség lenne a vizsgálati módszerek és definíciók standardizálására (Sav és mtsai 2012).

Az új, 2017-es WHO klasszifikáció éppen a reprodukálhatóság hiánya és az egyértelműsítés érdekében eltörölte az „atípusos adenoma” kifejezést, amelyet a >3% Ki-67 indexű és fokozott mitotikus aktivitású adenomákra használtak. Ezek az markerek az agresszív viselkedést prediktálhatják, viszont a meglévő kutatások eredményei nem konzisztensek. A markerek vizsgálatát ennek ellenére továbbra is javasolják, és fontosnak tartják. Megállapítják, hogy használható a kiújulás valószínűségének prediktálására, különösen akkor, ha a tumor eltávolítása nem volt teljes. Megjegyzik azonban azt is, hogy nincs egy általános cut-off érték, bár a szakirodalomban a 3%-os értékküszöb terjedt el. Az agresszív adenomák elkülönítéséhez érdemes figyelembe venni a preoperatív MRI és/vagy a műtét közben a sebész által azonosított klinikai paramétereket is, mint az invazivitás (a környező szövetekbe való terjedés) (Mete és Lopes 2017).

Az „agresszív adenoma” kifejezés még mindig nem teljesen egyértelmű, de általában a gyors növekedésű, nagy és szabálytalan körvonalú, a környező szövetekbe terjedő adenomákra utal, amely a hagyományos kezeléseknél ellenáll. Ugyanakkor fontos figyelembe venni az adenoma szövettani típusát is, mert ezek között nagy különbség van. Például a sparse granulated somatotrop adenoma, férfiakban a lactotrop adenoma, a Crooke sejtes adenoma, a silent corticotrop adenoma, és a plurihormonális Pit-1-pozitív adenoma nagyobb valószínűséggel lesz agresszív viselkedésű (Mete és Lopes 2017).

Összességében elmondható, hogy a Ki-67 proliferációs index vizsgálata fontos, ám önmagában nem elégséges. Nagyon fontos lenne a definíciók és a vizsgálati módszerek standardizálására, amely segíthetne feloldani a különböző tanulmányok eredményei között fellépő ellentmondásokat. Nagy szükség van továbbá új, kiegészítő markerek azonosítására, amelyek segítségével pontosabban becsülhető a daganatok várható viselkedése (Sav és mtsai 2012; Wierinckx és mtsai 2007).

A nagy áteresztőképességű technikák fejlődésével egyre több olyan tanulmány született, amelyben eltérő génexpressziós mintázatot azonosítottak a különböző adenoma típusok között, így felvetődött ezek biomarkerként való használhatósága is. Ezek között sok olyan gén van, amely az apoptózisban vagy a sejtciklusban játszik szerepet, így a fenti folyamatok predikciós értéke is felmerül.

Az apoptózist tárgyaló alfejezetben már részleteztem a folyamat biomarkerként való alkalmazhatóságának ellentmondásait (ld. **I.2.6. fejezet**). Hasonló a helyzet a p53 expressziójának emelkedésével is. Több kutatás is kimutatta, hogy a fehérje kifejeződése korrelációt mutat a hypophysis tumorok kedvezőtlen viselkedésével (Hentschel és mtsai 2003; Kontogeorgos és mtsai 1999; Ozer és mtsai 2003; Thapar és mtsai 1996). Ezzel szemben más tanulmányokban nem találtak összefüggést a p53 kifejeződés és a tumorméret, invazivitás, valamint a kiújulási valószínűség között (Scheithauer és mtsai 2006; Suliman és mtsai 2001). A fenti ellentmondások tisztázása további vizsgálatokat igényel.

A p27 egy CDK inhibitor, amelynek a sejtciklus szabályozásában játszik szerepet. Korábbi tanulmányokban a p27 csökkent expresszióját azonosították a hypophysis tumorokban a normális/ép hypophysis szövethez képest. Megállapították azt is, hogy a p27 kifejeződése negatívan korrelál a Ki-67 proliferációs index szintjével, ami felvetette a két marker együttes használatának lehetőségét (Lloyd és mtsai 1999, 1997).

A p27 kifejeződése alacsonyabb volt carcinomákban az invazív adenomákhoz képest (Scheithauer és mtsai 2006), és a recidív adenomákban a nem-recidívákhoz képest (Nakabayashi és mtsai 2001). Feltételezhető, hogy a p27 csökkent expressziója poszttranszlációs modifikációknak köszönhető, mint a foszforiláció, vagy a felerősödött degradáció. Az viszont nem tisztázott, hogy ez az expresszió csökkenés a tumorigenezis során elsődleges vagy csak másodlagos folyamat (Korbonits és mtsai 2002).

Az utóbbi évek kutatásai során kerültek előtérbe a miRNS-ek, mint fontos biomarkerek. Elsőként 2002-ben azonosítottak megváltozott miRNS expressziós mintázatot rákos megbetegedéssel kapcsolatban (Calin és mtsai 2002). Azóta számtalan tanulmány jelent meg a legkülönbözőbb daganatok vizsgálatáról, és nagyon sok miRNS megváltozott expresszióját és patogenezisben betöltött lehetséges szerepét is leírták.

Nagy áttörést jelentett, amikor kiderült, hogy a miRNS-ek nagyon stabilak a biológiai folyadékokban, így szintjük kiválóan mérhető vérben (szérum, plazma) és más testfolyadékokban (például vizeletben, nyálban, anyatejben), illetve ezek korrelálhatnak a betegség klinikai paramétereivel is. Ezáltal olyan nem-invazív biomarkereket azonosíthatunk, amelyek segítségével a diagnózis felállítása mellett a betegség lefolyása és akár a kezelés monitorozása is leegyszerűsödhet. Bár az utóbbi években ez a kutatási terület hihetetlen fejlődésnek indult, és rengeteg új publikáció jelenik meg, ezek klinikai alkalmazásához hosszú út vezet, melynek fontos lépése a preanalitikai módszerek standardizálása (Lan és mtsai 2015; Weber és mtsai 2010).

I.3.3. Keringő mikroRNS biomarkerek

A keringő extracelluláris miRNS-ek stabilitásuknak köszönhetően kiváló biomarkerként szolgálhatnak, így fontos diagnosztikus és prognosztikus szerepük lehet a különböző betegségekben (Mitchell és mtsai 2008). Mivel a daganatoknál esszenciálisan fontos a korai diagnózis, a keringő miRNS-ek, mint minimálisan invazív biomarkerek hamar a tumorbiológia érdeklődési körébe kerültek (Silva és mtsai 2011).

Egyre több tanulmány foglalkozik az endokrin daganatok klinikai megjelenésével összefüggést mutató, plazmában vagy szérumban detektálható miRNS szinttel (Decmann és mtsai 2017; Igaz és mtsai 2015; Nagy és mtsai 2018; Perge és mtsai 2017), azonban a keringő miRNS-ek előfordulását hypophysis adenomákkal kapcsolatban eddig még nem vizsgálták.

A miRNS-ek a keringésben alapvetően három formában: fehérjéhez kötötten, lipoproteinekhez kötötten, vagy vezikulákba csomagolva fordulnak elő. Ezek közül az első a leggyakoribb, a másik két forma biológiai jelentősége viszont nagyobb. Vitatott álláspont ugyan, de egyre több közlemény jelenik meg arról, hogy a keringő miRNS-ek hormonszerű aktivitással rendelkeznek és a keringés útján más sejtekhez eljutva azokban hatást fejthetnek ki (részvétel a sejt-sejt kommunikációban, vagy az endogén miRNS-hez hasonló szerep) (Aucher és mtsai 2013; Camussi és mtsai 2010; Iguchi és mtsai 2010; Muralidharan-Chari és mtsai 2010; Vickers és mtsai 2011).

A miRNS-ek aktív szekréciónal, illetve a sejtek – például apoptózis révén való – szétesésével is a keringési rendszerbe juthatnak (Turchinovich és mtsai 2011), így gyakran nagyon nehéz megmondani, hogy egy adott keringő miRNS a tumorsejtekből került-e a keringésbe. Vannak olyan vizsgálatok, amelyben a tumor-asszociált miRNS-ek emelkedett szintjét tudták kimutatni a keringésben (Lawrie és mtsai 2008). Amennyiben azonban a miRNS szintjének emelkedése vagy csökkenése a tumorról összefüggésben következetesen kimutatható, akkor a miRNS – eredetétől függetlenül – jól alkalmazható biomarkerként.

I.4. Terápiás lehetőségek hypophysis adenomákban

A hypophysis adenomák közül a prolaktin termelő daganatok esetében az elsődleges terápia a gyógyszeres kezelés, amely általában dopamin agonisták adását jelenti (például bromocriptin vagy cabergoline). Ezzel a vér prolaktin szintje normalizálható és a tumor mérete is csökkenthető, amely gyakran még akkor is hatásos, ha a tumor már nagyméretű és elérte a chiasma opticumot. Ilyenkor a kialakult látásromlás a tumor méretének csökkenésével helyreállhat. Amennyiben az alkalmazott dopamin agonista nem érné el a kívánt hatást, lehetőség van egyéb szereket (például pasireotid) is kipróbálni, illetve a megszokott dózist növelni. Amennyiben ez sem lenne hatásos, akkor a műtéti eltávolítás, illetve a sugárkezelés jelenthet megoldást (Gillam és mtsai 2006; Oh és Aghi 2011).

Az összes többi adenoma típusnál az elsődleges terápiás lehetőség a daganat műtéti eltávolítása. A tumor teljes rezekciója azonban gyakran nehézkes, különösen a nagy méretű, és a környező szövetekbe terjedő daganatok esetében (Molitch 2017).

A GH és ACTH termelő daganatoknál gyakran másodlagos terápiaként alkalmazzák a gyógyszeres kezelést, amely előbbieket esetében főként szomatosztatin analógokat jelent, míg az utóbbiaknál ezen felül általában dopamin agonisták és glükokortikoid hatást gátló szerek jönnek szóba. Nagy méretű, GH termelő adenomák esetén lehetőség van preoperatív szomatosztatin analóg előkezelésre, hogy így csökkentsék a tumor méretét, ezzel esetlegesen javítva az operáció kimenetelét.

A sugárterápia hypophysis adenomák esetében csak alternatív megoldás azokra az esetekre, amikor a tumort nem sikerült teljes mértékben eltávolítani, és nincs lehetőség, vagy a beteg elutasítja a reziduom eltávolítását. Aggresszív hypophysis adenomák

esetében, amikor a beteg már több műtéten és sugárkezelésen is átesett, végső megoldásként a temozolomide kemoterápiás kezelés jöhet szóba (Colao és mtsai 2011; Di Ieva és mtsai 2014b).

Az új diagnosztikai módszerek és terápiás lehetőségek kidolgozása érdekében elsődleges fontosságú, hogy megértsük azokat a molekuláris mechanizmusokat, amelyek részt vesznek az adenomák kialakulásában és növekedésében.

I.4.1. A TRAIL indukált apoptózis mint terápiás lehetőség

Mivel a rákos sejtek kialakulásának lényeges momentuma az apoptózis folyamatának károsodása, a tumorterápiák egyik fontos ágazata az apoptózis indukálása (Johnstone és mtsai 2002).

A TRAIL (TNF-szerű apoptózis indukáló ligand) a TNF (tumor nekrosis faktor) szupercsaládba tartozó, az apoptózis indukációjában fontos szerepet játszó molekula. Receptoraihoz, a DR4-hez (halálreceptor 4) és a DR5-höz (halálreceptor 5) kötődve indítja be az apoptózis extrinsic útját (részletesen lsd. **I.2.6. fejezet**). A TRAIL kezelés akkor került igazán a terápiás kutatások fókuszpontjába, amikor kiderült, hogy segítségével *in vitro* és *in vivo* is indukálható az apoptózis méghozzá úgy, hogy közben az egészséges sejtekre nincs hatással (Pitti és mtsai 1996; Wiley és mtsai 1995). Azóta számos daganatsejtben igazolták a rekombináns humán TRAIL (rhTRAIL) kezelés apoptózis-indukáló hatását (Ashkenazi és mtsai 1999; Walczak és mtsai 1999).

Megjegyzendő azonban, hogy nem minden esetben indukálható apoptózis: több sejttípusról is leírták, hogy rezisztens a TRAIL kezelésre (Ashkenazi és mtsai 1999). A kezelés proapoptotikus hatása túlélési választ válthat ki, és válaszként olyan molekulák és jelátviteli útvonalak aktiválódhatnak, melyek segítik a túlélést, például az NF-KB, a MAPK, vagy az Akt. Ekkor a pro- és antiapoptotikus folyamatok „versenyeznek”, és a sejtek túlélnek vagy apoptótizálódnak (Falschlehner és mtsai 2007).

Egy tanulmányban a vizsgált 39 tumoros sejtvonalból (vastagbél, tüdő, vese, agy és bőr) 32 esetén volt hatásos TRAIL kezelés, tehát a sejtvonalak közel 20%-a mutatott rezisztenciát. *In vivo* xenograft esetén a TRAIL injekció a sejtek bejuttatása után nem sokkal csökkentette a tumor kialakulásának valószínűségét, már meglévő tumoroknál

pedig gátolta a tumor növekedését, apoptózist indukált, és növelte a túlélést (Ashkenazi és mtsai 1999). Kemoterápiás kezeléssel együtt adva jelentősen növelte annak hatékonyságát (Ashkenazi és mtsai 1999; Ganten és mtsai 2006). Vannak arra vonatkozó további kutatások is, hogy a TRAIL sugárkezeléssel vagy más terápiás szerekkel kombinálva hatékonyabb (Hellwig és Rehm, 2012). Nem-humán főemlősökben pedig kimutatták, hogy intravénásan az ismételten adott TRAIL nem okozott toxicitást a vizsgált szervekben és szövetekben (Ashkenazi és mtsai 1999).

Amellett, hogy egyes sejtek eleve rezisztensek a TRAIL-re, a kezelés hatására a nem rezisztens sejtek is ellenállóvá válhatnak, amely nagyban megnehezíti a klinikai alkalmazást (Dimberg és mtsai 2013). Emiatt az elmúlt években több tanulmányban foglalkoztak a TRAIL rezisztens sejtek kezelésre való érzékenyítésével. Ebből a célból különböző vegyületeket, molekula gátlókat, és miRNS-eket is kipróbáltak. Az eredmények alapján egyértelműen kiderült, hogy a különböző sejtekben különböző anyagok alkalmasak az érzékenyítésre, és hogy ezek molekuláris mechanizmusa is nagyon eltérő lehet (Lian és mtsai 2018; Lincoln és mtsai 2018; Rasheduzzaman és mtsai 2018; Todo és mtsai 2013; Wu és mtsai 2018; Xu és mtsai 2018). Fontos azonban figyelembe venni, hogy a kezelés ne hogy az egészséges sejteket is TRAIL-re érzékennyé tegye (Bagci-Onder és mtsai 2013; Bangert és mtsai 2012; Sayers és Murphy 2006).

Az érzékenyítő anyagok vizsgálatánál derült ki, hogy az acetyl-szalicilsav (ASA) is képes a TRAIL kezelésre érzékenyíteni például vastagbélrákos és HeLa sejteket (Heijink és mtsai 2011; Im és Jang 2012; Kim és mtsai 2005; Pennarun és mtsai 2013; Rana és mtsai 2012), többek között a Bcl-2 vagy a survivin gátlásán keresztül (Kim és mtsai 2005; Lu és mtsai 2008; Yoo és Lee 2007).

I.4.2. Az aszpirin daganatellenes hatása

Az aszpirin (acetyl-szalicilsav, ASA) egy világszerte elterjedt nem-szteroid gyulladáscsökkentő, amelyet több, mint száz éve alkalmaznak, elsősorban fájdalom- és lázcsillapító, valamint gyulladáscsökkentő hatása miatt. Ezen felül a kardiovaszkuláris betegségek megelőzésére is régóta használják. Alacsony dózisban (<100 mg) elsősorban trombocitagátló, közepes dózisban (325-600 mg) fájdalomcsillapító, míg magas dózisban (1200 mg) gyulladásgátló szerepét használják ki (Montinari és mtsai 2018).

Tumorelles hatását először vastagbélrák esetében írták le (Thun és mtsai 1991), azóta pedig több, mint húsz daganattípussal kapcsolatban vizsgálták, és számos esetben megfigyelték antiproliferatív, metasztázis gátló, illetve kemopreventív hatását. Epidemiológiai vizsgálatok igazolták, hogy a rendszeres aszpirin szedés többek között csökkenti a vastagbélrák, a mellrák, a prosztatatarák, a veserák, és a melanoma kialakulását (Chan és mtsai 2008; Gamba és mtsai 2013; Kaiser 2012; Ma és mtsai 2017; Rothwell és mtsai 2011; Sahasrabuddhe és mtsai 2012; Thun és mtsai 2012; Veitonmäki és mtsai 2013), valamint hogy vastagbélrák és mellrák esetében a diagnózis felállítása után csökkentette a mortalitást (Chan és mtsai 2009; Fraser és mtsai 2014). A fenti tanulmányok nagy része azonban retrospektív vizsgálat. Szükség lenne olyan prospektív tanulmányokra is, melyek alapján igazolható az aszpirin direkt daganatellenes hatása, valamint ennek mechanizmusa is vizsgálható. Ezek segíthetnének meghatározni a különböző esetekben optimális dózist és szedési időt (Ma és mtsai 2017).

Kimutatták azt is, hogy az aszpirin más kezelésekkel kombinálva erősítheti azok hatását (Hossain és mtsai 2012; Lu és mtsai 2008; Ou és mtsai 2010; Yan és mtsai 2013).

A „United States Preventive Services Task Force” 2016-os ajánlásában a kardiovaszkuláris betegségek mellett a vastagbélrák megelőzésére is javasolja a hosszú távú alacsony dózisú aszpirin szedést azon 50 év fölötti személyeknek, akiknek nem magas a vérzési rizikójuk (Bibbins-Domingo és U.S. Preventive Services Task Force, 2016).

Az aszpirin legfontosabb, elsősorban a hosszú távú szedés esetén kialakuló mellékhatásai a gasztrointesztinális vérzés kockázatának növekedése, az emelkedett húgysav szint, és a véralvadás gátlódása (Derry és Loke, 2000).

Jól ismert, hogy az ASA tromboticagátló és gyulladáscsökkentő hatását alapvetően a ciklooxygenáz (COX) enzimek gátlása révén fejti ki. Daganatellenes hatásának mechanizmusa azonban kevésbé tisztázott. A COX-1 és a COX-2 acetiláció általi gátlása csökkent proszttaglandin szintézishez vezet, de több esetben is kimutatták COX-független mechanizmusok jelentőségét is (Dovizio és mtsai 2013; Thun és mtsai 2012). Antiproliferatív hatását részben a sejtciklusban szerepet játszó ciklinek és ciklin dependens kinázok transzkripció szabályozásán, vagy a proteaszomális lebontásuk

serkentésén keresztül is kifejtheti. Hatással lehet továbbá az NF-KB, a MAPK, a WNT- β -catenin útvonalakra, és a c-myc expressziójára (Dachineni és mtsai 2016; Yan és mtsai 2013, 2010).

Az ASA egy másik, több sejttípusban ismert célmolekulája a survivin (Yang és mtsai 2011), amely az apoptózisban és a sejtciklusban is résztvevő molekula (részletesen lsd. **I.4.3. fejezet**). Kimutatták, hogy az ASA az E2F1 transzkripció faktorhoz való kötődésével megakadályozza annak bekötődését a survivin promóteréhez, ezáltal gátolja annak transzkripcióját. Több sejttípusban is megfigyelték, hogy a survivin gátlásának az ASA korábban tárgyalt TRAIL-érzékenyítő hatásában (lsd. **I.4.1. fejezet**) is szerepe lehet (Lu és mtsai 2008; Yoo és Lee 2007).

I.4.3. A survivin szerepe

A survivin az apoptózis inhibitor fehérjék (iAP) családjába tartozó kis molekula, amelynek mind az apoptózis, mind a sejtciklus szabályozásában fontos szerepe van. A felnőtt szövetekben általában alacsonyan, vagy egyáltalán nem fejeződik ki, emelkedett expresszióját viszont rengeteg tumorszövetben leírták (Waligórska-Stachura és mtsai 2012a). Több esetben is korrelációt fedeztek fel a tumor invazivitásával, kezelésre való rezisztenciájával és a kedvezőtlen túléléssel (Kong és mtsai 2017; Waligórska-Stachura és mtsai 2012b).

Általánosan elfogadott, hogy a survivin gátolja az apoptózist, ennek mechanizmusáról viszont – érdekes módon – ellentmondásosak az eredmények. Egyes vizsgálatok szerint az effektor kaspázokhoz (kaspáz-3, -7, -9) kötődik (Chandele és mtsai 2004; Tamm és mtsai 1998), ám ezt a fehérjeszerkezet elemzések nem támasztják alá (Riedl és mtsai 2001). Mások szerint közvetlenül a mitochondriális Smac/Diablo-hoz köt, és gátolja annak a mitochondrium membránból való felszabadulását, és ezáltal az apoptózist (Ceballos-Cancino és mtsai 2007; Song és mtsai 2003).

Emellett a survivin a sejtciklus szabályozásában is közrejátszik. Az Aurora kináz B (AURKB) és az INCENP (belső centromer protein) közreműködésével komplexet alkotnak (chromosome passenger complex, CPC), melynek a helyes kromoszóma

szegregációban van fontos szerepe a mitózis során, hiányában a sejtosztódás folyamata jelentősen sérül (Hagemann és mtsai 2013; Uren és mtsai 2000).

Mindezek alapján a survivin egy ígéretes terápiás célpont lehet a daganatterápiákban (Chen és mtsai 2016), és sok kutatás indult abból a célból, hogy kifejeződését különböző szerekekkel, például antiszensz oligonukleotidokkal vagy kis molekulákkal gátolják. Az egyik legígéretesebb ilyen szer az YM155 kis molekula inhibitor (részletesen lsd. **I.4.4. fejezet**) (Altieri 2013).

A survivin gátlására irányuló kísérletek kezdeti lelkesedésének gátat szab ezen szerek specificitásának kérdésessége. Kiderült, hogy a survivin nem kizárólag a daganatsejtekben, hanem az egészséges osztódó sejtekben, például a hematopoietikus őssejtekben és vaszkuláris endotheliális sejtekben, valamint stresszt követően a normális immunsejtekben is fokozottan expresszálódik (Conway és mtsai 2003; Fukuda és mtsai 2002). Mivel a survivin gátlása az apoptózis indukció mellett a sejtosztódást is gátolhatja, a fenti terápiák kidolgozása során fontos figyelembe venni az off-target hatás révén kialakuló esetleges mellékhatásokat.

A survivin fokozott kifejeződésének a kemo- és sugárterápiára való rezisztencia mellett szerepe lehet a TRAIL rezisztencia kialakulásában is. A korábban tárgyalt érzékenyítő kezelések során vizsgálták a survivin gátlását, mint hatékony TRAIL érzékenyítő kezelés, amely hatékonysága az eddigi eredmények alapján sejttípus-specifikusnak tűnik (Lu és mtsai 2008; Yoo és Lee 2007).

Ahogy már említésre került, az aszpirin egyes sejtekben képest gátolni a survivin kifejeződését, és ezáltal kifejtteni antiproliferatív vagy apoptózis indukáló hatását (Yang és mtsai 2011). Figyelembe véve, hogy az aszpirint más célokra régóta alkalmazzák, és mellékhatásai jól ismertek, ez különösen ígéretes terápiás lehetőségnek tűnik.

I.4.4. Az YM155 survivin inhibitor kis molekula

A survivint gátló kis molekulák közül a leginkább kutatott az imidazolium-alapú YM155 (Nakahara és mtsai 2007). A gátlás transzkripciós szinten valósul meg, az YM155 alapvetően megakadályozza az Sp1 transzkripciós faktor survivin promóterhez való kötődését, ezáltal gátolja a survivin transzkripcióját. Emellett felmerült, hogy a

folyamatban más transzkripciós faktorok (ILF3/NF110, p54/nrb) gátlása is közrejátszik (Rauch és mtsai 2014). Egyre több vizsgálat irányul arra is, hogy az YM155 daganatellenes hatását nem kizárólag a survivin gátlásának köszönheti (Rauch és mtsai 2014). Ennek egyik magyarázata, hogy az Sp1 gátlásának nemcsak a survivin expressziójára, hanem a sejtciklus más résztvevőire is hatása van, például gátolja a ciklin D és indukálja a p27 molekulákat, ezáltal egy általánosabb antiproliferatív hatása is lehet (Grinstein és mtsai 2002).

Ezen mechanizmusok felfedezése nem von le az YM155 klinikai vizsgálatokban is ígéretesnek tűnő daganatterápiás szerepéből (Clemens és mtsai 2015; Giaccone és mtsai 2009; Tolcher és mtsai 2008; Yamanaka és mtsai 2011), mindössze felhívja a figyelmet arra, hogy hatásmechanizmusának pontos tisztázása további vizsgálatokat kíván (Rauch és mtsai 2014).

I.5. A humán mitochondriális genom

I.5.1. Mitochondriális variánsok különböző daganatszövetekben

Az eukarióta szövetekben a sejtek átlagosan 100 mitochondriummal rendelkeznek, melyek mindegyike több (általában 2-10) kópiában tartalmazhatja a 16569 bázispár (bp) hosszú cirkuláris mitochondriális DNS-t (mtDNS). A mitochondriális genomban összesen 37 gén található, melyek közül 13 a légzési komplexek enzimjeit, 22 transzfer RNS-eket (tRNS), 2 pedig riboszomális RNS-eket (12S, 16S) kódol (Anderson és mtsai 1981).

A mitochondriumok az oxidatív foszforiláció révén biztosítják a sejtek energiájának nagy részét, valamint fontos szerepük van az apoptózisban, amelynek zavara a tumorképződés egyik kulcs momentuma. A mitochondriumban bekövetkező kóros elváltozások tehát – más betegségek mellett – daganatképződéshez is vezethetnek (Carew és Huang 2002; Fernandez-Vizarra és mtsai 2007).

Elsőként 1998-ban azonosítottak daganatos megbetegedéssel összefüggő mitochondriális variánsokat vastagbélrákban (Polyak és mtsai 1998). Azóta számos más tumorszövetben kimutattak eltéréseket a mtDNS szekvenciában (például mellrák, petefészekrák, gyomorrák, hasnyálmirigyrák, prosztatarrák, tüdőrák és veserák esetén) (Chatterjee és

mtsai 2006; Ye és mtsai 2014), és felvetették annak lehetőségét, hogy a variánsoknak szerepük van a tumor kialakulásában és progressziójában (Baysal és mtsai 2000; Vanharanta és mtsai 2004), de a pontos mechanizmus egyelőre nem ismert (Carew és Huang 2002; Máximo és mtsai 2009; Modica-Napolitano és Singh 2004).

A sejtenként több kópia miatt előfordulhat, hogy egy adott sejtben vagy szövetben vad típusú és variáns allél együttesen fordul elő, ezt a jelenséget heteroplazmiának nevezzük. A heteroplazmia aránya egy adott sejtben vagy szövetben a variáns allél gyakoriságát adja meg (Lightowers és mtsai 1997). Több vizsgálat is kimutatta, hogy egy variáns tumorigenezisben való részvételéhez nem kell, hogy a variáns jelenléte elérje a 100%-ot, heteroplazmiás formában is lehet hatása a daganatképződésre (Lewis és mtsai 2000; Park és mtsai 2009).

A mitochondriális DNS nem-kódoló, kontroll régiójában (16024-576 bp) van egy 545 bp hosszú szakasz (16024-16569), az úgynevezett D-loop régió, amelynek funkciója egyelőre nem teljesen tisztázott. Ennek ellenére több daganattípusban is összefüggést írtak le az itt elhelyezkedő variánsok és a daganatok klinikai megjelenése között (Miyazono és mtsai 2002; Sharma és mtsai 2005; Ye és mtsai 2010), amelyek jelentősége így egyelőre nehezebben értelmezhető, így a tumorigenezisben betöltött lehetséges szerepük feltárása is további vizsgálatokat igényel (Chatterjee és mtsai 2011).

A hypophysis daganatokat tekintve eddig csak oncocytomákban vizsgálták a mitochondriális genomot, erről is mindössze egy csoport számolt be két közleményben. *Gasparre* és munkacsoportja megállapította, hogy a hypophysis oncocytomákban gyakran fordulnak elő variánsok a Légzési Komplex I-ben, és ezek összefüggést mutatnak a daganat jóindulatúságával (Kurelac és mtsai 2013; Porcelli és mtsai 2010).

I.5.2. Újgenerációs szekvenálás alkalmazása a mitochondriális genom vizsgálatára

A teljes mitochondriális genom szekvenálására korábban a két legelterjedtebb vizsgálati módszer a direkt Sanger szekvenálás és a microarray alapú MitoChip volt. Az újgenerációs szekvenálások terjedésével egy olyan, nagy áteresztő képességű technika áll rendelkezésünkre, amely sok minta együttes szekvenálása révén nagyon gyors és

költséghatékony vizsgálatokat tesz lehetővé, valamint a korábbi módszerekkel ellentétben alacsony mértékű, akár 1-3%-os heteroplazmia detektálására is alkalmas (Guo és mtsai 2012; Ye és mtsai 2014). Ehhez alacsony hiba arány, és magas lefedettség szükséges. Értelemszerűen minél alacsonyabb arányú heteroplazmiát szeretnénk vizsgálni, annál nehezebb elkülöníteni a valós heteroplazmiát a szekvenálási hibától, ezért a heteroplazmia esetén 3%-os cut-off értéket szoktak alkalmazni (Guo és mtsai 2013; Kloss-Brandstätter és mtsai 2015).

II. CÉLKITŰZÉSEK

A hypophysis adenomák az intrakraniális tumorok 10-15%-át alkotva a gyakori daganattípusok közé tartoznak. Nagyrészt sporadikus megjelenésűek, viszont a más daganattípusokkal gyakran összefüggésbe hozott genetikai mutációkat (*TP53*, *RBI*, *HRAS*, *MYC*) ritkán hordozzák. Patogenezisük molekuláris mechanizmusáról keveset tudunk, így a prevenció és a terápiás lehetőségek egyaránt korlátozottak.

Doktori munkám során a sporadikus megjelenésű hypophysis adenomákat három szinten vizsgáltam. A mitochondriális genom vizsgálatával a daganatok kialakulásának és növekedési mechanizmusának egyik aspektusát elemeztem, keringő miRNS biomarkerek keresésével a korai diagnózist és a recidíva hajlam megállapítását kívántam elősegíteni, végül *in vitro* vizsgálatokkal egy terápiás lehetőség feltárásán dolgoztam.

Mindezek érdekében az alábbi célokat tűztem ki:

1. A hypophysis adenomák teljes mitochondriális genomját újgenerációs szekvenálással kívántam elemezni. Olyan variánsok után kutattam, melyek jelenléte segítséget nyújthat a hypophysis adenomák kialakulásának hátterében álló molekuláris mechanizmusok pontosabb megértésében.
2. Célul tűztem ki a hypophysis adenomában szenvedő betegek keringő miRNS profiljának vizsgálatát potenciális biomarkerek felkutatása céljából. Ezen belül célom volt:
 - a. összehasonlítani a hypophysis adenomás betegek plazmájában előforduló miRNS és isomiR szekvenciákat,
 - b. és összevetni a miRNS-ek változását különböző hypophysis daganattal operált betegek műtét előtti és műtét utáni vérplazma mintájában.
3. Célul tűztem ki potenciális terápiás célpontok felkutatását hypophysis szöveti génexpressziós adatok alapján. Ennek keretében:
 - a. az apoptózisban résztvevő survivin és TRAIL molekula expressziós és funkcionális vizsgálatát,

- b. a survivinen keresztül ható acetyl-szalicilsav (ASA) hypophysis adenoma sejtekre gyakorolt *in vitro* hatásának elemzését,
- c. valamint a survivin gátlás és ASA hatás további *in vivo* vizsgálatához xenograft modellállatot kívántam létrehozni az RC-4 B/C hypophysis adenoma sejtvonalból.

III. MÓDSZEREK

III.1. Betegminták

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

Munkám során összesen 102 hypophysis adenoma és 10 normális (ép) hypophysis szöveti mintát, valamint 45 betegtől származó 149 plazmamintát és kontrollként 2 egészséges önkéntes plazmamintáját használtam fel. A betegek klinikopatológiai adatait és a szövetek immunhisztokémiai vizsgálatának eredményét az **1. táblázat** mutatja.

A minták a betegek klinikai paraméterei, hormonleletei és az eltávolított szövet patológiai vizsgálata alapján kerültek csoportosításra. A rutin szövettani vizsgálat a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetben történt, ahol a hypophysis elülső lebeny hormon-expressziókat és a Ki-67 proliferációs indexet immunhisztokémiai módszerekkel vizsgálták.

Munkám kezdetén, a hypophysis adenoma minták csoportosítására még a WHO 2004-es javaslata volt érvényben (Al-Shraim és Asa 2005), és az új klasszifikációra vonatkozó irányelvek időközben, 2017-ben jelentek meg (Mete és Lopes 2017) (részletesen lsd. **I.1. fejezet**).

Ennek megfelelően, kezdeti vizsgálataink során a 2004-es klasszifikáció alapján elkülönítettük a nem-funkcionáló (NFPA) és a hormontermelő hypophysis adenomákat, melyek esetünkben GH termelő daganatok (GHPA) voltak. A későbbi vizsgálatainkban már az új klasszifikáció irányelveinek megfelelően, a csoportosítás alapjául a szövettani vizsgálat eredményét vettük, így elkülönítettünk GH termelő (GH+), FSH/LH+

(korábban: klinikailag nem-funkcionáló, gonadotrop), és hormon negatív (HN, korábban: klinikailag nem-funkcionáló, null sejtes) adenomákat. A HN adenomák esetében pedig elvégeztük az SF1, a T-pit és a Pit-1 transzkripciós faktorok expressziójának vizsgálatát is.

Kutatásunkat a Magyar Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága hagyta jóvá (0618/15).

A nukleinsavak épségének megőrzése érdekében a szövetminták eltávolítás után azonnal fixáló oldatba, RNAlaterbe (Thermo Fisher Scientific) kerültek. A plazmamintákat a vérvételt követő 3 órán belül centrifugálással szeparáltam (3000 g, 20 perc, 4 °C). Felhasználásig a szövet- és plazmamintákat is -70°C-on tároltam.

1. táblázat – A PhD munkám során felhasznált minták adatai – Külön jelöltem a három vizsgálatban (mtDNS: A mitochondriális DNS elemzése, survivin, TRAIL: A survivin és a TRAIL expressziójának vizsgálata, miRNS: Keringő miRNS biomarkerek keresése) felhasznált minták típusát. IHK: immunhisztokémia, GH: növekedési hormon, PRL: prolaktin, FSH: folliculus stimuláló hormon, LH: luteinizáló hormon, ACTH: adrenocorticotrop hormon, TSH: pajzsmirigy stimuláló hormon, HN: hormon negatív, GHPA: GH termelő hypophysis adenoma, NFPA: klinikailag nem-funkcionáló hypophysis adenoma, F: férfi, N: nő

Klinikai diagnózis	Nem	Kor	IHK pozitivitás (elülső lebeny hormonjai)	Tumorméret MR alapján (mm ³)	Ki-67 proliferációs index (%)	Vizsgálat és felhasznált minta		
						mtDNS	survivin, TRAIL	miRNS
GHPA	F	56	GH	1960	3		szövet	szövet
GHPA	N	43	GH	-	2	szövet	szövet	
GHPA	F	51	GH	-	1,5		szövet	
GHPA	N	37	GH	-	3		szövet	
GHPA	F	49	GH	-	< 1	szövet	szövet	
GHPA	F	38	GH	-	3		szövet	
GHPA	N	59	GH	11616	2		szövet	szövet
GHPA	N	69	GH, FSH, LH, TSH	-	< 1		szövet	
GHPA	F	32	GH, PRL	-	3-4	szövet		plazma, exoszóma
GHPA	N	49	GH, PRL	2652	3-4	szövet		plazma
GHPA	F	35	GH, PRL	-	6	szövet	szövet	plazma, exoszóma
GHPA	F	35	GH, PRL	-	4		szövet	
GHPA	N	22	GH, PRL	-	4-5	szövet	szövet	
GHPA	F	51	GH, PRL	NA	3-4			plazma
GHPA	F	51	GH, PRL	-	< 3	szövet		plazma
GHPA	N	48	GH, PRL	-	10	szövet	szövet	
GHPA	N	60	GH, PRL	-	< 3	szövet	szövet	plazma, exoszóma
GHPA	N	35	GH, PRL	-	5-6	szövet		
GHPA	F	30	GH, PRL	4840,495	8	szövet		plazma, exoszóma
GHPA	F	22	GH, PRL	11571	3	szövet	szövet	
GHPA	N	53	negatív	5355	0		szövet	

Klinikai diagnózis	Nem	Kor	IHK pozitivitás (előlső lebeny hormonjai)	Tumorméret MR alapján (mm ³)	Ki-67 proliferációs index (%)	Vizsgálat és felhasznált minta		
						mtDNS	survivin, TRAIL	miRNS
GHPA	N	61	negatív	6624	1		szövet	
GHPA	N	56	negatív	4800	0		szövet	szövet
GHPA	F	55	PRL, GH	90	0		szövet	szövet
GHPA	F	37	PRL, GH	2160	-		szövet	
GHPA	F	20	PRL, GH	14000	4,5		szövet	
GHPA	N	52	PRL, GH, FSH, LH, TSH	960	4		szövet	szövet
NFPA	N	39	FSH	-	1-2	szövet		plazma
NFPA	F	44	FSH	-	2-3	szövet		plazma
NFPA	F	51	FSH	15488	2-3	szövet	szövet	plazma
NFPA	F	38	FSH	-	3-4	szövet		plazma
NFPA	N	76	FSH	3825	2-3	szövet		
NFPA	F	64	FSH, LH	126000	< 3	szövet		plazma
NFPA	F	73	FSH, LH	NA	2-3			plazma, exoszóma
NFPA	N	49	FSH, LH	3744	< 1	szövet		plazma
NFPA	N	68	FSH, LH	-	3-4	szövet		plazma, exoszóma
NFPA	F	38	FSH, LH	-	3-4	szövet	szövet	plazma, exoszóma
NFPA	F	72	FSH, LH	10032	2			plazma
NFPA	F	67	FSH, LH	-	3-4	szövet		plazma
NFPA	N	73	FSH, LH	12000	< 2	szövet		
NFPA	F	62	FSH, LH	6000	2-3			plazma
NFPA	F	29	FSH, LH	NA	3-5			plazma, exoszóma
NFPA	F	64	FSH, LH	34320	NA			plazma
NFPA	N	80	FSH, LH	19600	2-3	szövet		
NFPA	N	69	FSH, LH	20240	< 3	szövet		
NFPA	N	74	FSH, LH	-	< 3	szövet		plazma
NFPA	N	66	FSH, LH	NA	1-2			plazma
NFPA	F	65	FSH, LH	NA	< 3			plazma
NFPA	N	47	FSH, LH	NA	3-5			plazma
NFPA	F	63	FSH, LH	41055	< 1	szövet		plazma
NFPA	N	72	FSH, LH	-	1-2	szövet		
NFPA	N	37	FSH, LH	1872	7-8	szövet		plazma, exoszóma
NFPA	F	55	FSH, LH	35000	3-4			plazma, exoszóma
NFPA	F	43	FSH, LH	-	7-10	szövet		
NFPA	F	62	FSH, LH	-	< 3	szövet		plazma
NFPA	N	76	FSH, LH	8500	< 3			plazma
NFPA	F	43	FSH, LH	NA	< 1			plazma, exoszóma
NFPA	F	55	FSH, LH	NA	< 1			plazma
NFPA	F	73	FSH, LH	-	2-3	szövet		plazma
NFPA	N	44	FSH, LH	32400	2-3			plazma, exoszóma
NFPA	F	70	FSH, LH, PRL	74088	< 2			plazma
NFPA	N	68	FSH, LH, PRL	NA	< 2			plazma
NFPA	N	27	FSH, LH, TSH	1925	5			plazma
NFPA	F	73	LH	13500	2	szövet		plazma, exoszóma
NFPA	F	72	LH	4590	< 2	szövet		plazma, exoszóma
NFPA	F	73	HN (SF1-, Pit1- T-pit-)	12144	3-4	szövet		
NFPA	N	65	HN (SF1-, Pit1- T-pit+)	2523,312	3-4	szövet		plazma, exoszóma
NFPA	N	49	HN (SF1-, Pit1- T-pit+)	-	3-4	szövet		plazma, exoszóma
NFPA	N	58	HN (SF1-, Pit1- T-pit+)	3570	4	szövet		
NFPA	N	42	HN (SF1-, Pit1- T-pit+)	NA	1-2			plazma
NFPA	F	50	HN (SF1+, Pit1- T-pit-)	14700	< 3			plazma, exoszóma
NFPA	N	64	HN (SF1+, Pit1- T-pit-)	-	5	szövet		
NFPA	N	64	HN (SF1+, Pit1- T-pit-)	-	1	szövet		
NFPA	N	43	HN (SF1+, Pit1- T-pit-)	4987,5	1	szövet		

Klinikai diagnózis	Nem	Kor	IHK pozitivitás (előző lebeny hormonjai)	Tumorméret MR alapján (mm ³)	Ki-67 proliferációs index (%)	Vizsgálat és felhasznált minta		
						mtDNS	survivin, TRAIL	miRNS
NFPA	F	58	HN (SF1+, Pit1- T-pit-)	35640	5-7	szövet		plazma, exoszóma
NFPA	F	50	HN (SF1+, Pit1- T-pit-)	-	< 2	szövet		
NFPA	N	50	HN (SF1+, Pit1- T-pit-)	-	2	szövet		
NFPA	N	60	HN (SF1+, Pit1- T-pit-)	-	5	szövet		plazma
NFPA	N	71	-	12000	0		szövet	
NFPA	F	69	-	11700	-		szövet	
NFPA	F	77	-	7200	-		szövet	
NFPA	F	36	ACTH	1750	0		szövet	
NFPA	N	29	FSH	6000	0		szövet	szövet
NFPA	N	53	FSH	-	5		szövet	
NFPA	N	83	FSH	-	< 2		szövet	
NFPA	F	34	FSH	26250	0		szövet	
NFPA	F	44	FSH	4554	2		szövet	
NFPA	N	75	FSH	8400	0		szövet	
NFPA	N	50	FSH	1200	0		szövet	
NFPA	F	76	FSH, LH	-	< 3		szövet	
NFPA	F	52	FSH, LH	-	3		szövet	
NFPA	F	44	FSH, LH	4284	3,5		szövet	
NFPA	F	62	FSH, LH	-	5		szövet	
NFPA	F	73	FSH, LH	12635	2,5		szövet	
NFPA	F	48	FSH, LH	-	< 3		szövet	
NFPA	N	73	FSH, LH	12558	3,5		szövet	
NFPA	F	47	FSH, LH	-	2,5		szövet	
NFPA	F	55	FSH, LH, TSH	21952	< 2		szövet	
NFPA	F	77	LH, TSH, PRL	-	3		szövet	
NFPA	N	31	negatív	-	4		szövet	
NFPA	F	74	negatív	26400	3		szövet	
NFPA	F	53	negatív	-	3		szövet	
NFPA	N	40	negatív	19344	2		szövet	
NFPA	N	43	negatív	-	0		szövet	
NFPA	F	55	negatív	4821	0,6		szövet	
NFPA	F	61	negatív	12690	3		szövet	
NFPA	F	80	negatív	-	1		szövet	
NFPA	F	72	negatív	4420	1		szövet	
NFPA	N	60	negatív	-	1		szövet	
NFPA	N	55	negatív	11592	2		szövet	
NFPA	F	50	negatív	-	2		szövet	
NFPA	N	46	negatív	31350	0		szövet	
NFPA	F	73	negatív	-	1,5		szövet	
NFPA	N	55	negatív	-	2		szövet	
NFPA	N	65	negatív	127,4	2,5		szövet	
NFPA	F	72	negatív	-	2,5		szövet	
NFPA	N	68	negatív	-	2		szövet	
NFPA	N	48	negatív	-	< 2		szövet	
NFPA	N	70	negatív	15000	0		szövet	
NFPA	N	58	negatív	-	2,5		szövet	
NFPA	F	58	PRL	5130	0		szövet	
egészséges	N	39	-	-	-			plazma
egészséges	N	36	-	-	-			plazma

III.2. Nukleinsav izolálás

III.2.1. DNS izolálás sejt- és szövetmintákból

A mitochondriális variánsok elemzéséhez 45 hypophysis adenoma szövetből QIAamp Fast DNA Tissue Kit (Qiagen) segítségével DNS-t izoláltam. Összesen 12 GH termelő (GHPA) és 33 klinikailag nem-funkcionáló (NFPA) adenomát vizsgáltunk, amelyből 22 FSH/LH+, 11 pedig HN volt.

A sejtekből való DNS kivonáshoz először tripszin-EDTA oldat segítségével a sejteket egymástól és a tenyésztőedénytől elválasztottam, majd friss médiumban felfuszpendáltam. A centrifugálást (10 perc, 1000 rpm) követően a felülúszót eltávolítottam, a pelletet pedig 200 ul PBS-ben felfuszpendáltam. A sejtekből a DNS izolálást a QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) és QiaCube DNS izoláló automata (Qiagen) használatával végeztem.

A DNS minták koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific) mértem.

III.2.2. RNS izolálás sejt-, szövet- és plazmamintákból

A génexpresszió méréshez a szövetmintákból miRNeasy Mini Kit (Qiagen), a sejtmintákból RNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével teljes RNS-t izoláltam, melyek koncentrációját NanoDrop 1000 spektrofotométerrel mértem (Thermo Fisher Scientific).

A vérplazma mintákat jégen való felolvasztás után centrifugálással (16000 g, 15 perc, 4°C) trombocita mentesítettem, majd mintánként 200 ul plazmából miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) segítségével teljes RNS-t izoláltam. Az RNS izolálás során minden mintához egyenlő mennyiségű cel-miR-39-3p spike-in kontrollt (Invitrogen) adtam.

III.3. Extracelluláris vezikulák izolálása és elemzése

Az extracelluláris vezikulák (EV-k) izolálását 300 ul plazmából kiindulva, precipitációs módszerrel, Total Exosome Isolation Kit (from plasma) (Thermo Fisher Scientific) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően, proteináz K enzimes emésztést

követően végeztem. Az EV-kat tartalmazó pelletet 200 μ l steril PBS-ben szuszpendáltam, majd belőlük miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen) segítségével cel-miR-39-3p spike-in kontroll (Invitrogen) hozzáadásával RNS-t izoláltam.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálatait során már többféle (transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) és áramlási citometriával) bizonyította az exoszómák jelenlétét az ugyanezen kittel izolált mintákban (Perge és mtsai 2017). Ennek megfelelően kísérleteinkben az EV-k karakterizálása a Minimal Information for Studies Extracellular Vesicles 2018 guideline alapján történt (Théry és mtsai 2018). Az izolált EV-k méreteloszlásának vizsgálata 9 mintán qNano (IZON) készülékkel, az adatok elemzése pedig az IZON Control Suite v 3.1 (IZON Science) programmal történt (Maas és mtsai 2014; Osteikoetxea és mtsai 2015).

Az áramlási citometriához 20 μ g fehérjét tartalmazó exoszóma mintákat 4 w/v%-os, 4 μ m átmérőjű aldehyd/szulfát Latex gyöngyökkel (Thermo Fisher Scientific) 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltunk. A gyöngyöz kapcsolt exoszóma pelletet ezután 10 μ l EV-mentes FBS-sel kétszer mostuk, majd anti-CD9-APC (M-L13, BD), anti-CD63-PE (MEM-259, Sigma), anti-CD81-PerCP (JS-81, BD) antitestekkel és annexin V-FITC (Biolegend) hozzáadásával 45 percig újra szobahőmérsékleten inkubáltuk. Negatív kontrollként (a háttérzaj meghatározásához) az exoszóma-gyöngy komplexet EV-mentes FBS-sel inkubáltuk és a mintákkal azonos módon megfestettük.

A mintákat FACSCalibur áramlási citométerrel (BD Biosciences) mértük, az adatokat pedig CellQuest Pro Szoftverrel (BD Biosciences) elemeztük.

III.4. Hagyományos és újgenerációs szekvenálás

III.4.1. DNS könyvtárkészítés

A mitochondriális genom elemzéséhez a DNS könyvtárkészítés a hypophysis adenoma szövetekből izolált genomiális DNS-ből kiindulva, VariantProTM Mitochondrion Panel Library Preparation Kit (VP-MIT-0048, LC Sciences, LLC) segítségével történt. Ennek első lépése a minták egyedi PCR reakcióban való indexelésére volt szükség. Ehhez mintánként az alábbi reakciót mértem össze: 7,5 μ l 2x PCR Master Mix, 0,6 μ l mitochondrium-specifikus Primer Mix, 0,6 μ l R5 és 0,6 μ l R7 Primer, valamint 5 ng DNS.

A mitochondrium-specifikus primereknek köszönhetően az amplikonok kizárólag a mitochondriális DNS-ről képződtek és szaporodtak fel, miközben az R5 és R7 Primereknek köszönhetően minden minta egyedi index jelölést kapott (5' és 3' végen).

III.4.2. Kis RNS könyvtárkészítés

A plazma minták miRNS profiljának meghatározásához a kis RNS könyvtárkészítést a QIAseq™ miRNA Library Kit (Qiagen) segítségével, mintánként 5 ul RNS felhasználásával, a gyártó utasításainak megfelelően végeztem. Röviden, a 3' és 5' végekre való adapter ligáció után a miRNS-eket univerzális reverz transzkripcióval szaporítottam fel, minden mintában, majd ezeket QIAseq miRNA NGS Beads (Qiagen) gyöngyök segítségével megtisztítottam. A reakció közben az egyedi molekuláris indexeket (UMI) hordozó reverz transzkripció primereknek köszönhetően a minták egyedi jelölést kaptak, ez tette lehetővé, a több minta egy reakcióban való szekvenálását.

III.4.3. Újgenerációs szekvenálás

Az indexelt egyedi könyvtárak tisztaságát és a megfelelő méretű fragmensek jelenlétét Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) készüléken High Sensitivity DNA Analysis Kit (Agilent Technologies) használatával ellenőriztem.

A könyvtárak koncentrációját Qubit Fluorometerrel (Thermo Fisher Scientific) mértem. Ezekből ekvimoláris mennyiségeket összemérve létrehoztam a több indexelt mintát tartalmazó, 4 nM-os könyvtár pool-t, amelyet nátrium-hidroxiddal való denaturálást követően 10 pM-osra hígítottam, majd 600 ul-t a szekvenáló kazettába pipettáztam.

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

III.4.4. Sanger szekvenálás

Az újgenerációs szekvenálással vizsgált 45 DNS mintában a kiválasztott egynukleotidos variánsokat (SNV-eket) Sanger szekvenálással validáltam. A fragmentumok felszaporításához a nukleáris genom kizárása érdekében *Ramos* és munkatársai nyomán

mitochondrium-specifikus primer készletet alkalmaztam (Ramos és mtsai 2011, 2009). A PCR termékek tisztításához Clean Sweep PCR Purification Kit-et (Thermo Fisher Scientific) használtam. A Sanger szekvenálás előkészítése BigDye™ Direct Cycle Sequencing Kit-tel (Thermo Fisher Scientific), a szekvenálás pedig Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) gép használatával történt.

III.5. Gén- és miRNS expressziós mérések RT-qPCR alapú módszerekkel

III.5.1. Expressziós profil meghatározás TaqMan Low Density Array kártyával

Az apoptózisban résztvevő gének expresszióját 29 nem-funkcionáló és 12 GH termelő hypophysis adenomában, valamint 10 ép hypophysis szövetben vizsgáltuk. Első lépésben Superscript™ III First-Strand Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével 1 µg RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltunk. Ezután minden mintából 5 µl cDNS-t kimérve 55 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) és 50 µl nukleáz-mentes víz hozzáadásával kapott 100 µl keveréket töltöttünk a TaqMan Low Density Array (TLDA) kártya minden csatornájába.

Ahhoz, hogy a plazmában mért miRNS-eket összevethessük a hypophysis adenoma szövetekben kifejeződő miRNS-ekkel 6 GH termelő hypophysis adenoma és 5 ép hypophysis szövet miRNS profilját vizsgáltuk TLDA Human MicroRNA Panel v2 (Applied Biosystems) kártyák segítségével. Első lépésben mintánként 300 ng RNS-ből kiindulva 2 primer pool (Megaplex RT primer Pool A és B) és TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével cDNS-t szintetizáltunk. Ezután a Megaplex Preamp Primerek (Human Pools Set v3.0, Thermo Fisher Scientific) használatával egy preamplifikációs lépés következett, majd a kapott terméket a fent leírtaknak megfelelően a TLDA kártyára mértük.

A kártyák előkészítése után a kvantitatív valós idejű PCR reakciókat 7900 Fast Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) gépen végeztük. Az endogén kontrollok meghatározása a Normfinder szoftverrel történt, az expresszió változásokat pedig a ddCT módszer alkalmazásával határoztuk meg.

III.5.2. Egyedi mRNS és miRNS expresszió meghatározás RT-qPCR technikával

Az egyedi mRNS expresszió mérésekhez első lépésként 1 ug RNS-ből kiindulva High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével reverz transzkripciót végeztem.

A survivin expresszióját egyedi TaqMan gene expression assay (rno-BIRC5: Rn00574012_m1, hsa-BIRC5: Hs04194392_s1, hsa-ACTB: Hs99999903_m1, 18S: Hs99999901_s1) és TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztam meg.

A ciklinA2 (CCNA2) és CDK2 gének expresszióját PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) és egyedileg tervezett primerek (rno-CCNA2 fw: 5'-GGATGGTAGTTTTGAATCACCCC-3', rev: 5'-GGATGGCCCGCATACTGTTA-3', rno-CDK2 fw: 5'-GCTTATCAACGCAGAGGGGT-3', rev: 5'-GGGTCACCATTTTCGGCAAAG-3', rno-ACTB fw: 5'-AGATCAAGATCATTGCTCCTCCT-3', rev: 5'-ACGCAGCTCAGTAACAGTCC-3') alkalmazásával mértem.

A plazmában mért miRNS expressziók validálásához mintánként 2 ul RNS-ből TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével cDNS-t készítettem, majd az expressziókat egyedi Advanced TaqMan MicroRNA Assay (Assay ID-k: cel-miR-39-3p: 478293_mir, hsa-143-3p: 477912_mir, hsa-6867-5p: 480488_mir,150 hsa-6514-3p: 480214_mir, hsa-150-5p: 477918_mir, hsa-126-5p: 477888_mir, hsa-26b-5p: 478418_mir, hsa-151 148b-3p: 477824_mir) és TaqMan Universal Master Mix (Thermo Fisher Scientific) használatával határoztam meg.

A méréseket Quant Studio 7 (Thermo Fisher Scientific) készüléken, 3 technikai párhuzamos alkalmazásával végeztem. Az expressziók kiszámításához a ddCt módszert használtam, melynek során a cel-miR-39-3p spike-in kontrollra normalizáltam. A fold change értékeket a 2^{-ddCt} képlettel határoztam meg (Livak és Schmittgen 2001).

III.6. Fehérje expressziós vizsgálatok

III.6.1. Western blot analízis

A fehérje izoláláshoz a sejteket PBS-sel (foszfát puffer) való mosás után 0,5% proteáz inhibitor koktélt (PIC), 0,002 M nátrium-ortovanadátot (Na_3VO_4) és 0,01 M nátrium-fluoridot (NaF) tartalmazó western blot lízis puffereben (0,02 M Tris, 0,15M NaCl, 0,002 M EDTA, 0,5% Triton-X) felfuszpendáltam. Ezután a sejtörmelék eltávolítása érdekében a mintákat lecentrifugáltam (13000 rpm, 20 perc, 4°C), és a fehérjét tartalmazó felülúszókat új csőbe helyeztem, majd felhasználásig -70°C-on tároltam.

A fehérjék koncentrációját Bradford reagens (Sigma) segítségével határoztam meg. Az abszorbanciát Varioskan Flash plate reader (Thermo Fisher Scientific) műszerrel 595 nm-en mértem.

A fehérjéket ezután egyforma koncentrációjúra hígítottam, 5x sample bufferrel (Thermo Fisher Scientific) kevertem és 99°C-on 5 percig denaturáltam. Az azonos mennyiségű minták fehérjéit 15%-os poliakrilamid gélen elválasztottam, majd 2-3 órányi blottolással PVDF (polivinilidén-difluorid) membránra vittem át, melynek sikerességét Ponceau festéssel igazoltam. A membránt az elsődleges antitesttől függően egy órán át 5% tejben vagy 5% BSA (szarvasmarha szérum albumin) oldatban blokkoltam, majd egy éjszakán át 4°C-on inkubáltam az elsődleges antitesttel: survivin (1:500; #2808, Cell Signaling), CDK2 (1:1000; #2546, Cell Signaling), p-CDK2 (1:1000; #2561, Cell Signaling), cyclin A2 (1:1000; #MA1-154, Thermo Fisher Scientific). A következő nap a mosási fázisok után 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam az elsődleges antitestnek megfelelő anti-egér (1:2000, #P044701, Agilent) vagy anti-nyúl (1:2000, #P044801, Agilent) tormaperoxidáz-kötött másodlagos antitesttel. Végül az újabb mosási fázisokat követően a membránokat SuperSignal West Pico kemilumineszcens szubsztrát (Thermo Fisher Scientific) segítségével hívtam elő, és Kodak Image Station 4000MM műszerrel vizualizáltam.

Az előhívást követően a membránokról stripping buffer (0,2 mol/dm³ glicin, 0,1% nátrium-dodecil-szulfát, 0,1% Tween-20, pH=2,2) segítségével az antitesteket eltávolítottam, és blokkolást követően az előbbiekhöz hasonlóan β -aktin elsődleges

antitesttel (1:2000, #4967, Cell Signaling Technology) is jelöltem, ennek mennyiségét is detektáltam, és az egyes fehérjék kifejeződését az adott minta β -aktin mennyiségére normalizáltam. A denzitometriai elemzéshez az Image J szoftvert (Bethesda) alkalmaztam.

III.6.2. Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatához 16 nem-funkcionáló és 9 GH termelő hypophysis adenoma, valamint 5 ép hypophysis szövetből származó formalinnal-fixált paraffinba ágyazott (FFPE) mintát használtunk.

A 4 μ m-es metszeteket, a korábban beállított protokoll alapján (Butz és mtsai 2017) nyúl anti-survivin elsődleges (1:4000, #2808, Cell Signaling Technology), és kecske anti-nyúl másodlagos (1:200, #P0448, Agilent) antitestek segítségével jelöltük.

Az előhívást DAB Chromogen Kit (Biocare Medical) alkalmazásával végeztük, valamint a mintákon haematoxylin jelölést is alkalmaztunk. Az elkészült metszeteket nagyfelbontású scanner (Pannoramic Scan, 3DHISTECH Kft.) segítségével digitalizáltuk, és a CaseViewer 2.1 szoftver NuclearQuant (3DHISTECH Kft.) moduljának segítségével patológus elmezte. A survivin expresszió alapján két csoportot különítettük el: negatív-gyenge, és közepes-erős expresszió. A szoftver segítségével megállapítottuk, hogy a sejtek hány százaléka volt survivin pozitív. A közepes-erős festődést alkalmaztuk a csoportok közötti összehasonlításra.

III.7. Sejttenyésztéken végzett *in vitro* vizsgálatok

III.7.1. Sejttenyésztés

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

Az RC-4 B/C sejtek fenntartásához 4 mM L-glutamint, 1,5 g/l nátrium-bikarbonátot és 4,5 g/l glükózt tartalmazó Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) és szintén 1 g/l glükózt tartalmazó Minimum Essential Medium α (MEM α) 1:1 keverékét egészítettem ki 0,01 mM nem-esszenciális aminosav keverék (NEAA), 15 mM HEPES,

0,2 mg/ml BSA, 2.5 ng/ml EGF (epidermális növekedési faktor), 10% dializált hő-inaktivált FBS (magzati szarvasmarha szérum), és 1% Penicillin-Streptomycin antibiotikum hozzáadásával.

A GH3 sejteket 2,5% FBS és 15% lószérum hozzáadásával kiegészített F-12K Médiumban tenyésztettem.

Mindkét sejtvonalat 37°C-on, 5%-os CO₂ koncentráció mellett párásított inkubátorban tartottam, és 2-3 naponta médiumot cseréltem rajtuk. A passzáláshoz 0,25% (w/v) Trypsin-0,53 mM-EDTAoldatot használtam.

III.7.2. *In vitro* kezelések

Az RNS, DNS, fehérje és citoplazma extraktum izolálásához a sejteket hatlyukú edényben tenyésztettem, melyre a kezelést megelőző napon 6×10^5 RC-4 B/C vagy 2×10^6 GH3 sejtet ültettem ki. A proliferáció vizsgálatához 96 lyukú edényeket használtam, melyre szintén a kezelést megelőző napon ültettem ki $2,5 \times 10^4$ (RC-4 B/C) illetve $6,5 \times 10^4$ (GH3) sejtet.

A kezelésekhez használt ASA (Sigma), és YM155 kis molekula inhibitor (Selleckchem) dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottam. A humán rekombináns TRAIL (ThermoFisher Scientific) beoldása a gyártó utasításainak megfelelően 0,1% BSA-t tartalmazó nukleázmentes vízbe történt. A beoldási koncentrációkat mindig úgy választottam meg, hogy a sejtekhez azonos térfogatú vivőanyag kerüljön, amely a médiumban ne haladja meg a 0,1%-ot. A kísérletek során alkalmazott kontrollok a kezelésekkel azonos térfogatú vivőanyagot kaptak.

A sejtkezelésekhez az ASA esetében 1-5 mM, az YM155 esetében 0,1-5 uM, a TRAIL esetében pedig 2 ug/ml koncentrációkat alkalmaztam, melyeket részben szakirodalmi ajánlások (Ashkenazi és mtsai 1999; Rauch és mtsai 2014; Stuckey és Shah 2013; Yang és mtsai 2011), részben pedig saját előkísérleteim alapján választottam ki. A kezeléseket minden méréshez legalább 3 független kísérletben végeztem el.

III.7.3. Életképesség és proliferációs assay

A kezelések sejtproliferációra gyakorolt hatását AlamarBlue reagenssel vizsgáltam (Thermo Fisher Scientific). A 96 lyukú tenyésztőedényben tartott és kezelt sejtekhez 10%

AlamarBlue reagenst adtam, majd 1 órán át 37 °C-on sötétben inkubáltam. A fluoreszcens mérést (excitációs maximum: 560 nm, emissziós maximum: 590 nm) Varioskan Flash plate reader (Thermo Fisher Scientific) készüléken végeztem. Kezelésenként és időpontonként 4 párhuzamos mérést alkalmaztam.

A sejtek életképességének vizsgálatához trypan blue festést használtam, amely lehetőséget ad az élő és elpusztult sejtek elkülönítésére. A festés előtt a 6 lyukú edényen tenyésztett és kezelt sejtekről eltávolítottam a médiumot, majd PBS-sel történő mosást követően 200 µl 0,25% (w/v) Trypsin-0,53 mM-EDTA oldattal 37 °C-on 8-10 percig inkubáltam, hogy a sejtek egymástól és a tenyésztőedénytől elváljanak. Az emésztési reakciót 1 ml tápfolyadékkal állítottam le, melyben felszuszpendáltam a sejteket. Ezután a sejtuszuspenzióhoz 1:1 arányban 0,4% trypan blue oldatot adtam. A vizsgálat alapja, hogy az élő sejtek nem festődnek meg, míg a elpusztult sejtek permeábilis membránján át tud jutni a festék, így ezek kékre színeződnek. Az élő és halott sejtek számát Bürker kamra segítségével határoztam meg.

III.7.4. Apoptózis és DNS fragmentációs assay

A kaszpáz-3 aktivitását a Caspase Colorimetric Protease Assay Sampler Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével a gyártó utasításainak megfelelően végeztem. A kezeléseket követően a médiumot eltávolítottam a sejtekről, és PBS-sel való mosást követően 50 µl hideg sejtlízis pufferben felszuszpendáltam, majd 10 percig jégen inkubáltam a sejteket. Egy centrifugálási lépést követően (1 perc, 10000 g), a sejtörmelék mentes citoplazma extraktumot (felülúszó) új centrifuga csőbe pipettáztam, és a fehérje koncentrációját Bradford reagens (Sigma) segítségével mértem. Ez alapján a mintákat egyforma koncentrációra (2 mg/ml) hígítottam, és 1:1 arányban 10 mM DTT-t és 200 µM DEVD-pNA szubsztrátot tartalmazó Reakció Pufferrel 2 órán át 37 °C-on sötétben inkubáltam. Az abszorbanciát Varioskan Flash plate reader (Thermo Fisher Scientific) segítségével 405 nm-en mértem.

Az effektor kaszpázok aktiválódása mellett, az apoptózis egy másik jellegzetessége a DNS fragmentáció. Ennek vizsgálata érdekében a DNS mintákat gélelektroforézisnek vettem alá etídium-bromidot tartalmazó 1%-os agaróz gél felhasználásával.

III.7.5. Apoptózis és sejtciklus vizsgálat áramlási citometriával

A különböző kezelések (ASA, YM155 inhibitor és survivin siRNS) apoptózis indukáló és sejtciklust befolyásoló hatását áramlási citometriával vizsgáltam. A kezelési idő letelte után a sejteket tripszin-EDTA segítségével felszuszpendáltam, PBS-sel kétszer átmostam, majd a centrifugálást (1000 rpm, 5 perc) követően a pelletet jéghideg 70%-os etanolban szobahőmérsékleten 20 percig fixáltam, majd felhasználásig (de legalább 30 percig) -20°C-on tároltam.

A mérés előtt a sejteket lecentrifugáltam (1000 rpm, 5 perc), majd 100 ng/ml RNáz tartalmú extrakciós pufferben (200 mM Na₂HPO₄, pH=7,8) felszuszpendáltam, és szobahőmérsékleten 15 percig állni hagytam. Ezután hozzáadtam a propidium-jodid DNS festéket (végső koncentráció: 10 ng/ml) és 15 percig szobahőmérsékleten sötétben inkubáltam.

Ezután a sejteket FACSCalibur áramlási citométeren (BD Sciences) elemeztem, minden mintában legalább 10000 eseményt mértem. Az eredmények értékeléséhez Cell Quest Pro és ModFit szoftvereket alkalmaztam. A korábbiakhoz hasonlóan minden kezelésnél és időpontnál legalább három biológiai párhuzamos mintát mértem meg.

III.7.6. Plazmid transzfekció

A survivin túlexpresszáltatásához plazmid transzfekciót alkalmaztam. Ehhez az RC-4 B/C sejtekből High Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) segítségével felszaporított survivin cDNS fragmentumot HindIII és XbaI enzimek (New England Biolabs) használatával pcDNA3.1 vektorba (Thermo Fisher Scientific) klónoztam. Az elkészült vektort *Escherichia coli* DH5 α baktériumokba transzformáltam, melyekből felszaporítás után PureLink HiPure Plazmid Midiprep Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével nyertem ki a rekombináns DNS-t nagy mennyiségben. Az inszert szekvenciáját és plazmidba való beépülését a plazmidon tapadó primerek segítségével, Sanger szekvenálással ellenőriztem (a primerek szekvenciája: fw: 5'-CGAAGCTTCACCATGGGTGCTCCGGCGCTGC-3', rev: 5'-CGTCTAGAGTCAGCGTAAGGCAGCCAGCTG-3').

Az elkészült plazmidot X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Sigma) segítségével juttattam be az RC-4 B/C sejtekbe. A survivin túlexpresszáltatásának sikerességét 48 óra eltelte után kvantitatív real-time PCR-rel és western blottal is igazoltam. A transzfekció hatékonysága megközelítőleg 80%-os volt, melyet GFP-t (zöld fluoreszcens fehérje) tartalmazó plazmid bevitelével fluoreszcens mikroszkóppal ellenőriztem.

III.7.7. siRNS transzfekció

A survivin gén csendesítése érdekében két különböző survivin siRNS-sel (Silencer Select s133761, s133762, Thermo Fisher Scientific), és egy negatív kontrol siRNS-sel (Thermo Fisher Scientific), Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) reagens segítségével transzfektáltam a sejteket 10 nM végkoncentrációban. A géncsendesítés hatékonyságát western blottal ellenőriztem (ennek lépéseit lsd. **III.6.1. fejezet**).

III.8. Xenograft kísérlet

A xenograft kísérlethez 6-8 hetes, kombinált immunhiányos (SCID) BALB/C törzsű beltenyésztett egereket használtunk. A sejteket trypsin-EDTA emésztést követően PBS-sel mostuk, és 100 μ l szérum-mentes tápfolyadékban felfuszpendáltuk. A sejtszuszpenziót 1:1 arányban mátrigéllal (Corning) kevertünk, és az állatok bőre alá juttattuk. Minden kísérletben két-két egeret használtunk, és a kísérleteket háromszor ismételtük.

A GH3 sejtek esetében az irodalmi adatok alapján 10^7 sejtet használtunk, míg az RC-4 B/C sejtek esetében nincs publikált xenograft modell, így többféle kiindulási sejtszámot is kipróbáltunk (5×10^6 , 10^7 , 2×10^7).

Az egereket ad libitum tápláltuk, a tumorok méretét pedig hetente egyszer, ugyanaz az állatházi gondozó mérte le. A tumorok méretét az alábbi formula alapján számoltuk ki: $\text{volumen (cm}^3\text{)} = l \times w^2 \times 0,5$, ahol „l” (length) és „w” (width) a tumor hossza és szélessége (Jensen és mtsai 2008).

Az állatokat éter anesztéziában cervikális diszlokációval öltük le, majd boncolásnak vetettük alá, a tumorokat formalinban fixáltuk.

III.9. Bioinformatikai és statisztikai módszerek

III.9.1. A mitochondriális genom szekvenálásának bioinformatikai elemzése

A mitochondriális genom vizsgálata során az újgenerációs szekvenálással kapott eredményeket a Genome Analysis Toolkit (GATK) best practice guideline alapján elemeztük. A kétirányú szekvenálás adatainak FASTQ formátumba való kinyerése után az adapterek levágása és a rosszabb minőségű read-ek ($QC < 20$) kiszűrése a Trim Galore (Babraham Bioinformatics, www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore) és a cutadapt algoritmus használatával történt (Martin 2011).

A variánsok azonosítása során az illesztéshez a legfrissebb humán mitochondriális referencia szekvenciát (Revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) of the Human Mitochondrial DNA (NC_012920.1 gi:251831106)) használtuk.

A referencia allélt minden esetben nullának, a variáns allélt egynek vettük, ennek megfelelően a statisztikai elemzéseknél nem-parametrikus tesztek alkalmaztunk. A heteroplazmia arányának meghatározásához a variáns allél előfordulását osztottuk a teljes előfordulással. A heteroplazmia meghatározásánál irodalmi adatokra támaszkodva 3%-ot vettünk cut-off értéknek, és az ez alatti értékeket nem tekintettünk valós előfordulásnak (Kloss-Brandstätter és mtsai 2015).

A különböző hisztológiai csoportoknak a variánsgyakoriságok alapján való összehasonlítására két csoport esetén Wilcoxon rank sum tesztet, több csoport esetén nem-parametrikus Kruskal-Wallis Rank tesztet követő Conover-Iman post-hoc tesztet alkalmaztunk (Siegel és Castellan Jr. 1988). A többszörös összehasonlítást Benjamini és Hochberg (BH) módszerrel korrigáltuk.

A hierarchikus klaszterelemzéshez az R program heatmap csomagját használtuk, és az Euklideszi távolság módszert alkalmaztuk, melynek során a csoportosítás alapjául az átlagok szolgáltak.

III.9.2. A mikroRNS szekvenálás bioinformatikai elemzése

A kis RNS könyvtár újgenerációs szekvenálással való elemzése során kapott read-ekről első lépésben a cutadapt program segítségével eltávolítottuk a 3' adaptereket, és a rossz

minőségű bázisokat (<http://cutadapt.readthedocs.io/en/stable/guide.html>). Ezután a bowtie algoritmus használatával (<http://bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml>) a szekvenciákat a miRBase v21 adatbázisban megtalálható érett miRNS szekvenciákra illesztettük.

Az elemzésekhez minden olyan leolvasást figyelembe vettünk, amely illeszkedett valamely érett miRNS szekvenciára és rendelkezett a minták beazonosításához szükséges egyedi molekuláris index-szel (UMI read-ek). Ez minden mintára megadott egy teljes miRNS találatszámot, amelyre az adott mintában talált egyedi miRNS találatszámokat normalizáltuk, és ezáltal az expresszió változásokat meghatározhattuk. A könnyebb interpretálhatóság érdekében a kapott számokat mindenhol 10000-rel szoroztuk (normalizált read számok).

Az expressziós különbségek meghatározásához a csoportok száma és az eloszlások alapján Student féle T-próbát, párosított T-próbát, vagy Wilcoxon rank sum tesztet használtunk, a többszörös összehasonlításból eredő hiba korrekciójára Benjamini-Hochberg (BH) tesztet alkalmaztunk

Az isomiR-ek elemzéséhez isomiR-SEA algoritmust használtuk (Urgese és mtsai 2016). A hierarchikus klaszteranalízist Euklideszi távolság módszerrel a Pheatmap R programcsomag segítségével végeztük.

III.9.3. Statisztikai elemzések

A nagy áteresztőképességű és az egyedi kvantitatív valós idejű PCR-rel kapott eredmények elemzését és vizualizálását az R statisztikai programmal és a GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc.) szoftverrel végeztük.

Két csoport összehasonlításánál a Shapiro-Wilk normalitás teszt eredménye alapján Student féle T-próbát vagy Mann-Whitney tesztet alkalmaztunk.

Több csoportban Shapiro-Wilk normalitás teszt eredményétől függően egyutas varianciaelemzést (ANOVA) követő Tukey-féle post-hoc tesztel vagy Kruskal-Wallis tesztet követő Dunn tesztel elemeztük.

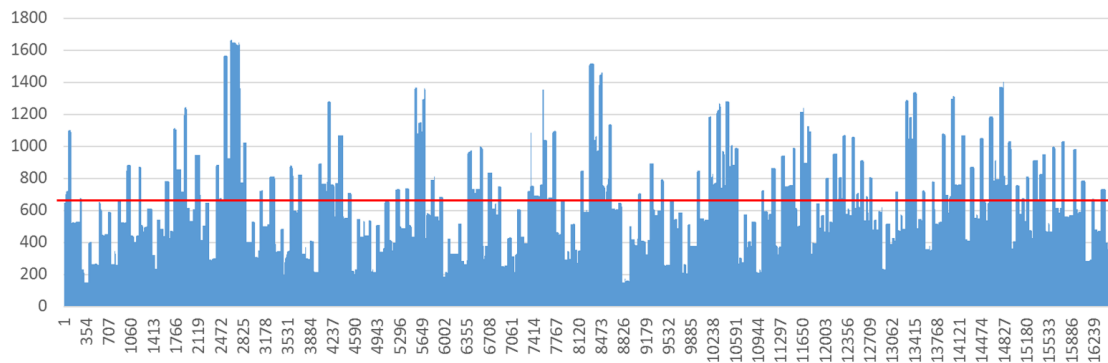
Minden elemzésnél $p < 0,05$ értéket tekintettünk statisztikailag szignifikánsnak.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. A hypophysis adenomák mitochondriális genomjának elemzése

IV.1.1. A teljes mitochondriális genom vizsgálata újgenerációs szekvenálással

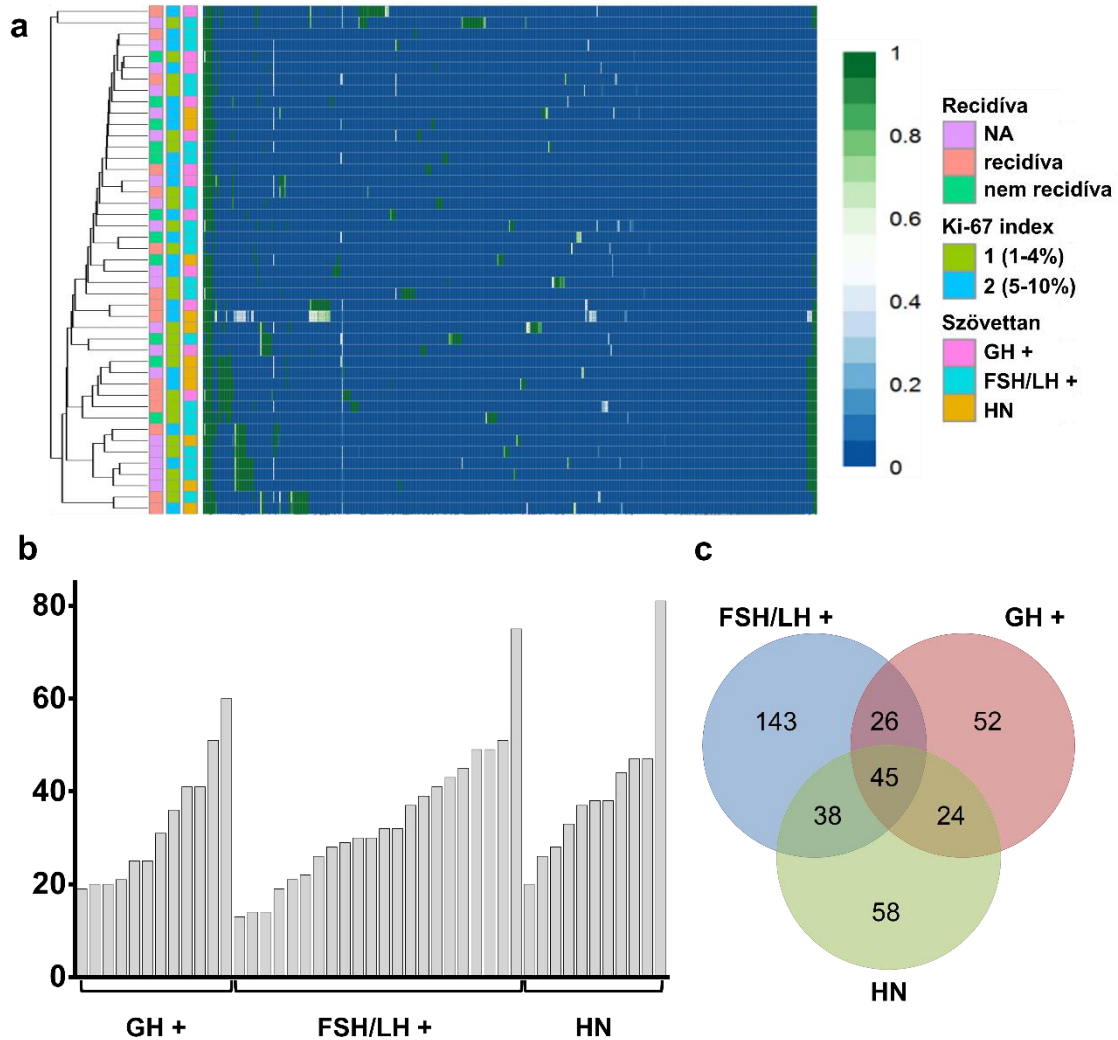
Az újgenerációs szekvenálás során mintánként átlagosan 52 399 (minimum: 24 019, maximum: 242 870) leolvasást (read-et) kaptunk. Az illesztés során a leolvasások 95±1%-a illeszkedett a humán mitochondriális genomra, amely mutatja az alkalmazott módszer hatékonyságát, azaz a könyvtárkészítés során nagy specificitással sikerült a mitochondriális genomot felszaporítanunk. A bázisonkénti átlagos lefedettség 630±370 (átlag±SE) read volt (**1. ábra**).



1. ábra – A mitochondriális genom újgenerációs szekvenálással való elemzése során kapott bázisonkénti lefedettségek – A piros vonal jelzi az átlagos lefedettséget, ami 630±370 (átlag±SE) volt.

Összesen 496 egynukleotidos variánst (SNV-t) azonosítottunk legalább egy mintában, melyek közül 269 fehérjekódoló, 227 pedig nem-kódoló régióban helyezkedett el. A fehérjekódoló variánsok közül 136 nem-szinonim, 133 pedig szinonim változást okozott. Az összes általunk azonosított variáns adatait a Mellékletben szereplő **1. kiegészítő táblázat** tartalmazza. A munkánkat megelőzően egyetlen munkacsoport vizsgált mitochondriális variánsokat GH és/vagy PRL termelő (nem oncocyta) hypophysis adenomákban. Ennek eredményei elérhetőek voltak a HmtDB adatbázisban (<http://www.hmtdb.uniba.it>), így össze tudtuk vetni az általunk azonosított variánsokat ezen korábbi eredményekkel, és megállapítottuk, hogy az általunk leírt 496 variánsból 82 volt megtalálható az adatbázisban, 414 pedig teljesen újnak bizonyult (**1. kiegészítő táblázat**).

A detektált variánsok közül 482 mutatott legalább egy mintában valamilyen mértékű, általában alacsony heteroplazmiát (színekkel jelölve, **2. ábra/a**).



2. ábra – A mitochondriális genomon azonosított variánsok lehetséges összefüggései a betegek klinikai adataival – a) A hierarchikus klaszteranalízis megmutatta, hogy az összes variánst vizsgálva nem különülnek el egymástól a különböző szövettani típusú, különböző Ki-67 index-szel rendelkező, vagy a recidív-nem recidív adenómák. A kék-zöld színskála a heteroplazmia arányát mutatja, ahol a kék (0) jelenti a 100% referencia, míg a zöld (1) a 100% variáns allélt. Az ábra jól mutatja a tapasztalt alacsony mértékű heteroplazmiát (kék dominancia). **b)** A különböző szövettani típusú adenómákban talált variánsok száma mintánként. A minták a csoportokon belül a variánsok száma alapján növekvő sorrendbe lettek rendezve. **c)** A különböző szövettani típusú adenómákban talált egyedi és közös variánsok száma. FSH: folliculus stimuláló hormon, LH: luteinizáló hormon, GH: növekedési hormon, HN: hormon negatív, NA: nincs adat (Németh és mtsai 2019)

A különböző szövettani csoportok összehasonlítása alapján megállapítható, hogy a hormon negatív (HN) adenomák enyhén magasabb (8,27%) heteroplazmiát mutatnak, mint az FSH/LH+ (6,96%) és a GH termelő (6,72%) adenomák (**2. táblázat**). Ez a különbség akkor is megmaradt, ha a kódoló és nem-kódoló variánsokat külön elemeztük (**2. táblázat**). Nem találtunk különbséget az alacsony (<50%) és a magas (>50%) heteroplazmiát mutató minták tumorméretében és proliferációjában (Ki-67 index alapján).

2. táblázat – A heteroplazmia aránya (átlag és standard deviáció) a különböző szövettani típusú adenomák teljes mitochondriális genomjának vizsgálata során – GHPA: GH termelő hypophysis adenoma, FSH: follikulum stimuláló hormon, LH: luteinizáló hormon, GH: növekedési hormon, HN: hormon negatív, SD: standard deviáció (Németh és mtsai 2019)

	Összes adenoma	GHPA	FSH/LH+ adenoma	HN adenoma
Minden variáns				
átlag (%)	7,22	6,72	6,96	8,27
SD (%)	13,78	14,73	13,37	16,71
Fehérjekódoló variánsok				
átlag (%)	6,59	6,18	6,35	7,45
SD (%)	12,56	13,36	12,06	16,16
Nem-kódoló variánsok				
átlag (%)	7,98	7,37	7,71	9,17
SD (%)	15,14	16,24	14,79	17,34

Átlagosan mintánként 35 variánst azonosítottunk, amely hasonló volt a különböző szövettani csoportokban (GHPA: 33, FSH/LH+ adenoma: 34, HN adenoma: 40). Bár az előforduló variánsok száma nem mutatott korrelációt a proliferációval, megállapítottuk, hogy szövettani típustól függetlenül, a legtöbb variánst hordozó mintáknak volt a legmagasabb a Ki-67 proliferációs index-ük (GHPA: 8%, FSH/LH+ adenomák: 7-10%, HN adenomák: 5%) (**2. ábra/b**).

A szövettani csoportokat összehasonlítva 143, 58, illetve 52 olyan variánst találtunk, amely kizárólag a FSH/LH+, a HN vagy a GH termelő adenomákban fordult elő, a másik kettőben egyáltalán nem (**2. ábra/c** és **3. táblázat**).

3. táblázat – A kizárólag az egyik szövettani típusra jellemző mitochondriális variánsok – GHPA: GH termelő hypophysis adenomák, FSH/LH+ adenomák: FSH és/vagy LH pozitív nem-funkcionáló hypophysis adenomák, HN: hormon negatív nem-funkcionáló hypophysis adenomák (Németh és mtsai 2019)

GHPA (52)	FSH/LH+ adenomák (143)		HN adenomák (58)
chrM_199	chrM_183	chrM_9949	chrM_188
chrM_368	chrM_235	chrM_9966	chrM_189
chrM_374	chrM_239	chrM_10217	chrM_497
chrM_456	chrM_247	chrM_10253	chrM_866
chrM_951	chrM_317	chrM_10946	chrM_1189
chrM_2245	chrM_320	chrM_11009	chrM_1958
chrM_2387	chrM_385	chrM_11016	chrM_2416
chrM_2407	chrM_564	chrM_11031	chrM_2850
chrM_2772	chrM_593	chrM_11169	chrM_3480
chrM_3670	chrM_877	chrM_11203	chrM_3832
chrM_4048	chrM_879	chrM_11253	chrM_3918
chrM_4071	chrM_933	chrM_11377	chrM_4435
chrM_4164	chrM_961	chrM_11402	chrM_4755
chrM_4639	chrM_1030	chrM_11866	chrM_5801
chrM_5263	chrM_1718	chrM_11914	chrM_5906
chrM_5325	chrM_1824	chrM_11959	chrM_6227
chrM_5351	chrM_1893	chrM_12103	chrM_6425
chrM_5460	chrM_2392	chrM_12127	chrM_6851
chrM_5703	chrM_3264	chrM_12390	chrM_7022
chrM_6386	chrM_3380	chrM_12634	chrM_7559
chrM_6455	chrM_3414	chrM_12645	chrM_7621
chrM_6680	chrM_3552	chrM_12684	chrM_7910
chrM_6768	chrM_3565	chrM_12716	chrM_8020
chrM_6776	chrM_3915	chrM_12764	chrM_8270
chrM_7080	chrM_4086	chrM_12773	chrM_8308
chrM_7299	chrM_4122	chrM_12957	chrM_8440
chrM_7684	chrM_4227	chrM_13036	chrM_8596
chrM_7819	chrM_4401	chrM_13063	chrM_9128
chrM_7853	chrM_4558	chrM_13102	chrM_9520
chrM_8153	chrM_4715	chrM_13169	chrM_9698
chrM_8869	chrM_4727	chrM_13263	chrM_10334
chrM_8926	chrM_4793	chrM_13613	chrM_10360
chrM_9110	chrM_4796	chrM_13681	chrM_10394
chrM_9548	chrM_4937	chrM_13759	chrM_10550
chrM_9575	chrM_4974	chrM_13788	chrM_10630
chrM_9824	chrM_5031	chrM_13823	chrM_10813

GHPA (52)	FSH/LH+ adenomák (143)		HN adenomák (58)
chrM_10192	chrM_5262	chrM_13825	chrM_10948
chrM_10345	chrM_5293	chrM_13834	chrM_11299
chrM_12161	chrM_5334	chrM_13984	chrM_11337
chrM_12373	chrM_6126	chrM_14003	chrM_11832
chrM_12405	chrM_6464	chrM_14318	chrM_12810
chrM_12811	chrM_6554	chrM_14344	chrM_13117
chrM_13528	chrM_6756	chrM_14893	chrM_13230
chrM_13824	chrM_6779	chrM_14971	chrM_13336
chrM_14435	chrM_7024	chrM_15172	chrM_13857
chrM_15323	chrM_7196	chrM_15218	chrM_13965
chrM_16182	chrM_7270	chrM_15245	chrM_14167
chrM_16256	chrM_7645	chrM_15249	chrM_14319
chrM_16287	chrM_7714	chrM_15322	chrM_14687
chrM_16297	chrM_7789	chrM_15487	chrM_15062
chrM_16526	chrM_7963	chrM_15734	chrM_15331
chrM_16527	chrM_8014	chrM_15750	chrM_16086
	chrM_8026	chrM_15927	chrM_16093
	chrM_8277	chrM_16067	chrM_16185
	chrM_8279	chrM_16092	chrM_16224
	chrM_8281	chrM_16148	chrM_16239
	chrM_8431	chrM_16162	chrM_16240
	chrM_8448	chrM_16193	chrM_16366
	chrM_8473	chrM_16194	
	chrM_8521	chrM_16209	
	chrM_8584	chrM_16221	
	chrM_9033	chrM_16263	
	chrM_9156	chrM_16265	
	chrM_9182	chrM_16266	
	chrM_9380	chrM_16288	
	chrM_9398	chrM_16302	
	chrM_9492	chrM_16327	
	chrM_9527	chrM_16355	
	chrM_9545	chrM_16399	
	chrM_9554	chrM_16482	
	chrM_9819	chrM_16545	
	chrM_9899		

A hierarchikus klaszteranalízis során a minták nem különültek el sem a szövettani típus, sem a Ki-67 index, sem pedig a recidív/nem-recidív státusz alapján (**2. ábra/a**).

A nem-parametrikus ANOVA elemzés alapján a szövettani csoportok között 8 szignifikánsan eltérő gyakoriságú variánst azonosítottunk (**4. táblázat**). Az A11251G, a T4216C, a T16126C, a C15452A, a T14798C, az A188G és a T16093C variánsok gyakorisága eltérő volt a GHPA és a HN adenomák között, míg a T14798C, a G185A, az A188G és a T16093C variánsok gyakorisága az FSH/LH+ és a HN adenomákban különbözött (**4. táblázat**).

4. táblázat – A különböző típusú hypophysis adenomákban szignifikánsan eltérő gyakoriságot mutató mitochondriális variánsok jellemzői – A kaukázusi populációban kimutatott csírasejtes gyakoriságok a Mitomap adatbázisból származnak (www.mitomap.org). HN: hormon negatív nem-funkcionáló hypophysis adenomák, FSH/LH+: FSH és/vagy LH pozitív nem-funkcionáló hypophysis adenomák, GH+: GH termelő hypophysis adenomák, CYB: citokróm b, ND1: NADH dehidrogenáz 1, ND4: NADH dehidrogenáz 4, nem-szin: nem szinonim változást okozó variáns, szin: szinonim változást okozó variáns, ref: referencia allél, var: variáns allél, *: Sanger szekvenálással is validált variánsok (Németh és mtsai 2019)

Pozíció	Régió	Allélok		Gén	Gyakoriság (csírasejtes, kaukázusi)	Gyakoriság a különböző típusú adenoma mintáinkban			korrigált p-érték	Klinikai jelentőség
		Ref	Var			HN	FSH/LH+	GH+		
chrM_14798*	nem-szin	T	C	CYB	0.107	0,36	0,05	0,08	GH+ vs. HN: 0,0342 FSH/LH+ vs. HN: 0,0166	NA
chrM_4216*	nem-szin	T	C	ND1	NA	0,55	0,27	0,08	GH+ vs. HN: 0,0225	Leber-féle optikus atrófia
chrM_15452	nem-szin	C	A	CYB	0.144	0,55	0,27	0,08	GH+ vs. HN: 0,0225	ovárium neoplázia (valószínűleg patogén)
chrM_11251	szin	A	G	ND4	NA	0,55	0,27	0,08	GH+ vs. HN: 0,0225	NA
chrM_185	nem-kódoló	G	A	-	NA	0,27	0,00	0,08	FSH/LH+ vs. HN: 0,0142	NA
chrM_188	nem-kódoló	A	G	-	NA	0,18	0,00	0,00	GH+ vs. HN: 0,0246 FSH/LH+ vs. HN: 0,0249	NA
chrM_16093	nem-kódoló	T	C	-	NA	0,18	0,00	0,00	GH+ vs. HN: 0,0246 FSH/LH+ vs. HN: 0,0249	NA
chrM_16126	nem-kódoló	T	C	-	NA	0,55	0,27	0,08	GH+ vs. HN: 0,0225	NA

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

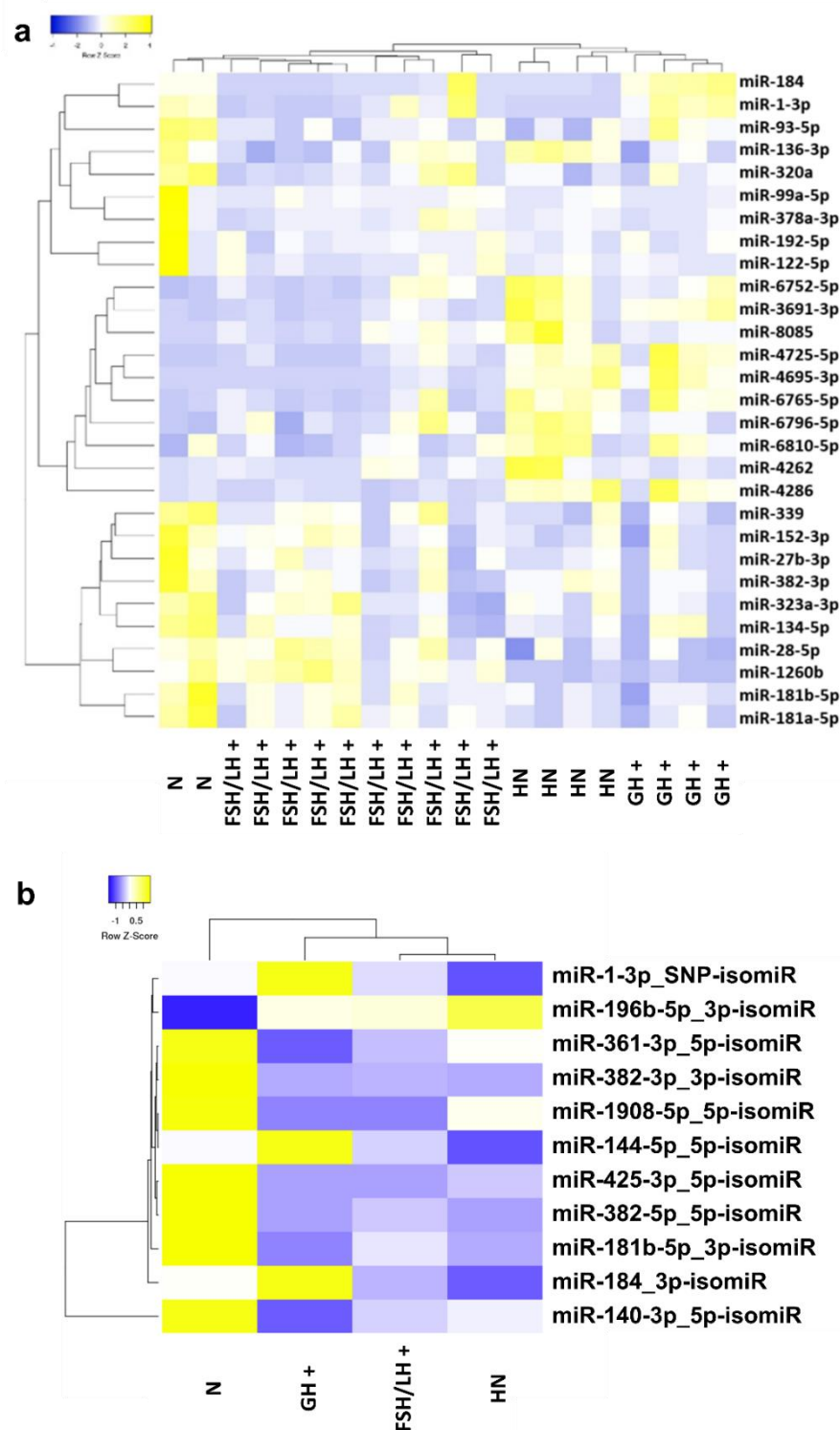
IV.1.2. A mitochondriális variánsok validálása Sanger szekvenálással

A szövettani csoportok között eltérő gyakoriságú 8 variánsból 4 (G185A, A188G, T16093C és T16126C) a nem-kódoló D-loop régióban foglalt helyet. A másik négy, kódoló régióban elhelyezkedő variáns közül az A11251G szinonim változást okozott. Nem-szinonim variánsok voltak ezzel szemben a citokróm b (CYB) génben elhelyezkedő T14798C és C15452A, és a NADH-dehidrogenáz 1-es alegységében lévő T4216C. Ezek a variánsok rs28357681, rs527236209 és rs1599988 néven már ismertek voltak. A variánsok adatait a **4. táblázat** mutatja.

A validáláshoz két olyan variánst választottunk ki (T14798C, T4216C), amelyek kódoló régióban elhelyezkedő, nem-szinonim változást okozó variánsok, és nem mutattak heteroplazmiát, így Sanger szekvenálással nagy biztonsággal validálhatóak voltak. A két variánst mind a 45 újgenerációs szekvenálással is elemzett mintában megvizsgáltuk, és a korábban kapott eredményeket 100%-ban sikerült megerősítenünk.

IV.2. Keringő miRNS biomarkerek keresése hypophysis adenomás betegekben

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



3. ábra – A hypophysis adenomás betegek preoperatív, és az egészséges plazmaminták miRNS profilozásának hierarchikus klaszteranalízise hő térképen ábrázolva – 29 olyan miRNS-t (a) és 11 isomiR-t (b) azonosítottunk, amelyek alapján elkülönülnek a különböző mintacsoportok. A színskála a miRNS/isomiR mennyiségét mutatja az alacsonytól (lila) a magasig (sárga). N: egészséges plazma, GH+, FSH/LH+, HN: a nevezett szövettani típusú hypophysis adenomával műtött betegek plazmamintái

IV.2.1. Plazma miRNS és isomiR profil elemzése újgenerációs szekvenálással

IV.2.1.1. *Hypophysis adenomás betegek plazma miRNS profiljának összehasonlítása*

Első lépésben kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen miRNS-ek fordulnak elő az általunk vizsgált 18 hypophysis adenomás (4 GH+, 10 FSH/LH+, 4 HN) beteg plazmájában a 2 egészséges kontroll plazmához képest.

A szekvenálás során mintánként átlagosan körülbelül 4 millió (4 001 268) read-et kaptunk, melyeket a miRBase adatbázisban (www.mirbase.org, miRBase v21) (Griffiths-Jones 2004) található ismert humán miRNS szekvenciákra illesztettünk.

Összehasonlítottuk a különböző szövettani csoportba tartozó betegek plazmamintáit, és 29 olyan miRNS-t azonosítottunk, amely alapján elkülöníthetők a különböző csoportok (**3. ábra/a**). Érdekes módon az egészséges és a betegektől nyert preoperatív minták összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy az adenomás mintákban kevesebb volt a miRNS read, mint az egészségesekben ($1,3 \times 10^6$ vs. $2,3 \times 10^6$; $p=0,0392$).

IV.2.1.2. *Plazma isomiR-ek összehasonlítása a különböző csoportokban*

Az újgenerációs szekvenálás – a korábban miRNS elemzésre használt módszerekkel ellentétben – lehetőséget nyújt a miRNS-ek különböző izoformáinak (isomiR-ek) azonosítására is.

A plazmamintákban detektált miRNS-ek 46,2%-a isomiR szekvencia volt, az 53,8%-ban jelen levő, tökéletesen illeszkedő (egzakt) miRNS-ek mellett, amely jól mutatja az isomiR-ek jelentőségét. Ebből 40,6% 3p isomiR volt, az 5p és SNP isomiR-ek mindössze 1,6%-ot és 1,2%-ot képviseltek, míg 2,8% többféle variációt is tartalmazott.

Összehasonlítottuk a különböző mintacsoportokat, és 11 olyan isomiR-t találtunk, amelynek megoszlása eltért a különböző típusú plazmákban (**3. ábra/b**). Az 5p isomiR-eket tekintve a miR-140-3p gyakorisága szignifikánsan eltért a GH+ és az egészséges minták között ($p=0,025$). A miR-1-3p SNP isomiR-ek pedig nagyobb mennyiségben fordultak elő a GH+, mint az FSH/LH+ ($p=0,015$) és a HN ($p=0,008$) plazmákban. Az egyik ilyen SNP isomiR (**4. ábra, #6**) csak a HN mintákban fordul elő, a többi csoportban egyáltalán nem. A miR-184 3p isomiR-ek gyakoriságában szignifikáns különbség

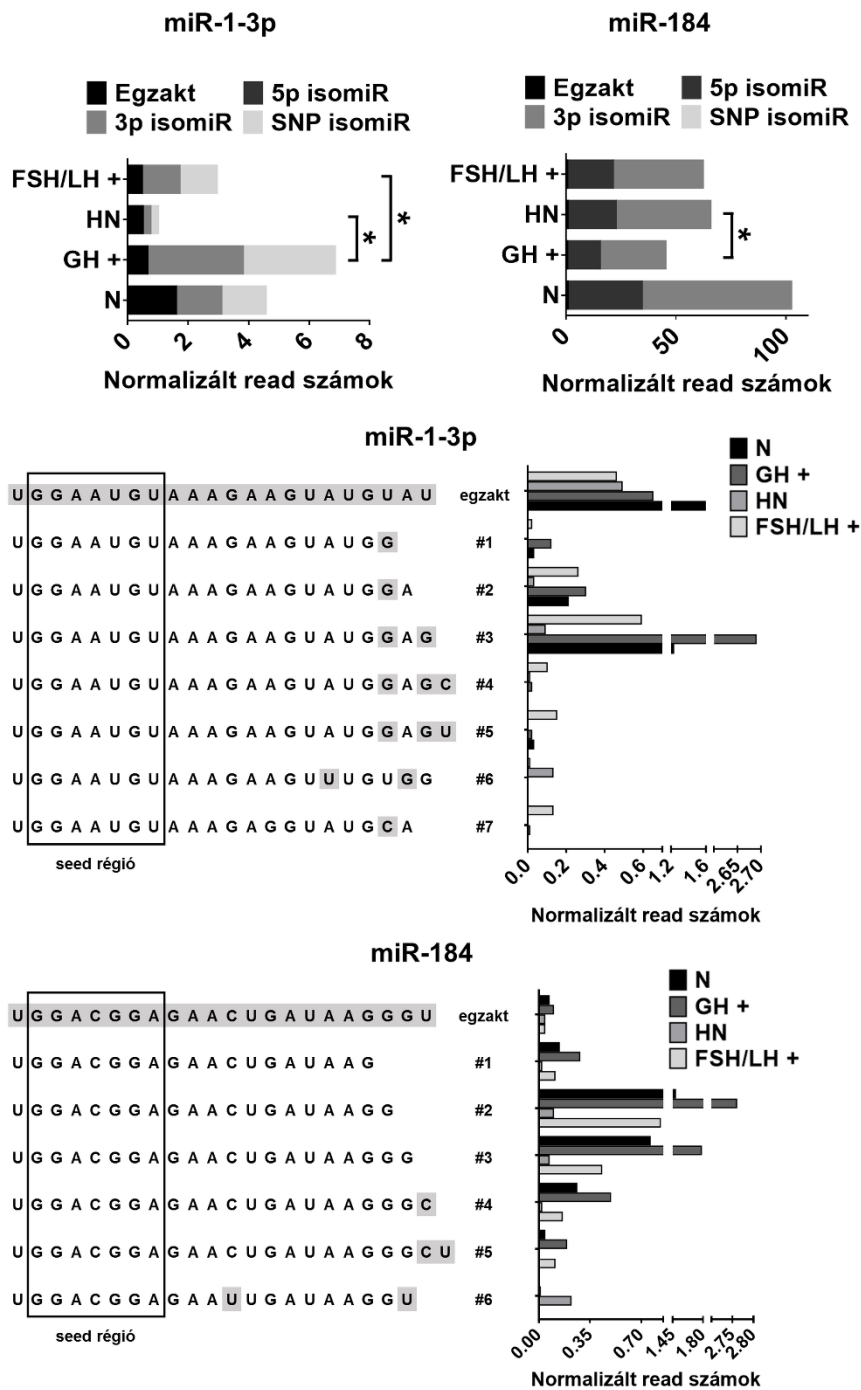
mutatkozott a GH+ és HN plazmák között ($p=0,013$) (**4. ábra**). Érdekes módon a miR-184 egyik ilyen variánsa (**4. ábra, #6**) csak a HN plazmákban fordult elő. Ez a variáns a szekvencia 3' végén rövidebb, mint az egzakt miRNS, és két egy pontos nukleotid variánst is hordoz. A HN mintákban ez a jellegzetes isomiR teszi ki a miR-184 isomiR-ek 48%-át.

IV.2.1.3. Hypophysis adenoma specifikus miRNS-ek

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

Az elérhető irodalmi adatokból kigyűjtöttük azon tanulmányokat, melyek NFPA vagy GHPA és NH szövetek miRNS mintázatát vizsgálták. Az NFPA minták esetében négy (Bottoni és mtsai 2007a; Butz és mtsai 2011a; Cheunschon és mtsai 2011; Liang és mtsai 2013), a GHPA szövetekről pedig három ilyen tanulmány állt rendelkezésre (Cheunschon és mtsai 2011; D'Angelo és mtsai 2012; Mao és mtsai 2010a). Ezeket egészítettük ki a saját mérésünkkel, melyben 6 GHPA és 5 NH szövet miRNS expressziós profilját vizsgáltuk TLDA kártyával.

Kiválasztottuk azokat a miRNS-eket, amelyek legalább két vizsgálatban egyforma irányú expresszió változást mutattak az adenomás mintákban (**5. és 6. táblázat**). Az NFPA mintákban 31 ilyen miRNS volt, melyek közül 22 fordult elő a plazmamintákban, és 3 (a miR-10b-5p, a miR-182-5p és a miR-26a-2-3p) szintje mutatott ugyanolyan irányú különbséget az FSH/LH+ és HN csoportokban a normális plazmához képest, mint a preoperatív mintákban a posztoperatívokhoz képest (**5. táblázat**). A GHPA szöveteket tekintve 7 olyan miRNS-t találtunk, melyek expressziója azonos irányba változott legalább két tanulmányban. Ezek közül 5 fordult elő a plazmamintákban, és ebből három, a miR-29b-3p, a miR-432-5p és a miR-503-5p esetében tapasztaltunk ugyanolyan irányú kifejeződésbeli különbséget a preoperatív plazmában a posztoperatívhoz és a normálishoz képest, mint a tumoros szövetben az egészségeshez képest (**6. táblázat**). Közös jellemzőjük ezeknek a szövetben és plazmában egyező irányú változást mutató miRNS-eknek, hogy a plazmában rendkívül alacsony mennyiségben voltak jelen.



4. ábra – A miR-1-3p és a miR-184 miRNS-ek esetében újgenerációs szekvenálással azonosított isomiR-ek megoszlása a preoperatív és egészséges plazmamintákban – Bal felül: Az SNP isomiR-ek gyakorisága szignifikánsan eltér az FSH/LH+ és GH+ ($p=0,015$) valamint a HN és a GH+ plazmaminták között ($p=0,008$). Jobb felül: A 3p isomiR-ek gyakorisága szignifikáns különbséget mutatja a HN és GH+ plazmaminták között ($p=0,013$). N: egészséges plazma, GH+, FSH/LH+, HN: a nevezett szövettani típusú hypophysis adenomával műtött betegek plazmamintái

5. táblázat – A nem-funkcionáló hypophysis adenoma szövetekben eltérően expresszálódó miRNS-ek vizsgálata a plazmamintákban – Az összehasonlításhoz irodalmi adatokból kigyűjtöttük azokat a miRNS-eket, amelyek legalább két tanulmány alapján eltérően expresszálódnak a nem-funkcionáló hypophysis adenomákban (NFPA) a normális hypophysis szövethez (NH) képest. Ezeket vetettük össze a pre- és posztoperatív plazmamintákban tapasztalt változásokkal. N: egészséges plazma, GH+, FSH/LH+, HN: a nevezett szövettani típusú hypophysis adenomával műtött betegek plazmamintái, FC: fold change, pre: preoperatív plazma, poszt: posztoperatív plazma

miRNS	NFPA vs. NH szövetek (relatív expresszió, FC)					Plazmaminták (FC)			
	Butz és mtsai 2011	Liang és mtsai 2013	Liang és mtsai 2013	Cheunschon és mtsai 2011	Bottoni és mtsai 2007	HN poszt vs. pre	HN pre vs. N	FSH/LH+ poszt vs. pre	FSH/LH+ pre vs. N
miR-10b-5p		5.6	2.5			-0.5	0.6	-0.2	1.2
miR-127-3p	-5.0			-0.8		0.6	-1.0	-0.4	-1.1
miR-136-5p	-6.8			-9.0	-0.7	0.0	-0.1	-0.3	0.7
miR-139-5p	2.4	1.8				-0.3	0.3	0.3	-0.2
miR-140-3p	1.5	1.6				0.6	-0.8	-0.2	-0.9
miR-182-5p	2.7		2.3			-0.2	0.1	-0.2	0.1
miR-191-5p	1.0				0.6	0.7	-0.9	0.0	-0.9
miR-199b-5p		-3.3	-3.2			0.1	0.3	-0.1	0.9
miR-24-3p	-1.3				-0.9	0.5	-0.7	-0.3	-0.3
miR-26a-2-3p	1.8				1.6	-0.8	1.5	0.4	1.2
miR-323a-3p	-4.3			-5.1		0.3	-1.1	-0.3	-1.3
miR-363-3p	-3.3	-2.7	-1.9			-0.5	-0.3	0.1	0.0
miR-369-3p	-6.5			-3.6		-0.8	-0.9	-0.5	-0.8
miR-369-5p	-4.4			-4.4		0.3	-1.1	-0.5	-0.7
miR-370-3p	-5.5			-1.8		0.5	-1.0	-0.3	-1.0
miR-376c-3p	-5.4			-4.7		-0.2	-1.1	0.1	-1.3
miR-424-5p	-4.6	-1.7	-1.7			0.2	0.8	0.3	0.4
miR-432-5p	-4.9			-3.9		0.7	-0.8	-0.4	-0.9
miR-433-3p	-4.7			-3.9		1.4	0.8	-0.1	0.6
miR-450a-5p	-2.2	-3.3	-2.1			-0.7	2.3	1.2	1.6
miR-493-3p	-5.8	-2.7	-2.1			0.5	-1.5	-0.2	-1.3
miR-503-5p	-5.7	-5.3	-4.2			0.2	0.0	0.1	-0.2
miR-149-5p	2.5				1.0	plazmában nem detektálható			
miR-20b-3p	-3.4	-4.5				plazmában nem detektálható			
miR-31-5p	-6.1		-4.4			plazmában nem detektálható			
miR-373	3.4		2.0			plazmában nem detektálható			
miR-410-3p	-6.3			-4.8		plazmában nem detektálható			
miR-506	-5.6	-4.3	-4.1			plazmában nem detektálható			
miR-508-3p	-5.1	-5.0	-3.1			plazmában nem detektálható			
miR-509-3p	-2.0	-4.1	-3.2			plazmában nem detektálható			
miR-513-3p	-2.2	-4.1	-3.8			plazmában nem detektálható			

6. táblázat – A GH termelő hypophysis adenomákban a normális hypophysis szövethez képest eltérően expresszálandó miRNS-ek összehasonlítása a plazmában talált eltérésekkel – Az irodalmi adatokat a saját szöveti mérésünkkel kiegészítve kiválasztottuk azokat a miRNS-eket, amelyek kifejeződése GHPA szövetekben legalább két vizsgálatban egyöntetűen változott a NH szövethez képest. Ezeket vetettük össze a pre- és posztoperatív plazmamintákban tapasztalt változásokkal. N: egészséges plazma, GH+, FSH/LH+, HN: a nevezett szövettani típusú hypophysis adenomával műtött betegek plazmamintái, FC: fold change, pre: preoperatív, poszt: posztoperatív

miRNS	GHPA vs. NH szövetek (relatív expresszió, FC)				Plazmaminták (FC)	
	D'Angelo és mtsai 2012	Mao és mtsai 2010	Saját mérésünk	Cheunsuchon és mtsai 2011	GH+ poszt vs. pre	GH+ pre vs. N
miR-29b-3p		1.3	2.8	<i>Nem volt közös miRNS a többi tanulmánnyal</i>	-0.2	0.8
miR-378a-3p		1.9	6.9		0.1	-1.5
miR-432-5p	-2.6		-6.2		0.3	-1.1
miR-503-5p		-1.1	-7.6		0.2	-0.6
miR-510-3p		-2.3	-9.7		-0.8	1.9
miR-657	-3.0	1.3			<i>plazmában nem detektálható</i>	
miR-801	-3.8	-1.6			<i>plazmában nem detektálható</i>	

IV.2.2. Pre-, és posztoperatív plazmában előforduló miRNS-ek összehasonlítása

Potenciális keringő miRNS biomarkerek azonosítása céljából megvizsgáltuk, hogy a preoperatív mintákhoz képest változik-e a betegek miRNS profilja közvetlenül (1-3 nappal) illetve 3 hónappal a tumor eltávolítása után.

IV.2.2.1. A preoperatív és késői posztoperatív mintapárok elemzése újgenerációs szekvenálással

Első lépésben az újgenerációs szekvenálással végzett miRNS profilozás alapján 18 beteg (4 GH+, 10 FSH/LH+, 4 HN) pre- és késői posztoperatív plazmapárjaiban hasonlítottuk össze a tumor eltávolítását követő miRNS szint változásokat.

A GH+ plazmapárok esetén 7, az FSH/LH+ párokban 3, míg a HN párokban 66 olyan miRNS-t találtunk, amelyek szintje szignifikánsan eltért a pre- és késői posztoperatív mintában ($p < 0,05$) (7. táblázat).

7.táblázat – A pre-, és késői posztoperatív mintákban szignifikánsan eltérő szintet mutató miRNS-ek – GH+, FSH/LH+, HN: a nevezett szövettani típusú hypophysis adenomával műtött betegek plazmamintái

miRNS	p-érték (párosított T-próba)	Fold change (késői poszt-, vs. preoperatív)
GH+ plazmapárokban		
miR-376a-3p	0.022	2.00
miR-150-5p	0.035	1.58
miR-144-5p	0.045	-1.89
FSH/LH+ plazmapárokban		
miR-4647	0.021	1.79
miR-143-3p	0.031	-1.66
miR-6514-3p	0.033	1.94
miR-3122	0.039	1.84
miR-101-5p	0.043	1.64
miR-6850-5p	0.045	2.19
miR-6867-5p	0.046	2.24
HN plazmapárokban		
miR-26b-5p	0.001	1.34
miR-4458	0.001	-3.17
miR-3928-5p	0.003	-3.13
miR-26a-1-3p	0.003	1.52
miR-6790-5p	0.006	-2.85
miR-143-3p	0.006	1.21
miR-6780b-3p	0.006	-2.43
miR-27a-3p	0.007	1.38
miR-126-5p	0.008	1.37
miR-190a-5p	0.010	1.47
miR-616-5p	0.012	-4.82
miR-450b-5p	0.012	-1.74
miR-10b-5p	0.012	-1.38
miR-148b-3p	0.013	1.35
miR-6752-3p	0.013	-3.55
miR-6846-5p	0.013	-4.40
miR-125a-5p	0.015	1.62
miR-6090	0.015	-2.56
miR-551b-5p	0.016	-3.36
miR-26a-5p	0.018	1.32
miR-195-5p	0.018	-1.34
miR-6715b-5p	0.019	-3.31
miR-1203	0.020	-2.08

miRNS	p-érték (párosított T-próba)	Fold change (késői poszt-, vs. preoperatív)
miR-6766-5p	0.020	-3.53
miR-99b-5p	0.021	1.65
miR-2115-3p	0.021	-3.86
miR-3193	0.021	-5.25
miR-4661-5p	0.021	-3.23
miR-943	0.022	-2.92
miR-4646-3p	0.023	-2.14
miR-140-5p	0.023	1.12
miR-5010-3p	0.024	-1.71
miR-589-3p	0.025	-2.79
miR-6764-5p	0.026	-2.33
miR-3124-5p	0.030	-2.06
miR-4729	0.031	-4.07
miR-3198	0.032	-1.70
miR-1226-3p	0.032	1.45
miR-125b-5p	0.032	1.20
miR-199a-5p	0.035	1.36
miR-24-3p	0.036	1.41
miR-4496	0.036	-2.09
let-7i-5p	0.036	1.34
miR-3187-3p	0.037	1.29
miR-339-3p	0.037	1.46
miR-126-3p	0.038	1.44
miR-3653-5p	0.038	-2.83
miR-3180-5p	0.038	-1.27
miR-6842-3p	0.040	1.30
miR-374a-3p	0.041	-1.95
miR-34b-3p	0.041	-2.21
miR-942-5p	0.042	1.20
miR-6748-5p	0.042	2.11
miR-98-5p	0.043	1.34
miR-488-5p	0.044	-3.66
miR-27b-3p	0.046	1.46
miR-647	0.046	-1.96
miR-331-5p	0.047	-2.15
miR-4782-5p	0.047	-2.59
miR-345-5p	0.048	1.56
miR-224-5p	0.049	1.37
miR-30a-5p	0.049	1.30
miR-7706	0.049	1.41

miRNS	p-érték (párosított T-próba)	Fold change (késői poszt-, vs. preoperatív)
miR-21-5p	0.049	1.10
miR-6843-3p	0.049	-1.55
miR-152-3p	0.050	1.70

IV.2.2.2. *Kiválasztott miRNS-ek validálása egyedi RT-qPCR-rel*

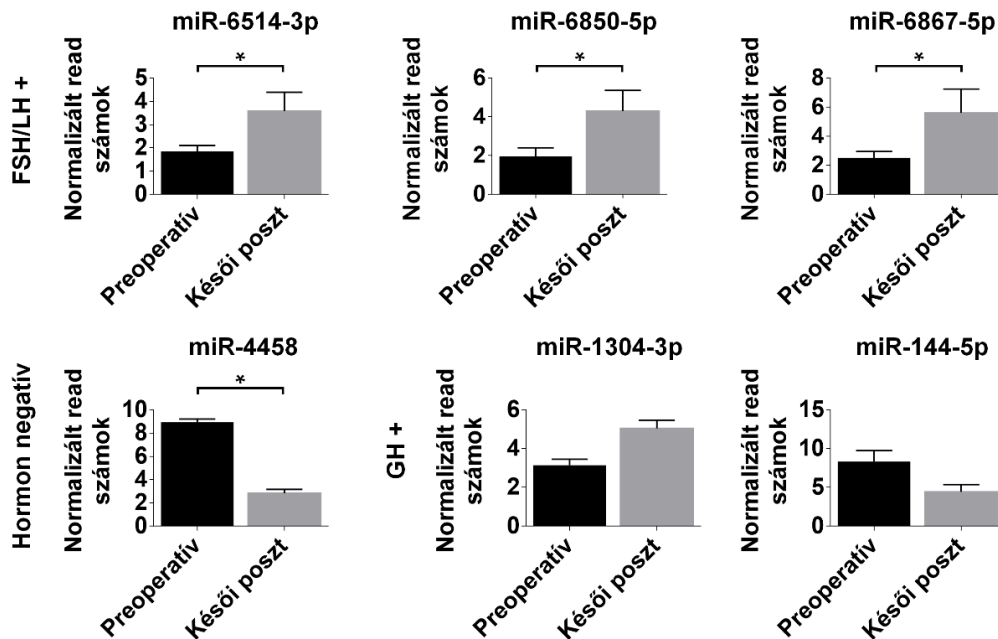
A validálás első lépéseként megvizsgáltuk, hogy az újgenerációs szekvenálással azonosított kevésbé abundáns miRNS-ek esetében melyek érik el azt a szintet, amelyek egyedi RT-qPCR-rel igazolhatók.

A normalizált read számok alapján 3 csoportot különböztettünk meg: <50, 50-100, és ≥ 100 . Az azonosított miRNS-ek megközelítőleg 75%-a tartozott az első csoportba, közel 8% a másodikba, és körülbelül 17% a legabundánsabbak közé. Ezutóbbiak közül 165 a GH+, 167 az FSH/LH+ és 170 a HN plazmákban fordult elő, tehát a különböző mintacsoportok között ebben nem tapasztaltunk lényeges eltérést. A validáláshoz mindhárom csoportból választottunk ki miRNS-eket.

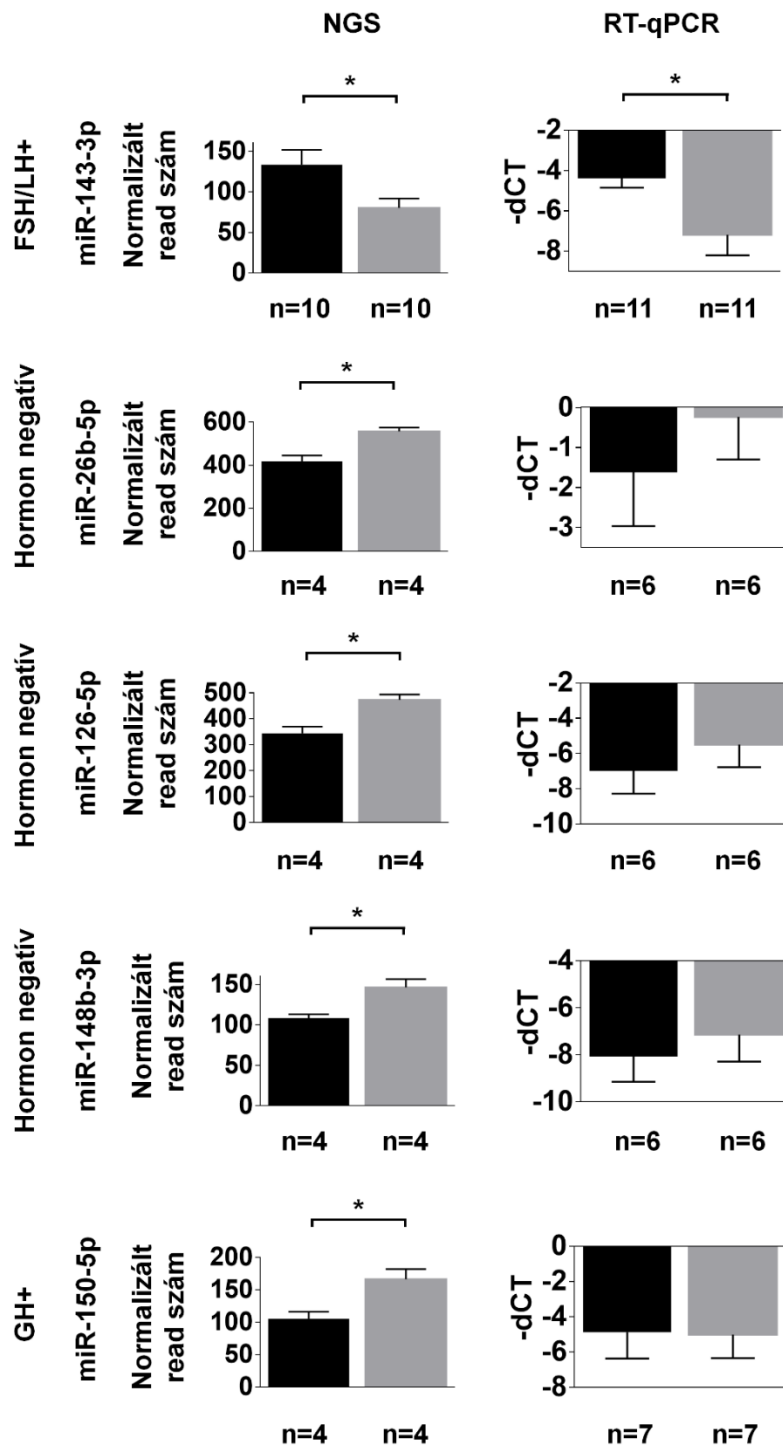
A plazmából izolált RNS-eket a kereskedelmi forgalomban elérhető legérzékenyebb, preamplifikációs lépést is tartalmazó reverz transzkripció eljárással cDNS-sé fordítottuk át, majd az egyedi miRNS expressziókat RT-qPCR-rel mértük. Azt tapasztaltuk, hogy a legkisebb tartományba (<50 read) tartozó miRNS-ek ezzel a méréssel nem voltak detektálhatóak. Az FSH/LH+ plazmapárokban a miR-6514-3p, a miR-6850-5p és a miR-6867-5p, a HN plazmákban a miR-4458, a GH+ plazmákban pedig a miR-1304-3p és a miR-144-5p tartozott ide (**5. ábra**).

A fenti eredmények azt mutatják, hogy az újgenerációs szekvenálás alapján szignifikánsan változó szintű miRNS-ek közül a kellően nagy (>50) normalizált read számmal rendelkezők azok, amelyek RT-qPCR technikával is megerősíthetők. Az FSH/LH+ plazmapárokban a miR-143-3p, a HN párokban a miR-26b-5p, a miR-126-5p és a miR-148b-3p, a GH+ plazmákban pedig a miR-150-5p felelt meg ezen kritériumoknak. A validálás során a korábbi mintaszettet további, független mintákkal is kiegészítettük. A vizsgált miRNS-ek közül a miR-143-3p szignifikánsan alacsonyabb szintjét tudtuk igazolni az FSH/LH+ késői posztoperatív plazmamintákban a preoperatív

párjaikhoz képest (párosított T-próba, $p=0,0097$). Bár a többi vizsgált miRNS (HN plazmapárokban a miR-26b-5p, a miR-126-5p, és a miR-148b-3p, a GH+ párokban pedig a miR-150-5p) esetében is az újgenerációs szekvenáláshoz hasonló eredményeket kaptunk (6. ábra), ezen esetekben az RT-qPCR-rel mért eredményekben a változás nem volt szignifikáns ($p>0,05$).



5.ábra – Az újgenerációs szekvenálás során kapott néhány alacsony (<50) normalizált read számú miRNS, melyek RT-qPCR-rel nem voltak kimutathatók – FSH/LH+, Hormon negatív, GH+: a nevezett szövettani típusú hypophysis adenomával műtött betegek plazmamintái, poszt: posztoperatív, FC: fold change, pre: preoperatív, poszt: posztoperatív, *: $p < 0,05$



6. ábra – Az újgenerációs szekvenálással a pre-, és késői posztoperatív mintapárookban kapott eredmények validálása RT-qPCR módszerrel – Az újgenerációs szekvenálás eredményei alapján olyan miRNS-eket választottunk ki validálásra, melyek szintje szignifikánsan eltért a késői posztoperatív plazmákban preoperatív párjaikhoz képest. FSH/LH+, Hormon negatív, GH+: a nevezett szövettani típusú hypophysis adenomával műtött betegek plazmamintái, FC: fold change, pre: preoperatív, poszt: posztoperatív, *: $p < 0,05$

IV.2.2.3. A miR-143-3p szintjének változása a tumor eltávolítását követően

Megvizsgáltuk az FSH/LH+ plazmapárokban szignifikáns változást mutató miR-143-3p szintjét a többi plazmacsoportban is, valamint kíváncsiak voltunk arra is, hogy a műtét után közvetlenül vett plazmában is csökken-e a miRNS szintje. Ezért amellet, hogy a felfedező (discovery) mintaszettünket további mintákkal egészítettük ki, a méréshez a pre-, és késői posztoperatív minták mellett korai posztoperatív mintákat is felhasználtunk. Ezen kívül olyan plazmamintákat is bevontunk a vizsgálatba, ahol a betegektől eltávolított adenomák az FSH/LH mellett más hormonra (PRL vagy TSH) is pozitívak voltak (plurihormonális adenomák). A felhasznált minták típusát és számát részletesen az alábbi táblázatban foglaltam össze (**8. táblázat**).

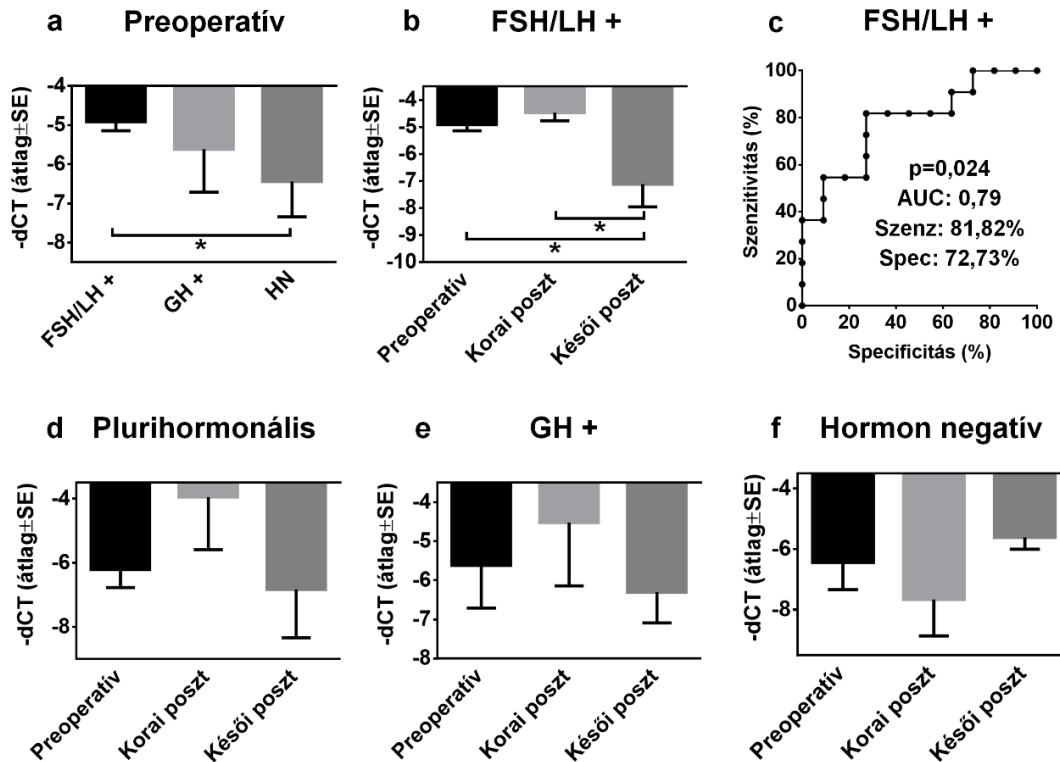
8.táblázat – A miR-143-3p szintjének RT-qPCR-rel való méréséhez felhasznált plazmaminták száma csoportonként – FSH/LH+, GH+, HN, plurihormonális: a nevezett szövettani típusú hypophysis adenomával műtött betegek plazmamintái

	Preoperatív	Korai posztoperatív	Késői posztoperatív
FSH/LH+	29	29	14
GH+	7	7	7
HN	6	6	6
plurihormonális	3	3	3

A preoperatív minták összehasonlítása során azt tapasztaltuk, hogy az FSH/LH+ plazmamintákban magasabb a miR-143-3p szintje, mint a GH+ és HN plazmákban (**7. ábra/a**), amely azt jelenti, hogy a fenti miRNS alapján az FSH/LH+ adenomával rendelkező betegek plazmamintája elkülöníthető a GH+ és HN adenomával rendelkezőkétől.

Megállapítottuk, hogy a GH+, a HN és a plurihormonális adenomák eltávolítása után a plazmában nem csökken a miR-143-3p szintje (**7. ábra/d-f**), ami jelzi a miR-143-3p szint csökkenésének specificitását a FSH/LH+ adenomás betegekre.

A korai posztoperatív plazmákban a miR-143-3p szintje nem változott szignifikánsan a preoperatív párjaikhoz képest (7. **ábra/d-f**), még az FSH/LH+ betegekénél sem (7. **ábra/b**). Ezutóbbi feltehetőleg annak köszönhető, hogy a miRNS-nek még nem volt ideje kiürülni a keringésből, és felhívja a figyelmet a mintavétel időpontjának fontosságára.



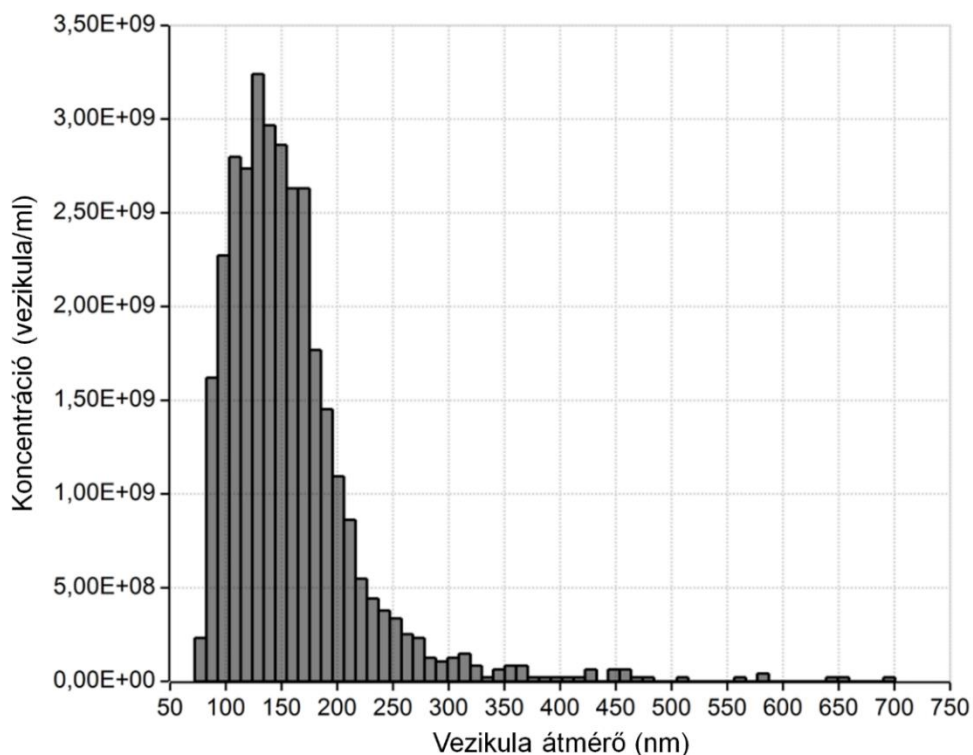
7. ábra – A miR-143-3p szintje a preoperatív valamint a korai és késői posztoperatív plazma mintákban – FSH/LH+, GH+, HN: a nevezett szövettani típusú hypophysis adenomával műtött betegek plazmamintái, poszt: posztoperatív, AUC: görbe alatti terület, szenz: szenzitivitás, spec: specificitás *: $p < 0,05$

Az, hogy a miR-143-3p szintje magasabb az FSH/LH+ adenomával rendelkező betegekben a többi adenomás beteghez képest, valamint az, hogy ez a szint a tumor eltávolítását követően lecsökken, felveti biomarkerként való használhatóságának lehetőségét, ezért ROC (Receiver Operating Characteristic) analízist végeztünk. Ennek eredménye alapján a miR-143-3p 81,8%-os szenzitivitással és 72,7% specificitással képes elkülöníteni a preoperatív és posztoperatív állapotot (AUC: 0,79, $p=0,024$; cut-off: $-dCT=-5,14$), vagyis jelezni az FSH/LH+ adenoma jelenlétét (7. **ábra/c**).

IV.2.2.4. Extracelluláris vezikula (EV) asszociált miRNS-ek

A keringő miRNS-ek gyakran extracelluláris vezikulákba (EV) csomagolva fordulnak elő a vérben. Irodalmi adatok alapján ezen vezikulák külön izolálása a plazmánál érzékenyebb forrás is lehet a miRNS biomarkerek elemzésére.

Az izolátumban az exoszómák jelenlétét 5-8 mintán tunable resistive pulse sensing (TRPS) módszerrel (**8. ábra**), majd áramlási citometriával az exoszómákra jellemző sejtfelszíni (CD) markerek jelölésével is igazoltuk (részletes leírását lsd. **III.3. fejezet**). Ezután vizsgáltuk, hogy azon miRNS-ek, melyek az újgenerációs szekvenálás során alacsony normalizált read számmal rendelkeztek, és feltehetően alacsony szintjük miatt RT-qPCR technikával plazmából nem sikerült detektálnunk, az EV frakcióból esetlegesen kimutathatók-e.



8. ábra – A plazmából izolált extracelluláris vezikulák jellemző méreteloszlása qNano készülékkel mérve

Azt tapasztaltuk, hogy azok a miRNS-ek, amelyeket a validálás során teljes plazmából nem sikerült detektálnunk (GH+ plazmákban: a miR-1304-3p, és a miR-144-5p, FSH/LH+ plazmákban: a miR-6514-3p, a miR-6850-5p és a miR-6867-5p, HN

plazmákban: a miR-4458), az exoszóma izolátumból sem voltak kimutathatóak. Ezzel összhangban, minden korábban észlelt miRNS az EV izolátumból is mérhető volt (GH+ plazmákban: a miR-150-5p, FSH/LH+ plazmákban: a miR-143-3p, HN plazmákban: a miR-26b-5p, a miR-126-5p, és a miR-148b-3p), viszont a teljes plazmából mért eredményekhez hasonlóan itt sem volt szignifikáns a különbség a műtét előtti és műtét utáni minták között. Érdekes módon, az EV frakcióban a miR-143-3p változása sem volt szignifikáns, még az FSH/LH+ plazmapárokban sem.

IV.3. Új terápiás lehetőségek keresése hypophysis adenomákban

IV.3.1. A survivin és a TRAIL expressziójának vizsgálata hypophysis adenoma szöveteken

Korábbi munkánk során 29 nem-funcionáló hypophysis adenoma (NFPA) és 10 normális hypophysis szövetben TLDA kártya segítségével vizsgáltuk az apoptózisban és a sejtciklusban szerepet játszó 46 gén expresszióját. Megállapítottuk, hogy a survivin kifejeződése fokozódott leginkább az adenomás szövetekben a normálishoz képest ($p=0,0004$, FC: 5,1) (Butz és mtsai 2017).

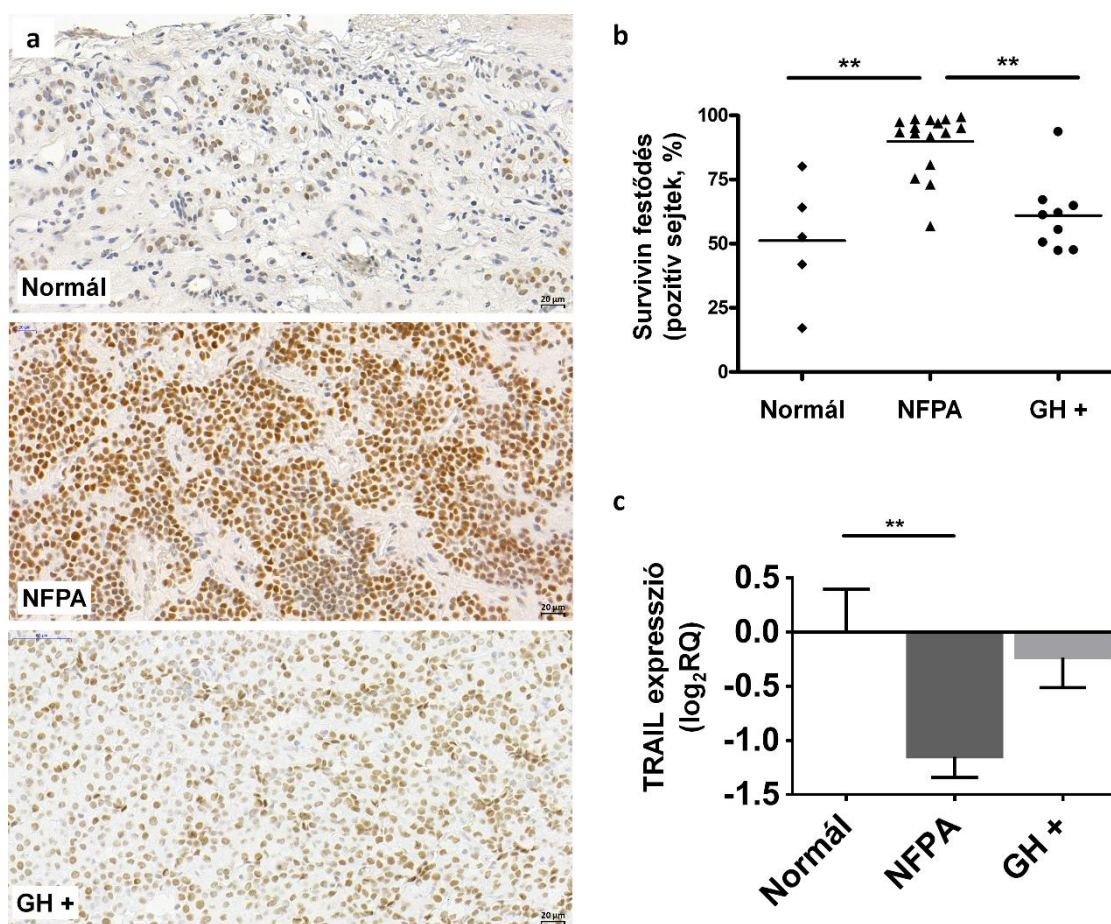
A fenti munkánkat egészítettük ki 12 GH termelő hypophysis adenoma szövet vizsgálatával, és azt tapasztaltuk, hogy az ép szövetekhez képest ezekben az adenomákban is emelkedett a survivin expressziója mRNS szinten ($p=0,0060$, FC: 4,4).

Ezután kíváncsiak voltunk arra, hogy ez a különbség fehérjeszinten is megmutatkozik-e, ezért immunhisztokémia segítségével vizsgáltunk 5 normális hypophysis, 16 nem-funcionáló és 9 GH termelő adenoma szövetet. Azt figyeltük meg, hogy kizárólag a sejtmagok jelölődtek a survivin antitesttel, a citoplazmában egyáltalán nem tapasztaltunk festődést. A survivin fokozottan expresszálódott az NFPA mintákban az egészségeshez képest ($p=0,025$). Egyúttal az is megállapítható volt, hogy az NFPA minták 76,9%-ában (13/16) magasabb volt a pozitív sejtek aránya, mint a normális szövetek bármelyikében **(9. ábra/a-b)**.

Érdekes módon, a szignifikánsan emelkedett mRNS szint ellenére a GH termelő adenomákban a survivin fehérje expresszió emelkedés nem bizonyult szignifikánsnak ($p>0,05$) **(9. ábra/a-b)**.

A survivin expresszió sem mRNS-, sem fehérjeszinten nem mutatott korrelációt a tumorok méretével vagy proliferációjával (Ki-67 index) egyik szövettani csoportban sem.

Emellett megvizsgáltuk egy másik, az apoptózisban fontos szerepet játszó molekula, a TRAIL kifejeződését is, amely már több daganattípusban is jó terápiás célpontnak mutatkozott. Azt tapasztaltuk, hogy a TRAIL expressziója szignifikánsan visszaesett az NFPA szövetekben a normálhoz képest ($p=0,0049$), míg a GH termelő adenomákban ez a csökkenés nem volt szignifikáns (9. ábra/c).



9. ábra – A survivin és a TRAIL expressziója hypophysis adenoma szöveteken – a) Reprezentatív képek a survivin fehérje immunhisztokémiai elemzéséről normális hypophysis, nem-funkcionáló (NFPA) és GH termelő hypophysis adenomában. **b)** Az immunhisztokémiai festés alapján a survivin pozitív sejtek aránya a mintacsoportokban. **c)** Az RT-qPCR módszerrel (TLDA kártyával) mért TRAIL mRNS expresszió normális hypophysis ($n=10$), NFPA ($n=29$) és GH termelő ($n=12$) hypophysis adenomákban. **: $p<0,01$ (Németh és mtsai 2018a)

IV.3.2. A TRAIL indukált apoptózis vizsgálata *in vitro* hypophysis adenoma sejtvonalon

Kíváncsiak voltunk arra is, hogy a szövetekben csökkent expressziójú TRAIL-t rekombináns fehérje formájában hypophysis adenoma sejtekhez adva indukálható-e apoptózis. Azt tapasztaltuk, hogy a kezelés nem csökkenti az RC-4 B/C sejtek életképességét, vagyis a sejtek TRAIL rezisztensek.

Más daganattípusokban kimutatták, hogy az emelkedett survivin expresszió összefüggésben lehet a TRAIL rezisztenciával, és a survivin gátlása önmagában, vagy a TRAIL kezeléssel kombinálva indukálhatja a tumorsejtekben az apoptózist. Ezért megvizsgáltuk, hogy az acetil-szalicilsav (ASA) kezelés – amely irodalmi adatok alapján képes gátolni a survivint, és érzékenyíteni a TRAIL rezisztens sejteket – milyen hatással van a hypophysis adenoma sejtekre.

Azt figyeltük meg, hogy az ASA+TRAIL kezelés nem csökkentette jobban az életképességet, mint az ASA kezelés önmagában, vagyis az előkezelés nem tudta érzékenyíteni az RC-4 B/C hypophysis adenoma sejteket a TRAIL-re. A kontrollként alkalmazott szintén TRAIL rezisztens HeLa sejteket – az irodalmi adatoknak megfelelően – 24 órás ASA előkezeléssel sikeresen érzékenyítettük a TRAIL kezelésre.

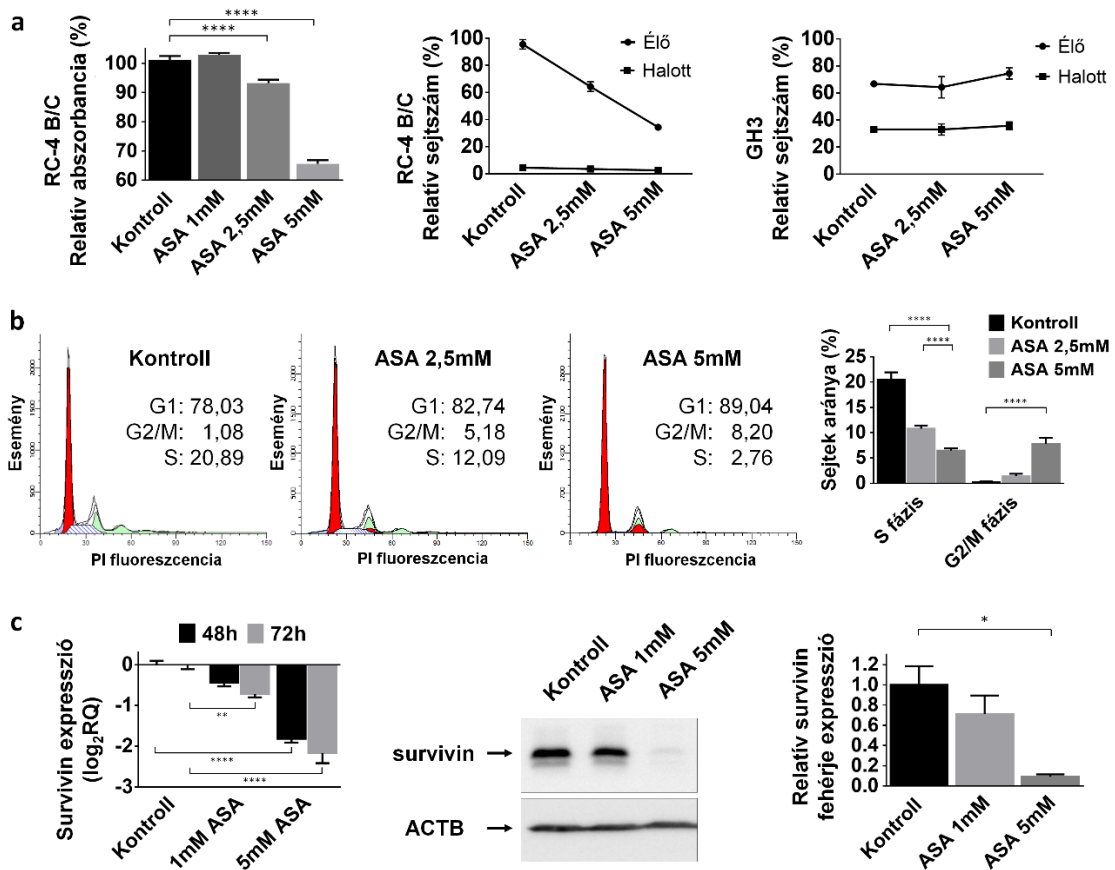
IV.3.3. Az acetil-szalicilsav hatásának vizsgálata *in vitro* hypophysis adenoma sejtvonalakon

IV.3.3.1. Az acetil-szalicilsav hatása a sejtek életképességére és az apoptózisra

Az ASA hatását tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy a 48 és 72 órás ASA kezelés önmagában képes csökkenteni az RC-4 B/C sejtek életképességét, még hozzá idő- és dózisfüggő módon (**10. ábra/a**), miközben a GH3 sejtekre egyáltalán nem volt hatással. Ez alapján a továbbiakban az RC-4 B/C sejtvonalat vizsgáltuk.

Ezután arra kerestük a választ, hogy az életképesség csökkenés hátterében az apoptózis indukciója áll-e. Ezért egyrészt trypan blue festéssel meghatároztuk az élő és halott sejtek arányát, másrészt propidium-jodid festést alkalmazva áramlási citometriával vizsgáltuk az apoptótizáló sejtek arányát.

Megállapítottuk, hogy az RC-4 B/C sejtek esetében az ASA az élő sejtek számát szignifikánsan csökkentette (2,5 mM: $64 \pm 10,8\%$, $p < 0,0001$; 5 mM: $44 \pm 3,9\%$, $p < 0,0001$), miközben a elpusztult sejtek száma nem növekedett (**10. ábra/a**). Az áramlási citometriás mérés eredménye alapján is azt tapasztaltuk, hogy az ASA kezelés hatására nem nőtt az apoptótizáló sejtek aránya. Ezen eredményeinket másik két módszerrel is meg kívántuk erősíteni. Az apoptózis assay során egy effektor kaspáz, a kaspáz-3 aktivitását mértük, amely egyértelmű jele az apoptózis indukálódásának, és azt figyeltük meg, hogy a kaspáz-3 aktivitása ASA hatására nem fokozódott. Mindemellett a DNS degradációs vizsgálat is alátámasztotta, hogy az apoptózis nem erősödik az ASA kezelt sejtekben.



10.ábra – Az ASA hatása in vitro hypophysis adenoma sejtvonalakon – a) A 72 órás 2,5 mM és 5 mM ASA kezelés hatása az életképességre, valamint az élő és halott sejtek számára az RC-4 B/C és GH3 sejteken. **b)** Az ASA kezelés sejtciklusra gyakorolt hatásának elemzése áramlási citometriával RC-4 B/C sejteken. **c)** A survivin mRNA és fehérje expressziójának változása ASA kezelés hatására RC-4 B/C sejteken. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$ (Németh és mtsai 2018a)

A GH3 sejtek esetében – az alamar blue kezeléshez hasonlóan – trypan blue festéssel is azt tapasztaltuk, hogy az ASA-nak nem volt hatása az élő és halott sejtek számára (10. ábra/a), így ezt követően csak az RC-4 B/C sejteket vizsgáltuk tovább.

IV.3.3.2. A survivin expressziójának változása acetyl-szalicilsav kezelésre

Bár az apoptózis nem indukálódott a vizsgált sejtvonalakban, kíváncsiak voltunk rá, hogy az ASA – más sejtvonalakhoz hasonlóan – itt is gátolja-e a survivin kifejeződését, amely egy lehetséges magyarázat az életképesség csökkenés mechanizmusára.

Kimutattuk, hogy az ASA idő-, és dózisfüggő módon csökkenti a survivin expresszióját mRNS- és fehérjeszinten egyaránt (10. ábra/c).

IV.3.3.3. Az acetyl-szalicilsav kezelés hatása a sejtciklusra

Mivel a survivin nemcsak az apoptózis gátlásában, hanem a sejtciklus szabályozásában is részt vesz, ezért feltételeztük, hogy a sejtszámcsökkenés hátterében a sejtciklus megváltozott működése állhat.

Ennek vizsgálata érdekében áramlási citometriával elemeztük a sejtciklust, és megállapítottuk, hogy az ASA csökkentette az S fázisban lévő (Kontroll: 20,5%, 2,5 mM: 10,8%, 5 mM: 6,5%), és növelte a G2/M fázisban lévő sejtek arányát (Kontroll: 0,2%, 2,5 mM: 1,4%, 5 mM: 7,8%) (10. ábra/b).

IV.3.4. Az acetyl-szalicilsav sejtszámcsökkentő hatásának hátterében álló mechanizmus vizsgálata

Miután megállapítottuk, hogy a hypophysis adenoma sejteken az ASA növekedésgátló hatását nem az apoptózis indukciója, hanem a sejtciklus gátlása révén fejti ki, és hogy ez együtt jár a survivin expressziójának csökkenésével, szeretnénk volna megvizsgálni, hogy van-e ok-okozati összefüggés, azaz az ASA hatását a survivin expresszió csökkenése révén fejti-e ki.

IV.3.4.1. A survivin gátlás hatása a hypophysis adenoma sejtekre

Első lépésben az YM155 kis molekula inhibitorral és két specifikus survivin siRNS-sel gátoltuk a survivin kifejeződését a hypophysis adenoma sejtekben. A gátlás hatékonyságát western blottal igazoltuk (**11. ábra/a-b**).

Az YM155 a farmakológiailag releváns koncentrációban csökkentette az RC-4 B/C sejtek proliferációját (**11. ábra/c**), ám a GH3 sejtekre nem volt hatással. Megjegyzendő, hogy ennél jóval magasabb koncentrációkban (25, 50, 100 μ M) a GH3 sejtek proliferációja is csökkent.

Érdekes módon, az survivin-specifikus siRNS-ek nem vetették vissza az RC-4 B/C sejtek életképességét (**11. ábra/d**), viszont trypan blue festéssel kimutattuk, hogy az élő sejtek számát az YM155 inhibitor és az siRNS-ek egyaránt csökkentették (**11. ábra/c-d**).

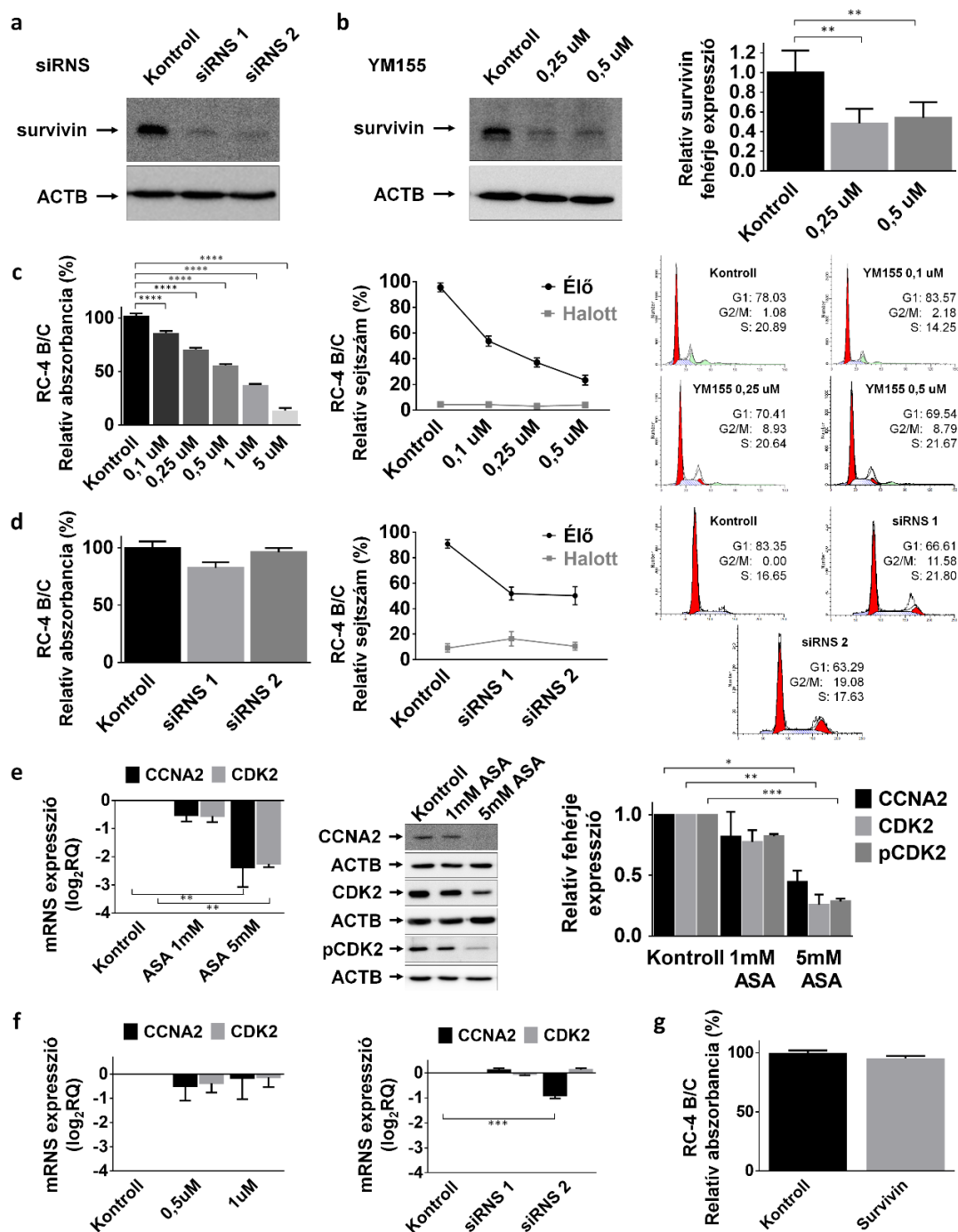
Ezután megvizsgáltuk, hogy a survivin specifikus gátlása hogyan hat a sejtciklusra. Azt tapasztaltuk, hogy – az ASA kezeléshez hasonlóan – mind az YM155 inhibitor, mind az siRNS kezelés növelte a G2/M fázisban lévő sejtek arányát, viszont az S fázisban lévő sejtek aránya – az ASA kezeléssel kísérletben megfigyeltekkel ellentétben – ezen kezelések hatására nem csökkent (**9. ábra/c-d**).

Ez a különbség az ASA kezelés és a specifikus siRNS gátlás között felvetette annak a lehetőségét, hogy az ASA-nak lehet a sejtciklusra egy másik, survivintől független hatása is.

IV.3.4.2. Az acetyl-szalicilsav kezelés survivin-független hatása a sejtciklusra

Az ASA survivintől független hatásának megértése érdekében megvizsgáltuk a sejtciklus S fázisában és annak átmeneteiben részt vevő ciklin A2 (CCNA2) és ciklin dependens kináz 2 (CDK2) kifejeződés változását az ASA kezelés hatására.

Azt tapasztaltuk, hogy az ASA kezelés mind a CCNA2, mind a CDK2 szintjét szignifikánsan csökkentette mRNA- és fehérjeszinten egyaránt (**11. ábra/e**). Emellett a foszfo-CDK2 (pCDK2) szintje is visszaesett, a CDK2 és a pCDK2 aránya azonban nem változott, vagyis a sejteken tapasztalt eltéréseket nem a CDK2 foszforilációja vagy defoszforilációja okozza.



11. ábra – A survivin gátlásának hatása *in vitro* RC-4 B/C hypopharynx adenoma sejteken – **a**) A survivin siRNS-sel való gátlásának igazolása western blottal. **b**) Az YM155 kis molekula inhibitorral való survivin gátlás igazolása western blottal. **c-d**) Az YM155 (**c**) és a survivin-specifikus siRNS (**d**) hatása a sejtek életképességére, az élő és halott sejtek arányára, és a sejtciklusra. **e**) A ciklin A2 (CCNA2) és a CDK2 mRNS és a CCNA2, CDK2 és foszfo-CDK2 (pCDK2) fehérje kifejeződésének csökkenése ASA kezelés hatására. **f**) A CCNA2 és CDK2 mRNS expressziója YM155 inhibitor és survivin siRNS kezelést követően. **g**) A survivint túlexpresszáló plazmid hatása a sejtek életképességére. *: $p < 0,05$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,001$ ****: $p < 0,0001$ (Németh és mtsai 2018a)

Azt is megállapítottuk, hogy az YM155 és az survivin-specifikus siRNS kezelések hatására a CCNA2, a CDK2 és a pCDK2 expressziója nem változott (**11. ábra/f**), ami jelzi, hogy az ASA-nak ezen hatása a survivin gátlásától független mechanizmus.

IV.3.4.3. A survivin túlexpresszáltatásának hatása a hypophysis adenoma sejtekre

Végül kíváncsiak voltunk arra, hogy ha növeljük a survivin expresszióját a sejtekben, akkor növekszik-e a sejtek proliferációja. Ennek vizsgálatához egy survivin-expresszálo plazmidot hoztunk létre, majd az RC-4 B/C sejtekbe transzfektáltuk. A survivin megnövekedett expresszióját western blottal, a transzfekció hatékonyságát pedig GFP-t tartalmazó vektorral igazoltuk.

Érdekes módon a survivin felülexpresszáltatása nem fokozta az RC-4 B/C sejtek proliferációját (**11. ábra/g**).

IV.3.5. Hypophysis adenoma xenograft modell létrehozása

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

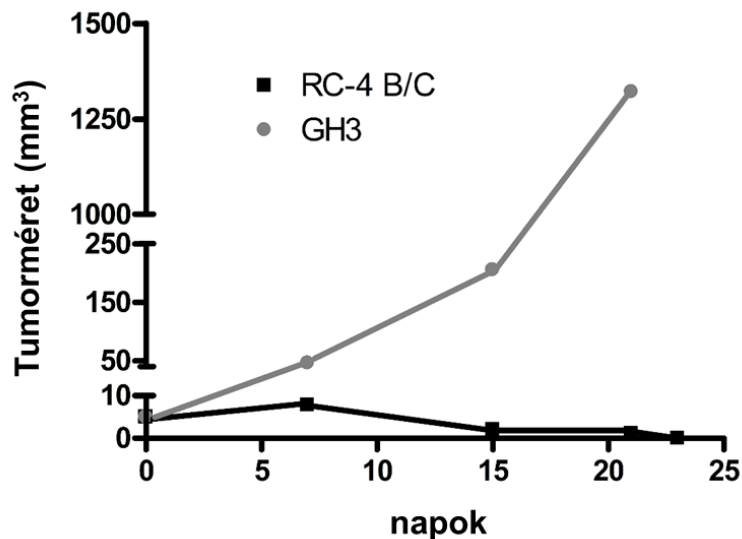
Kombinált immunhiányos (SCID) egerek bőre alá RC-4 B/C sejtszuszpenziót injektáltunk, és a tumorok megjelenését hetente ellenőriztük. Mivel semmilyen korábbi vizsgálatra nem támaszkodhattunk, többféle kondíciót próbáltunk ki.

Az első injektálásnál 100-100 μ l tápfolyadékban felfuszpendálva 5×10^6 , illetve 10^7 sejtet oltottunk 2-2 egérbe. Azt tapasztaltuk, hogy még három hét elteltével sem alakult ki semmilyen tapintható tumor.

Annak érdekében, hogy javítsuk a xenograft megmaradásának esélyét, 5×10^6 , 10^7 , és 2×10^7 sejtet 100-100 μ l szérumentes tápfolyadékban szuszpendáltunk, majd ezeket 1:1 arányban matrigellel kevertük, és így juttattuk az állatokba. A matrigel egy extracelluláris mátrixfehérjékben, és növekedési faktorokban gazdag gél állapotú anyag, amely segíti a xenograft megmaradását és a tumor kialakulását (Jensen és mtsai 1998).

Az 5×10^6 és 10^7 sejt esetében a háromhetes megfigyelési periódus alatt semmilyen tumorformálódás nem volt észlelhető. A 2×10^7 sejt esetében egy hét elteltével az injekció helyén egy 2,5 mm méretű képlet volt tapintható, amely a következő héten a felére zsugorodott, majd a harmadik hét végére teljesen felszívódott.

Az RC-4 B/C sejttel ellentétben a GH3 hypophysis adenoma sejtvonalból létrehozott xenograft modellről már rendelkezésre álltak szakirodalmi adatok (Ning és mtsai 2009), így pozitív kontrollként egy egerbe 10^7 GH3 sejtet tartalmazó, szintén matrigellel kevert sejtszuszpenziót injektáltunk. Az állatban egy hét után már 4,5 mm-es tumor jelent meg, amely a következő héten közel a duplájára nőtt, a harmadik hét végén pedig le is kellett ölni az állatot (12. ábra).



12. ábra – A tumorméret alakulása az RC-4 B/C és a GH3 sejtekből létrehozott xenograft állatokban (Németh és mtsai 2018a)

V. MEGBESZÉLÉS

A hypophysis adenomák gyakori, általában sporadikus megjelenésű intrakraniális tumorok, amelyek morbiditása – hormonális aktivitásuk és térfoglalásuk miatt – jelentős. A kialakulásuk és progressziójuk molekuláris hátterének pontosabb megismerése segítségünkre lehet a potenciális biomarkerek azonosítása és terápiás lehetőségek kidolgozása során (Asa és Ezzat 1998; Daly és mtsai 2006).

Munkám során megvizsgáltam a hypophysis adenoma szövetekben előforduló mitochondriális génvariánsokat és ezek összefüggését a tumorok klinikai adataival. Ezután hypophysis adenomás betegek plazmamintáit elemezve a korai diagnózist és klasszifikációt segítő keringő miRNS biomarkereket kerestem, végül pedig *in vitro* vizsgáltam a survivin mint lehetséges terápiás célpont gátlását, valamint az acetilszalicilsav kezelés hatását a survivin expresszióra és a sejtek életképességére.

V.1. Mitochondriális génvariánsok azonosítása és klinikai összefüggéseinek vizsgálata hypophysis adenomákban

Számos daganattípusban leírtak mitochondriális rendellenességeket és mutációkat a mitochondriális genomban, amelyek sok esetben összefüggést mutatnak a daganat viselkedésével.

Munkám során a hypophysis adenomák teljes mitochondriális genomját elemeztem újgenerációs szekvenálással, és olyan variánsok után kutattam, amelyek részt vehetnek a daganat kialakulásában, progressziójában vagy összefüggést mutatnak a klinikai adatokkal.

A szekvenálendő DNS könyvtár készítése a VariantProTM Mitochondria Panel kit segítségével történt, amelynek használatáról eddig mindössze 2 közlemény állt rendelkezésre (Dai és mtsai 2018; Li és mtsai 2016). Az egyikben – kutatócsoportunkhoz hasonlóan – a teljes mitochondriális genomot vizsgálták (Li és mtsai 2016), míg a másokban specifikus primerek segítségével meghatározott régiókat elemeztek (Dai és mtsai 2018). A fenti tanulmányokhoz hasonlóan azt tapasztaltuk, hogy az azonosított szekvenciáink túlnyomó többsége (95±1%-a) valóban a mitochondriális genomra illeszkedett, és igen magas lefedettségeket kaptunk. Emellett a Sanger szekvenálással

történt validálás során 100%-ban igazolni tudtuk az újgenerációs szekvenálással kapott eredményeinket, így megállapítható, hogy az általunk használt újgenerációs szekvenálás alapú módszer kiválóan alkalmazható a mitochondriális variánsok azonosítására.

A humán mitochondriális referencia szekvenciához képest összesen 496 variánst azonosítottunk a hypophysis adenomákban. Megfigyeltünk a szövettani típusokra jellemző variánsokat is. A variánsok nagy része alacsony heteroplazmiát mutatott, amely azonban nem korrelált a tumormérettel vagy a Ki-67 index-szel. Ez összhangban van a korábbi eredményekkel, miszerint a jóindulatú daganatokban általában alacsony a heteroplazmia, amely az agresszivitásra való hajlammal növekszik (Kloss-Brandstätter és mtsai 2015).

Korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan (Vega és mtsai 2004), a hierarchikus klaszteranalízis során a variánsok mintázata alapján nem különültek el a különböző típusú, eltérő Ki-67 index-szel rendelkező vagy a recidív/nem-recidív adenomák, viszont mindhárom szövettani csoportban a legnagyobb Ki-67 index-szel rendelkező minták hordozták a legtöbb variánst. Azonosítottunk emellett 8 olyan variánst, amelyek eltérő gyakoriságot mutattak a különböző szövettani csoportokban. Ezek közül 4 variáns (G185A, A188G, T16093C, T16126C) a D-loop régióban helyezkedett el. Mivel ennek, a fehérjét nem kódoló szakasznak a szerepéről keveset tudunk, a fenti variánsok jelentőségének értelmezése nehéz. Ennek ellenére egyre több vizsgálat mutatja, hogy ezen variánsoknak szerepe lehet egyes daganatok, mint az emlőrák (Ye és mtsai 2010), a gyomorrák (Y.-B. Zhao és mtsai 2005), a tüdőrák és a veserák (Chatterjee és mtsai 2011) patogenezisében, míg más kutatások azt találták, hogy a szájüregi rákok esetén a D-loop régióban azonosított variánsok a kedvező túléléssel mutattak összefüggést (Lin és mtsai 2015). Ez alapján a D-loop variánsainak tumorigenezisben betöltött szerepe daganattípusonként és variánsoként nagyon eltérő (akár ellentétes) lehet, melyek megismerése további funkcionális vizsgálatokat igényel (Chatterjee és mtsai 2011).

Munkánk során egy olyan variánst (T16189C) is azonosítottunk, amely csak a nem-recidív adenomákban fordult elő, a recidívákból teljesen hiányzott. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a variáns hypophysis adenomákban összefügg a tumorok jóindulatú viselkedésével. Sajnos a recidív daganatok esetében nem volt lehetőségünk a primer tumor elemzésére, más vizsgálatokban azonban szájüregi rákok esetében azt tapasztalták,

hogy a primer és a recidív tumorok azonos variánsokat hordoztak, mindössze a heteroplazmia szintje volt eltérő (Kloss-Brandstätter és mtsai 2015).

A másik négy, kódoló régióban elhelyezkedő variáns (T14798C, T4216C, C15452A, A11251G) a citokróm b (CYB), a NADH-dehidrogenáz 1 (ND1) és a NADH-dehidrogenáz 4 (ND4) génekben volt jelen. A citokróm b a Légzési Komplex III (citokróm bc₁ komplex) egyetlen olyan alegysége, amely a mitochondriumban kódolódik, és elengedhetetlen a komplex összeállításához (di Rago és mtsai 1993; Rana és mtsai 2000). Ráadásul kimutatták, hogy a Légzési Komplex I összeállításához is elengedhetetlen a Légzési Komplex III megfelelő szerveződése (Bruno és mtsai 2003; Budde és mtsai 2000). A T14798C variánst korábban invazív húgyhólyagrakkal kapcsolatban is leírták (Guney és mtsai 2012). Az ND1 gén variánsai pedig többféle rendellenességgel, mint a többszörös vetéléssel (Colagar és mtsai 2013), a vastagbélrákkal (Akouchejian és mtsai 2011), a húgyhólyagrakkal (Guney és mtsai 2012) és a Parkinson kórral (Kirchner és mtsai 2000; Swerdlow és mtsai 2006) is összefüggést mutattak. Ezenkívül az *ND1* gén variánsainak lehetséges szerepe szklerózis multiplex (Andalib és mtsai 2016) és Leber-féle optikus atrophia esetében (Brown és mtsai 1992; Howell és mtsai 1995; Johns és Berman 1991) is felmerült. Az *ND4* génben lévő variánsokat összefüggésbe hozták a makuladegenerációval (Restrepo és mtsai 2015), a Leber-féle optikus neuropátiával (Wallace és mtsai 1988), a temporális lebeny epilepsziával (Gurses és mtsai 2014) és a cisztikus fibrózissal (Valdivieso és mtsai 2007). Akut mieloid leukémiában egy *ND4* variáns jó prognózissal való összefüggését is igazolták (Damm és mtsai 2012), míg mások ugyanezen gén variánsairól kimutatták, hogy növelik a hasnyálmirigyrák kockázatát vagy szerepük van a ciszplatin rezisztencia kialakulásában (van Gisbergen és mtsai 2015).

Munkánkat megelőzően nem állt rendelkezésre olyan közlemény, amelyben a hypophysis adenomák teljes mitochondriális genomját vizsgálták volna. Egy tanulmányban hypophysis oncocytomákban, egy másikban pedig fej-nyaki tumorokban vizsgálták a Légzési Komplex I génjeinek variánsait (Kurelac és mtsai 2013; Porcelli és mtsai 2010). A hypophysis oncocytomákban 20 variánst azonosítottak (Porcelli és mtsai 2010), míg a fej-nyaki tumorokban 12 másikat (Kurelac és mtsai 2013). Érdekes módon a variánsok közül egyet sem találtak meg több, mint egy mintában. Ezen variánsok közül egyik sem

fordult elő az általunk vizsgált hypophysis adenoma mintákban, amely összhangban van a szerzők megállapításával, miszerint ezek kifejezetten az oncytás hypophysis tumorokra jellemzőek. Eredményeink alapján a hypophysis adenomákon belül is megfigyelhetők egy adott szövettani típusra jellemző variánsok.

Nem találtunk azonban olyan általánosan előforduló variánst, amelynek elsődleges szerepe lehet a daganatok kialakulásában, így az ennek háttérében álló mechanizmusok további vizsgálatokat igényelnek.

Tanulmányunkban elsőként írtuk le a hypophysis adenomákban előforduló mitochondriális variánsokat, ám az említett, alapvetően oncocytomákkal foglalkozó vizsgálatban (Kurelac és mtsai 2013) 19 GH/PRL+ hypophysis adenoma mintát is felhasználtak, és az általuk talált variánsok a HmtDB adatbázisból elérhetőek voltak (<http://www.hmtdb.uniba.it/>). Saját eredményeinket ezekkel összevetve 82 közös variánst találtunk, a mintáinkban azonosított 414 variáns viszont teljesen új volt. A hypophysis adenomák szövettani típusával, illetve recidív-nem recidív státuszával összefüggő variánsok patogenezisben betöltött lehetséges szerepét érdemes lenne nagyobb számú minta bevonásával vizsgálni.

V.2. Keringő miRNS-ek vizsgálata hypophysis adenoma biomarkerek azonosítása céljából

Az extracelluláris miRNS-ek, más testfolyadékokhoz (például vizelet, nyál) hasonlóan, a keringésben is igen stabilak, így kiváló nem-invazív biomarkerek lehetnek. Egyre több betegséggel kapcsolatban azonosítanak miRNS biomarkereket, melyek daganatos betegségekben is fontos diagnosztikus és prognosztikus markerként szolgálhatnak (Di Ieva és mtsai 2014a; Mitchell és mtsai 2008).

Munkám során céloom olyan miRNS biomarkerek azonosítása volt, melyek segíthetik a hypophysis adenomák korai diagnózisát és a tumor jellemzőinek prediktálását.

Mivel korábban semmilyen közlemény nem állt rendelkezésre a hypophysis adenomákkal kapcsolatban keringő miRNS-ekről, első lépésként újgenerációs szekvenálással megvizsgáltam a hypophysis adenomás betegek plazmájának miRNS profilját. Emellett az újgenerációs szekvenálással lehetőségünk volt az isomiR-ek vizsgálatára is. Azt

tapasztaltuk, hogy az egzakt miRNS-ek mellett az isomiR-ek alapján is elkülönültek a különböző típusú hypophysis adenomával rendelkező betegek (GH+, FSH/LH+, HN) és az egészséges (kontroll) plazmaminták. Megállapítottuk, hogy a plazmában azonosított szekvenciák 40,6%-át az isomiR-ek adják, amely jelzi a miRNS variánsok jelentőségét. Bár ezek pontos funkciójáról keveset tudunk, tumorszövetekben már leírták, hogy az egzakt miRNS-től eltérő target specificitásuk és funkciójuk lehet (Salem és mtsai 2016; Tan és Dibb 2015). Ez különösen az 5p isomiR-ekre igaz, ahol az 5' végen történő módosulás a target felismerésért felelős seed szekvenciát is érintheti. A seed régió – fontos funkciója révén – a miRNS-ek különösen konzervált része, és valószínűleg ennek köszönhető, hogy – a szakirodalmi adatoknak megfelelően – mintáinkban jóval több 3p, mint 5p isomiR-t azonosítottunk.

A miR-140-3p esetében az 5p isomiR-ek mennyisége szignifikánsan eltért a GH+ és az egészséges plazmaminták között. Érdekes módon a fenti miRNS isomiR-jeinek jelenlétét és feltételezett funkcionális jelentőségét méhnyálkahártyában és porcsejtekben már leírták (Haseeb és mtsai 2017; Krawczynski és mtsai 2015), a keringésben való jelenlétüket azonban nem vizsgálták. Az isomiR-ek jelentőségének megismerését nehezíti, hogy specifikus kimutatásuk, az egzakt miRNS és a többi isomiR szekvenciától való elkülönítésük nehéz (Schamberger és Orbán 2014). Bár újgenerációs szekvenálással jól detektálhatók, megbízható validálásuk nem megoldott.

Az újgenerációs szekvenálással a plazmában igen kis mennyiségben jelenlévő miRNS-ek is kimutathatók. A validálás során viszont megfigyeltük, hogy a <50 normalizált read számú miRNS-ek a miRNS mérésre aranystandardként alkalmazott RT-qPCR technikával nem detektálhatók, így biomarkerként való alkalmazhatóságuk egyelőre nem jön szóba.

Ezután a potenciális biomarkerek azonosítása céljából összehasonlítottuk a hypophysis adenomás betegek műtét előtti és műtét utáni plazmamintájának miRNS profilját. Megállapítottuk, hogy a miR-143-3p preoperatív szintje szignifikánsan magasabb az FSH/LH+ plazmamintákban, mint a többi szövettani csoportban, valamint hogy ez a tumor eltávolítását követően szignifikánsan csökken. Mindezek alapján a miR-143-3p egy ígéretes biomarker az FSH/LH+ adenomák esetében, a jelenség ugyanis kizárólag az FSH/LH+ plazmapárokra volt jellemző. Semelyik másik, érdekes módon még a

plurihormonális plazmákban (az FSH/LH mellett PRL vagy TSH pozitivitás) sem volt kimutatható. A miR-143-3p szintjének csökkenése az FSH/LH+ korai posztoperatív mintákban még nem, csak a késői posztoperatív mintákban jelentkezett, amely valószínűleg a korábban keringésbe került miRNS-ek kiürülési idejének köszönhető. Bár a tumor-asszociált miRNS-ek keringésben töltött idejét pontosan nem ismerjük, egy korábbi tanulmányban ezt megközelítőleg 14 napra becsülik (Heneghan és mtsai 2010). *Bala* és munkatársai (2015) állatmodelleken vizsgálták az exoszómális miRNS-ek fél-életidejét. Ehhez exoszómába csomagolt exo-miR-155 mesterséges oligonukleotidot juttattak miR-155 génkiütött (KO) állatba. Azt tapasztalták, hogy az intravénás beadás esetében a miRNS gyorsan, körülbelül 30 perc alatt eliminálódott, míg intraperitoneális injektálásnál több mint 4 óra elteltével is kimutatható volt a keringésben. Ez arra utalhat, hogy az általunk azonosított miR-143-3p inkább (hosszabb fél-életidejű) fehérjékhez kötve található a plazmában.

Az általunk pre- és késői posztoperatív mintákban különböző szintet mutató miRNS-ek jelenlétét vizsgáltuk az EV frakcióból is, mivel egyes tanulmányok szerint az EV-asszociált miRNS-ek ebben a frakcióban mérve jobb biomarkerek lehetnek. Azt tapasztaltuk azonban, hogy az EV frakcióból is ugyanazok a miRNS-ek bizonyultak kimutathatónak, mint amelyeket a teljes plazmában sikerült észlelnünk. Érdekes módon a pre- és késői posztoperatív mintákban eltérő szintű miR-143-3p az EV frakcióból mérve ezt a különbséget nem mutatta, ami szintén arra utalhat, hogy ez a miRNS elsősorban nem vezikula-asszociáltan, hanem más formában, például fehérjéhez vagy lipoproteinhez kötötten fordulhat elő.

Korábban több tanulmányban is kimutatták a miR-143-3p csökkent expresszióját tumoros szövetekben (Akao és mtsai 2006; Das és Pillai 2015; Liu és mtsai 2012; Michael és mtsai 2003; Wang és mtsai 2017), amely révén lehetséges tumor szuppresszor szerepe is felmerült (He és mtsai 2016; Sun és mtsai 2018), ám ezt a KO állatokkal végzett kísérletek nem erősítették meg (Dimitrova és mtsai 2016). Egy másik tanulmány szerint az ellentmondásos eredmények a vizsgált szövetek heterogenitásának köszönhetőek (Kent és mtsai 2014). Ismert, hogy a miRNS-ek szerepe szövetspecifikus lehet, így egyazon miRNS egy adott szövetben viselkedhet onkogénként, miközben egy másikban tumor szuppresszor funkciót tölt be (Fabbri és mtsai 2007). Többféle molekuláról – köztük

hormonokról is – leírták, hogy befolyásolhatják a miR-143-3p expresszióját tumorszövetekben (Das és Pillai 2015). Eger petefészekrák sejteken kimutatták, hogy az FSH gátolja a miR-143 expresszióját, amely magyarázhatja ezen miRNS alacsony kifejeződését az eger petefészekben (Yao és mtsai 2009). Egy másik vizsgálatban pedig az ER α miR-143-ra kifejtett gátló hatását igazolták gyomorrák sejteken (Feng és mtsai 2013).

Ezen felül a keringő miR-143-3p csökkent szintjét mutatták ki akut mieloid leukémiás és húgyhólyagrákos pácienseknél (Elhamamsy és mtsai 2017; Motawi és mtsai 2016). A miR-143 és miR-145 összefüggést mutat emellett az érlelmeszedéssel és a magas vérnyomással. Megfigyelték, hogy a fenti miRNS-ek serkentik a differenciációt és gátolják a proliferációt a vaszkuláris simaizomsejtekben (Boettger és mtsai 2009; Liu és mtsai 2017; Q. Zhang és mtsai 2017).

Amaral és munkatársai ACTH termelő hypophysis adenoma szövetekben vizsgálták a miR-143-3p expresszióját, amely szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult az egészséges hypophysis szövethez képest, de a tumorméret vagy a műtét utáni remisszió tekintetében nem találtak korrelációt (Amaral és mtsai 2009). Más tanulmányokban azonban nem kaptak különbséget a miR-143-3p expressziójában a különböző hormont termelő és nem-funkcionáló adenomákat szintén ép hypophysis szövethez hasonlítva (Bottoni és mtsai 2007b; Butz és mtsai 2011b; Liang és mtsai 2013; Mao és mtsai 2010b). Érdekes módon, Zhang és munkatársai is a miR-143-3p csökkent kifejeződését azonosították hypophysis adenomákban, és kimutatták, hogy *in vitro* túlexpresszáltatása a K-Ras onkogén gátlása révén csökkenti a sejtproliferációt (J. Zhang és mtsai 2017). Megjegyzendő, hogy ezutóbbi tanulmányban az adenomák szövettani típusát nem adták meg, a vizsgált sejtvonalak (GH3 és MMQ) viszont GH/PRL termelő sejtek voltak. A miR-143-3p megváltozott expressziójának háttérében álló mechanizmusokat egyetlen tanulmányban sem vizsgálták.

Arra is kerestük a választ, hogy a munkám során a plazmában azonosított miRNS-ek a hypophysis adenoma szövetből származhatnak-e, ezért összevetettük a szövetekben megváltozott expressziót mutató miRNS-eket azokkal, amelyek szintje megváltozott a tumor eltávolítását követően. Elképzelhető, hogy a tumorban fokozottan kifejeződő miRNS-ek a plazmában is emelkedett szintet mutatnak, amely ez alapján a tumor

eltávolítását követően várhatóan csökken. A keringő miRNS-ek eredetéről kevés kutatási eredmény áll rendelkezésre, ezért természetesen más mechanizmusok is elképzelhetők. Az általunk elemzett szöveti miRNS-ek nagyon alacsony szinten voltak jelen a plazmában, így a már említett validálási nehézségek miatt ezek biomarkerként nem használhatók. A posztoperatív plazmában a preoperatív párjaikhoz képest eltérő szintet mutató miRNS-ek esetében viszont nem volt olyan, ami eltérő kifejeződésű lenne a szövetekben. A fentiek alapján valószínűsíthető, hogy ezek a keringő miRNS-ek nem közvetlenül a hypophysis adenomákból származnak.

Lehetséges, hogy a keringő miRNS profil kialakításában hormonális hatások is részt vesznek. Még a klinikailag nem-funkcionáló adenomák is szekretálhatnak inaktív hormonokat vagy alegységeket, amelyeket a közönséges hormon assay-k nem tudnak detektálni.

Michaels és munkatársai felvetettek egy másik lehetőséget is annak nyomán, hogy a tumorszövetben megfigyelték, hogy a miR-143/miR-145 transzkripciója és érése nem tér el az egészséges szövetben tapasztalthoz képest. Azt feltételezték, hogy a keringésben megfigyelt eltérő miRNS szint annak köszönhető, hogy a tumorsejtek nagyobb mennyiségben bocsájtották ki és juttatták a keringésbe ezeket a miRNS-eket (Michael és mtsai 2003). Ezen eredmények alapján elképzelhető, hogy a keringő miR-143-3p emelkedett szintje az FSH/LH+ hypophysis adenomás betegekben a tumorsejtek erőteljesebb miRNS szekréciójának köszönhető. Az elmélet alátámasztására azonban további funkcionális vizsgálatok elvégzése szükséges.

V.3. Új terápiás célpontok keresése és *in vitro* vizsgálata hypophysis adenomákban

Munkám harmadik részében a hypophysis adenoma szövetek génexpressziós változásai alapján olyan molekuláris targeteket kerestem, melyek potenciális terápiás célpontok lehetnek a hypophysis adenomák kezelésében. Megállapítottuk, hogy mRNS szinten a survivin jelentősen magasabb expressziót mutatott a nem-funkcionáló és a GH termelő adenomákban is az egészséges hypophysishez képest, fehérjeszinten viszont ez csak a nem-funkcionáló adenomákban volt szignifikáns. Emellett kimutattuk, hogy a TRAIL kifejeződése szignifikánsan csökkent a nem-funkcionáló adenoma szövetekben.

A survivin egy, az apoptózisban és a sejtciklusban is szerepet játszó molekula, amely emelkedett expresszióját már számos tumorszövetben igazolták (Garg és mtsai 2016), és több esetben összefüggést találtak a survivin fokozott kifejeződése és a rossz prognózis között (Kong és mtsai 2017; Waligórska-Stachura és mtsai 2012b). Eredményeink összhangban vannak egy korábbi tanulmánnyal, amelyben szintén kimutatták a survivin megnövekedett expresszióját a hypophysis adenomákban (Jankowska és mtsai 2008). Vizsgálataink szintén azt igazolták, hogy a survivin fehérje a sejtmagban lokalizálódik. Ellentétes eredmények állnak rendelkezésre arról, hogy a survivin kifejeződése esetleg összefüggést mutat-e a hypophysis adenomák invazivitásával (Jankowska és mtsai 2008; Kong és mtsai 2017). Az általunk vizsgált mintákban nem találtunk korrelációt a survivin expresszió és a tumor tulajdonságai, mint a tumorméret és a Ki-67 index között.

Az emelkedett survivin és csökkent TRAIL expresszió alapján megállapítottuk, hogy ezek a molekulák – más daganattípusokhoz hasonlóan – hypophysis adenomákban is potenciális terápiai célpontok lehetnek, ezért ezeket *in vitro* hypophysis adenoma sejteken tovább vizsgáltuk.

Első lépésben humán rekombináns TRAIL segítségével szeretnénk volna indukálni az apoptózist, a sejtek azonban TRAIL rezisztensnek bizonyultak. A TRAIL rezisztencia egyik oka a survivin megnövekedett expressziója lehet (Azuhata és mtsai 2006; Yoo és Lee 2007), ezért a survivin gátlása céljából ASA előkezelést alkalmazva próbáltuk meg érzékenyíteni a sejteket a TRAIL kezelésre. Azt tapasztaltuk azonban, hogy ezen kombinált kezelésnek sem volt hatása a hypophysis adenoma sejtek életképességére.

Ezután tovább vizsgáltuk az ASA hatását, és kimutattuk, hogy idő-, és dózisfüggő módon képes csökkenteni a sejtek életképességét. Megállapítottuk, hogy a sejtszámcsökkenés hátterében nem az apoptózis indukciója, hanem a sejtciklus gátlása állhat. Ez összhangban van a szövetekben leírt sejtmagi lokalizációval: kimutatták ugyanis, hogy általában a citoplazmatikus survivin az apoptózis gátlásában, míg a nukleáris inkább a sejtciklus szabályozásában vesz részt (Garg és mtsai 2016).

Bár megfigyeltük, hogy az ASA kezelés hatására csökken a survivin kifejeződése, meg szeretnénk volna vizsgálni, hogy a tapasztalt antiproliferatív hatás valóban a survivin gátlásán keresztül valósul-e meg. Ennek érdekében elemeztük az YM155 és a survivin-

specifikus siRNS hatását ugyanezen sejtekre. Az YM155 egy survivint gátló kis molekula, amelynek terápiás jelentőségét már klinikai vizsgálatokban igazolták (Altieri 2013; Giaccone és mtsai 2009), és az ASA-hoz hasonlóan transzkripcionálisan gátolja a survivint. A survivin átíródásához ugyanis szükség van egy transzkripciós faktor komplex promóterhez való bekötődésére. Az YM155 az Sp1, míg az ASA az E2F1 transzkripciós faktort gátolja, így mindkét molekula megakadályozza a transzaktivációs komplex összeállítását, ezáltal a survivin transzkripcióját (Boidot és mtsai 2014; Yoo és Lee 2007). Mindazonáltal az ASA-ról is kimutatták, hogy vastagbélrák sejteken képes gátolni az Sp1 transzkripciós faktort is (Pathi és mtsai 2012).

Az YM155 és a survivin-specifikus siRNS az ASA kezeléshez hasonló hatást mutatott a hypophysis adenoma sejteken. Mindkét esetben sikeresen igazoltuk a survivin expresszió gátlódását, és azt tapasztaltuk, hogy az apoptózis indukciója nélkül csökkent a sejtek proliferációja. Megfigyeltük, hogy mindkét kezelés – az ASA-hoz hasonlóan – növelte a G2/M fázisban lévő sejtek arányát, viszont – az ASA-val ellentétben – az S fázisban lévő sejtek arányát nem csökkentette szignifikánsan. Ez felvetette annak a lehetőségét, hogy az ASA-nak van a survivintől független hatása is a sejtciklusra, ezért megvizsgáltuk az S fázisban és annak átmeneteiben szerepet játszó CCNA2 és CDK2 molekulák expresszióját. Megállapítottuk, hogy az ASA kezelés mindkét gén kifejeződését szignifikánsan csökkentette mRNS- és fehérjeszinten is. Emellett elemeztük a pCDK2 és a CDK2 arányát is, ami nem változott, vagyis az ASA kezelés a CDK2 foszforilációs állapotát nem befolyásolja. Eredményeink összhangban vannak egy korábbi kutatással, amelyben megállapították, hogy a survivin gátlása a sejtciklus G2/M fázisában leállította a sejtosztódást prosztatarák sejtekben (Kim és mtsai 2006). Mindezek alapján azt feltételezzük, hogy az ASA részben a survivin gátlásán, részben egy survivin-független útvonalon is hat. Eredményeinket korábbi vizsgálatokkal összevetve megállapíthatjuk, hogy az ASA hatása az apoptózisra és a sejtciklusra – a TRAIL-érzékenyítő szerepéhez hasonlóan – sejtípus specifikus (Bellosillo és mtsai 1998; Shiff és mtsai 1996; Zimmermann és mtsai 2000). Apoptózis indukáló hatásának mechanizmusára több elképzelés is létezik (Zimmermann és mtsai 2000), mint a kaspázok vagy a p38 aktiválása, a survivin, az NF-KB vagy a Bcl-2 gátlása (Kim és mtsai 2005; Lu és mtsai 2008; Zimmermann és mtsai 2000). Sejtciklust gátló hatásával is több molekulát és jelátviteli útvonalat is kapcsolatba hoztak (Li és mtsai 2018; Luciani és mtsai 2007),

ugyanakkor több sejttípusban is kimutatták, hogy az ASA antiproliferatív hatását részben vagy egészben a survivin gátlásán keresztül fejt ki (Jin és mtsai 2018; Yang és mtsai 2011).

Célkitűzéseink között szerepelt az ASA hypophysis adenomákra gyakorolt hatásának *in vivo* xenograft modellben való tanulmányozása is. A kereskedelmi forgalomban azonban sem humán, sem FSH/LH+ hypophysis adenoma sejtvonal nem kapható, sem gonadotrop hypophysis xenograft állatmodell nem áll rendelkezésre, ezért első lépésben ezt szerettünk volna létrehozni.

A különböző kondíciók kipróbálása ellenére az RC-4 B/C sejtek immunhiányos egerekbe injektálva nem formáltak tumorokat. Néhány korábbi tanulmányban vizsgáltak hypophysis adenoma terápiás lehetőségeket *in vivo* xenograft állatokon, ám ezen esetekben a GH3 patkány hypophysis adenoma sejteket használták, amelyek elsősorban a GH termelő adenomák modelljeként szolgálnak (Dai és mtsai 2013; Ning és mtsai 2009; Zubeldía-Brenner és mtsai 2019). Tekintve, hogy a survivin emelkedett expressziója és az ASA hatása a GH termelő adenomákban és sejtekben nem volt kimutatható, a fenti modell alkalmazása számunkra nem lett volna releváns. Mindazonáltal ezeket a sejteket pozitív kontrollként használva sikeresen hoztunk létre GH3 xenograftot, amellyel a technikai feltételek megvalósulását igazoltuk.

Eredményeink alapján elmondható, hogy mind az YM155, mind az ASA hatékony terápiás lehetőséget ígér a hypophysis adenomákban. Mindkét esetben felmerül azonban, hogy hatásukat nem kizárólag a survivin gátlása révén fejtik ki, így a háttérben álló molekuláris mechanizmusok pontos tisztázásához további vizsgálatok szükségesek. Bár az YM155 más betegségekkel kapcsolatos klinikai vizsgálatok során igen ígéretesnek tűnik (Clemens és mtsai 2015; Giaccone és mtsai 2009; Tolcher és mtsai 2008; Yamanaka és mtsai 2011), a gyógyszerkutatások, különösen a daganatellenes terápiák kidolgozása során gyakoriak a kedvezőtlen mellékhatások, így az ASA-nak mindenképp megvan az a hatalmas előnye, hogy aszpirin formájában régóta széleskörben alkalmazzák.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

Doktori munkám során végzett vizsgálataim eredményeként az alábbi következtetéseket vonhatjuk le:

1. Újgenerációs szekvenálás segítségével elsőként elemeztük a különböző típusú hypophysis adenomák teljes mitochondriális genomját. 414 új mitochondriális variánst sikerült azonosítanunk, melyek közül nyolc összefüggést mutatott a daganat szövettani típusával, egy pedig csak a nem recidív adenomákban fordult elő, a recidívákból teljesen hiányzott. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy szerepe van a kevésbé agresszív viselkedés kialakításában. Eredményeink alapján a mitochondriális genomban bekövetkező változások nem elsődleges tényezői a hypophysis adenomák kialakulásának.
2. Az általunk használt újgenerációs szekvenálás alapú módszer hatékonyan és megbízhatóan alkalmazható a mitochondriális variánsok azonosítására.
3. Elsőként vizsgáltuk a hypophysis adenomás betegek keringő miRNS és isomiR profilját. Megállapítottuk, hogy a betegek plazmájában összességében kevesebb miRNS fordul elő, mint az egészséges mintákban. Kimutattuk, hogy az azonosított miRNS-ek megközelítőleg 46%-a isomiR szekvencia volt, amely felhívja a figyelmet ezek jelentőségére. Igazoltuk, hogy a miRNS és az isomiR profil egyaránt alkalmas a különböző csoportba tartozó hypophysis adenomával rendelkező betegek és az egészségesek plazmamintáinak elkülönítésére.
4. Az újgenerációs szekvenálással való miRNS profillozás egy érzékeny mérés. A miRNS-ek mennyiségi meghatározásához az eredményeket mindig validálnunk kell, amihez aranystandardként a RT-qPCR technikát használjuk. Kimutattuk, hogy a nagyon kis mennyiségben (<50 read) jelen lévő miRNS-ek – bár újgenerációs szekvenálással detektálhatók – PCR alapú technikával nem erősíthetők meg, így – egyelőre – biomarkerként sem alkalmazhatók.
5. A preoperatív és posztoperatív plazmapárok miRNS profiljának összehasonlítása során megállapítottuk, hogy a miR-143-3p potenciális biomarkere a klinikailag nem-funkcionáló, FSH/LH+ hypophysis adenomáknak.

6. *In vitro* hypophysis adenoma sejteken kimutattuk, hogy az acetyl-salicilsav kezelés az apoptózis indukálása nélkül, a sejtciklus gátlásán keresztül csökkenti a sejtek életképességét. Megállapítottuk, hogy az antiproliferatív hatás hátterében részben a survivin, részben pedig a ciklin A2 és CDK2 molekulák transzkripcionális gátlása állhat. Vizsgáltuk továbbá az YM155 survivin inhibitor hatását ugyanezen sejteken, és megállapítottuk, hogy mind az acetyl-salicilsav, mind az YM155 ígéretes tumorelleses terápia szer lehet nem-funkcionáló hypophysis adenomák esetén.

VII. ÖSSZEFOGLALÁS

A gyakori előfordulású hypophysis adenomák kialakulása és progressziójuk molekuláris háttere kevésbé tisztázott. Mivel a nem-funkcionáló adenomák esetében jelenleg az egyetlen lehetőség a műtéti eltávolítás, melynek sikerességét alapvetően határozza meg a korai diagnózis felállítása, égető szükség van új biomarkerek azonosítására. Ezen felül a patogenezis pontosabb megértése lehetőséget nyújtana új terápiás lehetőségek kidolgozására is. A fentiek tükrében doktori munkám során a sporadikus hypophysis adenomák ezen három aspektusát vizsgáltam. Kutatásom első részében a hypophysis adenomák teljes mitochondriális genomját elemeztem újgenerációs szekvenálással, és vizsgáltam a variánsok tumorigenezisben betöltött lehetséges szerepét. Összesen 496, köztük 414 hypophysis adenomákban teljesen új variánst azonosítottam. Ezek közül nyolc összefüggést mutatott a tumor szövettani eredetével, melyek a *CYB* az *ND1*, *ND4* génekben, valamint a nem-kódoló régióban helyezkedtek el. A T16189C variáns pedig kizárólag a nem-recidív adenomákban fordult elő, a recidív adenomákból teljesen hiányzott, amely alapján szerepe lehet a tumorok jóindulatú viselkedésében. Ennek ellenére úgy tűnik, hogy a hypophysis adenomák kialakulását elsődlegesen nem a mitochondriális genomban bekövetkező változások okozzák. Munkám második részében elsőként vizsgáltam hypophysis adenomás betegek keringő miRNS és isomiR profilját. Megfigyeltem, hogy az azonosított miRNS-ek 46%-a isomiR szekvencia volt, ami felhívja a figyelmet ezek jelentőségére. A preoperatív és posztoperatív plazmapárok összehasonlításával megállapítottam, hogy a miR-143-3p potenciális biomarker a klinikailag nem-funkcionáló FSH/LH+ hypophysis adenomák esetében. Végül hypophysis adenoma szövetek génexpressziós eltérései alapján terápiás célpontokat azonosítottam, és ezek közül vizsgáltam a TRAIL és a survivin lehetséges szerepét. *In vitro* igazoltam, hogy a hypophysis adenoma sejtek rezisztensek a TRAIL kezelésre, és ezt a rezisztenciát az acetil-szalicilsav előkezelés sem oldja fel. Kimutattam, hogy az acetil-szalicilsav kezelés a sejtciklus gátlása révén csökkenti a hypophysis adenoma sejtek proliferációját, amely részben a survivin, részben a ciklin A2 és CDK2 molekulák transzkripcionális gátlásán keresztül valósul meg. Emellett az YM155 kis molekula a survivin gátlása révén szintén csökkentette a sejtosztódást. Mindezek alapján megállapítható, hogy mind az acetil-szalicilsav, mind az YM155 ígéretes terápiás lehetőség hypophysis adenomákban.

VIII. SUMMARY

Pituitary adenomas are common intracranial neoplasms. The molecular mechanism of their pathogenesis is largely unknown. Currently the first-line therapy of non-functioning pituitary adenomas (NFPAs) is surgical removal, however, due to the usually late diagnosis the total resection is often challenging. Thus, there is an urgent need to identify novel biomarkers and therapeutic approaches, which require the more appropriate understanding of their pathogenesis. During my work I focused on three aspects of pituitary adenomas related to its diagnosis, pathogenesis and feasible treatment. Firstly, I analysed the whole mitochondrial genome of pituitary adenoma samples using next-generation sequencing (NGS), and examined their potential role in tumorigenesis. Among the identified 496 genetic variants 414 were novel in pituitary adenomas. Eight showed correlation with the histologic type of the adenomas and were localized in CYB, ND1 and ND4 genes or in the D-loop region. Variant T16189C was found only in non-recurrent adenomas and absent from recurrent ones, thus it can be associated with benign behaviour. However, based on our results, mitochondrial variants are not the primary cause behind pituitary adenoma formation. Secondly, I examined the circulating miRNA and isomiR profile of pituitary adenoma patients for the first time. I obtained that 46% of miRNA sequences were isomiRs, which underlines their importance. Comparing preoperative and postoperative plasma pairs, miR-143-3p was identified as a potential biomarker of non-functioning FSH/LH+ pituitary adenomas. Finally, based on the gene expression changes of pituitary adenoma compared to normal pituitary tissues, I identified potential therapeutic target molecules. In vitro pituitary adenoma cells were resistant to TRAIL treatment which could not be overcome by acetylsalicylic acid (ASA) pretreatment. ASA was shown to inhibit cell cycle progression, thus reduce cell proliferation through the transcriptional inhibition of survivin, cyclin A2 and CDK2 molecules. YM155 survivin inhibitor small molecule reduced cell proliferation as well. Taken together, both ASA and YM155 were shown in vitro to be promising therapeutic applications in pituitary adenomas.

IX. IRODALOMJEGYZÉK

- Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. (2006) MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep*, 16: 845–850.
- Akouchekian M, Houshmand M, Akbari MHH, Kamalidehghan B, Dehghan M. (2011) Analysis of mitochondrial ND1 gene in human colorectal cancer. *J Res Med Sci*, 16: 50–55.
- Alexander JM, Biller BM, Bikkal H, Zervas NT, Arnold A, Klibanski A. (1990) Clinically nonfunctioning pituitary tumors are monoclonal in origin. *J Clin Invest*, 86: 336–340.
- Alrezk R, Hannah-Shmouni F, Stratakis CA. (2017) MEN4 and CDKN1B mutations: the latest of the MEN syndromes. *Endocrine-Related Cancer*, 24: T195–T208.
- Al-Shraim M, Asa SL. (2006) The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: what is new? *Acta Neuropathol*, 111: 1–7.
- Al-Shraim M, Asa SL. (2005) The 2004 World Health Organization classification of pituitary tumors: What is new? *Acta Neuropathol*, 111: 1–7.
- Altieri DC. (2013) Targeting survivin in cancer. *Cancer Lett*, 332: 225–228.
- Amaral FC, Torres N, Saggioro F, Neder L, Machado HR, Silva WA, Moreira AC, Castro M. (2009) MicroRNAs Differentially Expressed in ACTH-Secreting Pituitary Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94: 320–323.
- Andalib S, Emamhadi M, Yousefzadeh-Chabok S, Salari A, Sigaroudi AE, Vafae MS. (2016) MtDNA T4216C variation in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Acta Neurol Belg*, 116: 439–443.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290: 457–465.
- Asa SL, Ezzat S. (1998) The Cytogenesis and Pathogenesis of Pituitary Adenomas. *Endocrine Reviews*, 19: 798–827.
- Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokhi Z, Schwall RH. (1999) Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 104: 155–162.

- Aucher A, Rudnicka D, Davis DM. (2013) MicroRNAs transfer from human macrophages to hepato-carcinoma cells and inhibit proliferation. *J Immunol*, 191: 6250–6260.
- Azuhata T, Scott D, Griffith TS, Miller M, Sandler AD. (2006) Survivin inhibits apoptosis induced by TRAIL, and the ratio between survivin and TRAIL receptors is predictive of recurrent disease in neuroblastoma. *J Pediatr Surg*, 41: 1431–1440.
- Bagci-Onder T, Agarwal A, Flusberg D, Wanningen S, Sorger P, Shah K. (2013) Real-time imaging of the dynamics of death receptors and therapeutics that overcome TRAIL resistance in tumors. *Oncogene*, 32: 2818–2827.
- Bala S, Csak T, Momen-Heravi F, Lippai D, Kodys K, Catalano D, Sathishchandran A, Ambros V, Szabo G. (2015) Biodistribution and function of extracellular miRNA-155 in mice. *Sci Rep*, 5: 10721.
- Bangert A, Cristofanon S, Eckhardt I, Abhari BA, Kolodziej S, Häcker S, Vellanki SHK, Lausen J, Debatin K-M, Fulda S. (2012) Histone deacetylase inhibitors sensitize glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by c-myc-mediated downregulation of cFLIP. *Oncogene*, 31: 4677–4688.
- Bartel DP. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116: 281–297.
- Baysal BE, Ferrell RE, Willett-Brozick JE, Lawrence EC, Myssiorek D, Bosch A, van der Mey A, Taschner PE, Rubinstein WS, Myers EN, Richard CW, Cornelisse CJ, Devilee P, Devlin B. (2000) Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma. *Science*, 287: 848–851.
- Beckers A, Aaltonen LA, Daly AF, Karhu A. (2013) 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: 239–277.
- Bellosillo B, Piqué M, Barragán M, Castaño E, Villamor N, Colomer D, Montserrat E, Pons G, Gil J. (1998) Aspirin and salicylate induce apoptosis and activation of caspases in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*, 92: 1406–1414.
- Bibbins-Domingo K, U.S. Preventive Services Task Force. (2016) Aspirin Use for the Primary Prevention of Cardiovascular Disease and Colorectal Cancer: U.S. Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *Ann Intern Med*, 164: 836–845.

- Biomarkers Definitions Working Group. (2001) Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*, 69: 89–95.
- Boettger T, Beetz N, Kostin S, Schneider J, Krüger M, Hein L, Braun T. (2009) Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the *Mir143/145* gene cluster. *J Clin Invest*, 119: 2634–2647.
- Boidot R, Végran F, Lizard-Nacol S. (2014) Transcriptional regulation of the survivin gene. *Mol Biol Rep*, 41: 233–240.
- Bottoni A, Piccin D, Tagliati F, Luchin A, Zatelli MC, degli Uberti EC. (2005) miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*, 204: 280–285.
- Bottoni A, Zatelli MC, Ferracin M, Tagliati F, Piccin D, Vignali C, Calin GA, Negrini M, Croce CM, Degli Uberti EC. (2007a) Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: a possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*, 210: 370–377.
- Bottoni A, Zatelli MC, Ferracin M, Tagliati F, Piccin D, Vignali C, Calin GA, Negrini M, Croce CM, degli Uberti EC. (2007b) Identification of differentially expressed microRNAs by microarray: A possible role for microRNA genes in pituitary adenomas. *J Cell Physiol*, 210: 370–377.
- Brown MD, Voljavec AS, Lott MT, Torroni A, Yang CC, Wallace DC. (1992) Mitochondrial DNA complex I and III mutations associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Genetics*, 130: 163–173.
- Bruno C, Santorelli FM, Assereto S, Tonoli E, Tessa A, Traverso M, Scapolan S, Bado M, Tedeschi S, Minetti C. (2003) Progressive exercise intolerance associated with a new muscle-restricted nonsense mutation (G142X) in the mitochondrial cytochrome b gene. *Muscle Nerve*, 28: 508–511.
- Budde SM, van den Heuvel LP, Janssen AJ, Smeets RJ, Buskens CA, DeMeirleir L, Van Coster R, Baethmann M, Voit T, Trijbels JM, Smeitink JA. (2000) Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded NDUFS4 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 63–68.
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15: 269–290.

- Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Khan MM, Zivkovic V, Bálint K, Korbonits M, Rácz K, Patócs A. (2010) Down-regulation of Wee1 kinase by a specific subset of microRNA in human sporadic pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: E181-191.
- Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Korbonits M, Rácz K, Patócs A. (2011a) MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF β pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*, 14: 112–124.
- Butz H, Likó I, Czirják S, Igaz P, Korbonits M, Rácz K, Patócs A. (2011b) MicroRNA profile indicates downregulation of the TGF β pathway in sporadic non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*, 14: 112–124.
- Butz H, Németh K, Czenke D, Likó I, Czirják S, Zivkovic V, Baghy K, Korbonits M, Kovalszky I, Igaz P, Rácz K, Patócs A. (2017) Systematic Investigation of Expression of G2/M Transition Genes Reveals CDC25 Alteration in Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *Pathol Oncol Res*, 23: 633–641.
- Caimari F, Korbonits M. (2016) Novel Genetic Causes of Pituitary Adenomas. *Clin Cancer Res*, 22: 5030–5042.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 15524–15529.
- Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. (2010) Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney International*, 78: 838–848.
- Carew JS, Huang P. (2002) Mitochondrial defects in cancer. *Mol Cancer* 1: 9.
- Ceballos-Cancino G, Espinosa M, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. (2007) Regulation of mitochondrial Smac/DIABLO-selective release by survivin. *Oncogene*, 26: 7569–7575.
- Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Wu K, Fuchs CS. (2008) Aspirin dose and duration of use and risk of colorectal cancer in men. *Gastroenterology*, 134: 21–28.

- Chan AT, Ogino S, Fuchs CS. (2009) Aspirin use and survival after diagnosis of colorectal cancer. *JAMA*, 302: 649–658.
- Chandele A, Prasad V, Jagtap JC, Shukla R, Shastry PR. (2004) Upregulation of survivin in G2/M cells and inhibition of caspase 9 activity enhances resistance in staurosporine-induced apoptosis. *Neoplasia*, 6: 29–40.
- Chatterjee A, Dasgupta S, Sidransky D. (2011) Mitochondrial Subversion in Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4: 638–654.
- Chatterjee A, Mambo E, Sidransky D. (2006) Mitochondrial DNA mutations in human cancer. *Oncogene*, 25: 4663–4674.
- Chen L, Zhuang G, Li W, Liu Y, Zhang J, Tian X. (2008) RGD-FasL induces apoptosis of pituitary adenoma cells. *Cell Mol Immunol*, 5: 61–68.
- Chen X, Duan N, Zhang C, Zhang W. (2016) Survivin and Tumorigenesis: Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies. *J Cancer*, 7: 314–323.
- Cheunsuchon P, Zhou Y, Zhang X, Lee H, Chen W, Nakayama Y, Rice KA, Tessa Hedley-Whyte E, Swearingen B, Klibanski A. (2011) Silencing of the imprinted DLK1-MEG3 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Am J Pathol*, 179: 2120–2130.
- Chipman LB, Pasquinelli AE. (2019) miRNA Targeting: Growing beyond the Seed. *Trends Genet*.
- Clemens MR, Gladkov OA, Gartner E, Vladimirov V, Crown J, Steinberg J, Jie F, Keating A. (2015) Phase II, multicenter, open-label, randomized study of YM155 plus docetaxel as first-line treatment in patients with HER2-negative metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 149: 171–179.
- Colagar AH, Mosaieby E, Seyedhassani SM, Mohajerani M, Arasteh A, Kamalidehghan B, Houshmand M. (2013) T4216C mutation in NADH dehydrogenase I gene is associated with recurrent pregnancy loss. *Mitochondrial DNA*, 24: 610–612.
- Colao A, Grasso LF, Pivonello R, Lombardi G. (2011) Therapy of aggressive pituitary tumors. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 12: 1561–1570.
- Conway EM, Zwerts F, Van Eygen V, DeVriese A, Nagai N, Luo W, Collen D. (2003) Survivin-dependent angiogenesis in ischemic brain: molecular mechanisms of hypoxia-induced up-regulation. *Am J Pathol*, 163: 935–946.

- Dachineni R, Ai G, Kumar DR, Sadhu SS, Tummala H, Bhat GJ. (2016) Cyclin A2 and CDK2 as Novel Targets of Aspirin and Salicylic acid: a Potential Role in Cancer Prevention. *Mol Cancer Res*, 14: 241–252.
- Dai C, Zhang B, Liu X, Guo K, Ma S, Cai F, Yang Y, Yao Y, Feng M, Bao X, Deng K, Jiao Y, Wei Z, Junji W, Xing B, Lian W, Wang R. (2013) Pyrimethamine sensitizes pituitary adenomas cells to temozolomide through cathepsin B-dependent and caspase-dependent apoptotic pathways. *Int J Cancer*, 133: 1982–1993.
- Dai Y, Wang C, Nie Z, Han J, Chen T, Zhao X, Ai C, Ji Y, Gao T, Jiang P. (2018) Mutation analysis of Leber's hereditary optic neuropathy using a multi-gene panel. *Biomedical Reports*, 8: 51–58.
- Daly AF, Rixhon M, Adam C, Dempegioti A, Tichomirowa MA, Beckers A. (2006) High Prevalence of Pituitary Adenomas: A Cross-Sectional Study in the Province of Liège, Belgium. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 91: 4769–4775.
- Daly AF, Tichomirowa MA, Beckers A. (2009) The epidemiology and genetics of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23: 543–554.
- Damm F, Bunke T, Thol F, Markus B, Wagner K, Göhring G, Schlegelberger B, Heil G, Reuter CWM, Püllmann K, Schlenk RF, Döhner K, Heuser M, Krauter J, Döhner H, Ganser A, Morgan MA. (2012) Prognostic implications and molecular associations of *NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4)* mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 26: 289–295.
- D'Angelo D, Esposito F, Fusco A. (2015) Epigenetic Mechanisms Leading to Overexpression of HMGA Proteins in Human Pituitary Adenomas. *Front Med (Lausanne)*, 2: 39.
- D'Angelo D, Palmieri D, Mussnich P, Roche M, Wierinckx A, Raverot G, Fedele M, Croce CM, Trouillas J, Fusco A. (2012) Altered microRNA expression profile in human pituitary GH adenomas: down-regulation of miRNA targeting HMGA1, HMGA2, and E2F1. *J Clin Endocrinol Metab*, 97: E1128-1138.
- Das AV, Pillai RM. (2015) Implications of miR cluster 143/145 as universal anti-oncomiRs and their dysregulation during tumorigenesis. *Cancer Cell Int*, 15: 92.
- Decmann Á, Perge P, Nagy Z, Butz H, Patócs A, Igaz P. (2017) [Circulating microRNAs in the diagnostics of endocrine neoplasms]. *Orv Hetil*, 158: 483–490.

- Derry S, Loke YK. (2000) Risk of gastrointestinal haemorrhage with long term use of aspirin: meta-analysis. *BMJ*, 321: 1183–1187.
- Di Ieva A, Butz H, Niamah M, Rotondo F, De Rosa S, Sav A, Yousef GM, Kovacs K, Cusimano MD. (2014a) MicroRNAs as biomarkers in pituitary tumors. *Neurosurgery*, 75: 181–189; discussion 188-189.
- Di Ieva A, Rotondo F, Syro LV, Cusimano MD, Kovacs K. (2014b) Aggressive pituitary adenomas--diagnosis and emerging treatments. *Nat Rev Endocrinol*, 10: 423–435.
- di Rago JP, Macadre C, Lazowska J, Slonimski PP. (1993) The C-terminal domain of yeast cytochrome b is essential for a correct assembly of the mitochondrial cytochrome bc1 complex. *FEBS Lett*, 328: 153–158.
- Dimberg LY, Anderson CK, Camidge R, Behbakht K, Thorburn A, Ford HL. (2013) On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics. *Oncogene*, 32: 1341–1350.
- Dimitrova N, Gocheva V, Bhutkar A, Resnick R, Jong RM, Miller KM, Bendor J, Jacks T. (2016) Stromal Expression of miR-143/145 Promotes Neoangiogenesis in Lung Cancer Development. *Cancer Discov*, 6: 188–201.
- Dovizio M, Bruno A, Tacconelli S, Patrignani P. (2013) Mode of action of aspirin as a chemopreventive agent. *Recent Results Cancer Res*, 191: 39–65.
- Dworakowska D, Grossman AB. (2009) The pathophysiology of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 23: 525–541.
- Elhamamsy AR, El Sharkawy MS, Zanyat AF, Mahrous MA, Mohamed AE, Abushaaban EA. (2017) Circulating miR-92a, miR-143 and miR-342 in Plasma are Novel Potential Biomarkers for Acute Myeloid Leukemia. *Int J Mol Cell Med*, 6: 77–86.
- Elston MS, Gill AJ, Conaglen JV, Clarkson A, Shaw JM, Law AJJ, Cook RJ, Little NS, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, McDonald KL. (2008) Wnt pathway inhibitors are strongly down-regulated in pituitary tumors. *Endocrinology*, 149: 1235–1242.
- Evans CO, Brown MR, Parks JS, Oyesiku NM. (2000) Screening for MEN1 tumor suppressor gene mutations in sporadic pituitary tumors. *J Endocrinol Invest*, 23: 304–309.
- Ezzat S, Horvath E, Kovacs K, Smyth HS, Singer W, Asa SL. (1995) Basic Fibroblast Growth Factor Expression by Two Prolactin and Thyrotropin-Producing Pituitary Adenomas. *Endocr Pathol*, 6: 125–134.

- Fabbri M, Ivan M, Cimmino A, Negrini M, Calin GA. (2007) Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer. *Expert Opin Biol Ther*, 7: 1009–1019.
- Falschlehner C, Emmerich CH, Gerlach B, Walczak H. (2007) TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol*, 39: 1462–1475.
- Farazi TA, Hoell JI, Morozov P, Tuschl T. (2013) MicroRNAs in human cancer. *Adv Exp Med Biol*, 774: 1–20.
- Farrell WE. (2005) Epigenetic mechanisms of tumorigenesis. *Horm Metab Res*, 37: 361–368.
- Fedele M, Battista S, Kenyon L, Baldassarre G, Fidanza V, Klein-Szanto AJP, Parlow AF, Visone R, Pierantoni GM, Outwater E, Santoro M, Croce CM, Fusco A. (2002) Overexpression of the HMGA2 gene in transgenic mice leads to the onset of pituitary adenomas. *Oncogene*, 21: 3190–3198.
- Fedele M, Pentimalli F, Baldassarre G, Battista S, Klein-Szanto AJP, Kenyon L, Visone R, De Martino I, Ciarmiello A, Arra C, Viglietto G, Croce CM, Fusco A. (2005) Transgenic mice overexpressing the wild-type form of the HMGA1 gene develop mixed growth hormone/prolactin cell pituitary adenomas and natural killer cell lymphomas. *Oncogene*, 24: 3427–3435.
- Feng Z, Shangkun Z, Yan L, Ying C, Lijiang L. (2013) miR-143 is Associated with ER- α 36 Expression Gastric Carcinoma of Xenografted Model. *Journal of Biomimetics Biomaterials and Tissue Engineering*, 18: 117.
- Fernandez A, Karavitaki N, Wass JAH. (2010) Prevalence of pituitary adenomas: a community-based, cross-sectional study in Banbury (Oxfordshire, UK). *Clin Endocrinol (Oxf)*, 72: 377–382.
- Fernandez-Vizarra E, Bugiani M, Goffrini P, Carrara F, Farina L, Procopio E, Donati A, Uziel G, Ferrero I, Zeviani M. (2007) Impaired complex III assembly associated with BCS1L gene mutations in isolated mitochondrial encephalopathy. *Hum Mol Genet*, 16: 1241–1252.
- Fraser DM, Sullivan FM, Thompson AM, McCowan C. (2014) Aspirin use and survival after the diagnosis of breast cancer: a population-based cohort study. *Br J Cancer*, 111: 623–627.
- Fukuda S, Foster RG, Porter SB, Pelus LM. (2002) The antiapoptosis protein survivin is associated with cell cycle entry of normal cord blood CD34(+) cells and modulates

cell cycle and proliferation of mouse hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 100: 2463–2471.

- Gadelha MR, Kasuki L, Dénes J, Trivellin G, Korbonits M. (2013) MicroRNAs: Suggested role in pituitary adenoma pathogenesis. *J Endocrinol Invest*, 36: 889–895.
- Gamba CA, Swetter SM, Stefanick ML, Kubo J, Desai M, Spaunhurst KM, Sinha AA, Asgari MM, Sturgeon S, Tang JY. (2013) Aspirin is associated with lower melanoma risk among postmenopausal Caucasian women: the Women’s Health Initiative. *Cancer*, 119: 1562–1569.
- Ganten TM, Koschny R, Sykora J, Schulze-Bergkamen H, Büchler P, Haas TL, Schader MB, Untergasser A, Stremmel W, Walczak H. (2006) Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs. *Clin Cancer Res*, 12: 2640–2646.
- Garg H, Suri P, Gupta JC, Talwar GP, Dubey S. (2016) Survivin: a unique target for tumor therapy. *Cancer Cell Int*, 16: 49.
- Giaccone G, Zatloukal P, Roubec J, Floor K, Musil J, Kuta M, van Klaveren RJ, Chaudhary S, Gunther A, Shamsili S. (2009) Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 27: 4481–4486.
- Gillam MP, Molitch ME, Lombardi G, Colao A. (2006) Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocr Rev*, 27: 485–534.
- Green VL, White MC, Hipkin LJ, Jeffrey RV, Foy PM, Atkin SL. (1997) Apoptosis and p53 suppressor gene protein expression in human anterior pituitary adenomas. *Eur J Endocrinol*, 136: 382–387.
- Griffiths-Jones S. (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32: D109-111.
- Grinstein E, Jundt F, Weinert I, Wernet P, Royer H-D. (2002) Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene*, 21: 1485–1492.
- Guney AI, Ergec DS, Tavukcu HH, Koc G, Kirac D, Ulucan K, Javadova D, Turkeri L. (2012) Detection of mitochondrial DNA mutations in nonmuscle invasive bladder cancer. *Genet Test Mol Biomarkers*, 16: 672–678.

- Guo Y, Cai Q, Samuels DC, Ye F, Long J, Li C-I, Winther JF, Tawn EJ, Stovall M, Lähteenmäki P, Malila N, Levy S, Shaffer C, Shyr Y, Shu X-O, Boice JD. (2012) The use of next generation sequencing technology to study the effect of radiation therapy on mitochondrial DNA mutation. *Mutat Res*, 744: 154–160.
- Guo Y, Li C-I, Sheng Q, Winther JF, Cai Q, Boice JD, Shyr Y. (2013) Very low-level heteroplasmy mtDNA variations are inherited in humans. *J Genet Genomics*, 40: 607–615.
- Gurses C, Azakli H, Alptekin A, Cakiris A, Abaci N, Arikan M, Kursun O, Gokyigit A, Ustek D. (2014) Mitochondrial DNA profiling via genomic analysis in mesial temporal lobe epilepsy patients with hippocampal sclerosis. *Gene*, 538: 323–327.
- Guzzo MF, Carvalho LRS, Bronstein MD. (2014) Apoptosis: its role in pituitary development and neoplastic pituitary tissue. *Pituitary*, 17: 157–162.
- Hagemann S, Wohlschlaeger J, Bertram S, Levkau B, Musacchio A, Conway EM, Moellmann D, Kneiseler G, Pless-Petig G, Lorenz K, Sitek B, Baba HA. (2013) Loss of Survivin influences liver regeneration and is associated with impaired Aurora B function. *Cell Death Differ*, 20: 834–844.
- Haseeb A, Makki MS, Khan NM, Ahmad I, Haqqi TM. (2017) Deep sequencing and analyses of miRNAs, isomiRs and miRNA induced silencing complex (miRISC)-associated miRNome in primary human chondrocytes. *Scientific Reports*, 7: 15178.
- He Z, Yi J, Liu X, Chen J, Han S, Jin L, Chen L, Song H. (2016) MiR-143-3p functions as a tumor suppressor by regulating cell proliferation, invasion and epithelial–mesenchymal transition by targeting QKI-5 in esophageal squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*, 15: 51.
- Heijink DM, Jalving M, Oosterhuis D, Sloots IA, Koster R, Hollema H, Kleibeuker JH, Koornstra JJ, de Vries EGE, de Jong S. (2011) TNF-related apoptosis-inducing ligand cooperates with NSAIDs via activated Wnt signalling in (pre)malignant colon cells. *J Pathol*, 223: 378–389.
- Hellwig CT, Rehm M. (2012) TRAIL signaling and synergy mechanisms used in TRAIL-based combination therapies. *Mol Cancer Ther*, 11: 3–13.
- Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. (2010) Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg*, 251: 499–505.

- Hentschel SJ, McCutcheon Ian E, Moore W, Durity FA. (2003) P53 and MIB-1 immunohistochemistry as predictors of the clinical behavior of nonfunctioning pituitary adenomas. *Can J Neurol Sci*, 30: 215–219.
- Herman V, Fagin J, Gonsky R, Kovacs K, Melmed S. (1990) Clonal origin of pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 71: 1427–1433.
- Honda S, Tanaka-Kosugi C, Yamada S, Sano T, Matsumoto T, Itakura M, Yoshimoto K. (2003) Human pituitary adenomas infrequently contain inactivation of retinoblastoma 1 gene and activation of cyclin dependent kinase 4 gene. *Endocr J*, 50: 309–318.
- Hossain MA, Kim DH, Jang JY, Kang YJ, Yoon J-H, Moon J-O, Chung HY, Kim G-Y, Choi YH, Copple BL, Kim ND. (2012) Aspirin enhances doxorubicin-induced apoptosis and reduces tumor growth in human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Int J Oncol*, 40: 1636–1642.
- Hossain MG, Iwata T, Mizusawa N, Qian ZR, Shima SWN, Okutsu T, Yamada S, Sano T, Yoshimoto K. (2009) Expression of p18(INK4C) is down-regulated in human pituitary adenomas. *Endocr Pathol*, 20: 114–121.
- Howell N, Kubacka I, Halvorson S, Howell B, McCullough DA, Mackey D. (1995) Phylogenetic analysis of the mitochondrial genomes from Leber hereditary optic neuropathy pedigrees. *Genetics*, 140: 285–302.
- Ibrahim AEK, Pickering RM, Gawne-Cain ML, King S, Lees PD, Ellison DW. (2004) Indices of apoptosis and proliferation as potential prognostic markers in non-functioning pituitary adenomas. *Clin Neuropathol*, 23: 8–15.
- Igaz I, Nyíró G, Nagy Zoltán, Butz H, Nagy Zsolt, Perge P, Sahin P, Tóth M, Rác K, Igaz P, Patócs A. (2015) Analysis of Circulating MicroRNAs In Vivo following Administration of Dexamethasone and Adrenocorticotropin. *Int J Endocrinol*, 2015: 6.
- Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. (2010) Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol*, 3: 478–481.
- Im S-R, Jang Y-J. (2012) Aspirin enhances TRAIL-induced apoptosis via regulation of ERK1/2 activation in human cervical cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 424: 65–70.

- Iwata T, Yamada S, Mizusawa N, Golam HM, Sano T, Yoshimoto K. (2007) The aryl hydrocarbon receptor-interacting protein gene is rarely mutated in sporadic GH-secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 66: 499–502.
- Jankowska A, Wasko R, Waligorska-Stachura J, Andrusiewicz M, Jaskula M, Liebert W, Sowinski J. (2008) Survivin products in pituitary tumors. *Neuro Endocrinol Lett*, 29: 1033–1037.
- Jensen MM, Jørgensen JT, Binderup T, Kjaer A. (2008) Tumor volume in subcutaneous mouse xenografts measured by microCT is more accurate and reproducible than determined by 18F-FDG-microPET or external caliper. *BMC Med Imaging*, 8: 16.
- Jensen RL, Leppla D, Rokosz N, Wurster RD. (1998) Matrigel augments xenograft transplantation of meningioma cells into athymic mice. *Neurosurgery*, 42: 130–135; discussion 135-136.
- Jiang X, Zhang X. (2013) The molecular pathogenesis of pituitary adenomas: an update. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 28: 245–254.
- Jin M, Li C, Zhang Q, Xing S, Kan X, Wang J. (2018) Effects of aspirin on proliferation, invasion and apoptosis of Hep-2 cells via the PTEN/AKT/NF- κ B/survivin signaling pathway. *Oncology Letters*, 15: 8454–8460.
- Jin Z, El-Deiry WS. (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*, 4: 139–163.
- Johns DR, Berman J. (1991) Alternative, simultaneous complex I mitochondrial DNA mutations in Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochem Biophys Res Commun*, 174: 1324–1330.
- Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. (2002) Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell*, 108: 153–164.
- Jones HB. (1847) *Papers ON CHEMICAL PATHOLOGY*:: Prefaced by the Gulstonian Lectures, read at the Royal College of Physicians, 1846. *The Lancet*, 50: 511–514.
- Kaiser J. (2012) Will an aspirin a day keep cancer away? *Science*, 337: 1471–1473.
- Kaltsas GA, Kola B, Borboli N, Morris DG, Gueorguiev M, Swords FM, Czirják S, Kirschner LS, Stratakis CA, Korbonits M, Grossman AB. (2002) Sequence analysis of the PRKAR1A gene in sporadic somatotroph and other pituitary tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 57: 443–448.

- Kaltsas GA, Nomikos P, Kontogeorgos G, Buchfelder M, Grossman AB. (2005) Clinical review: Diagnosis and management of pituitary carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 3089–3099.
- Kent OA, McCall MN, Cornish TC, Halushka MK. (2014) Lessons from miR-143/145: the importance of cell-type localization of miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 42: 7528–7538.
- Kim JY, Chung J-Y, Lee SG, Kim Y-J, Park J-E, Yoo KS, Yoo YH, Park YC, Kim BG, Kim J-M. (2006) Nuclear interaction of Smac/DIABLO with Survivin at G2/M arrest prompts docetaxel-induced apoptosis in DU145 prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 350: 949–954.
- Kim KM, Song JJ, An JY, Kwon YT, Lee YJ. (2005) Pretreatment of Acetylsalicylic Acid Promotes Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand-induced Apoptosis by Down-regulating BCL-2 Gene Expression. *J Biol Chem*, 280: 41047–41056.
- Kirchner SC, Hallagan SE, Farin FM, Dilley J, Costa-Mallen P, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Checkoway H. (2000) Mitochondrial ND1 sequence analysis and association of the T4216C mutation with Parkinson's disease. *Neurotoxicology*, 21: 441–445.
- Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA. (2000) Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet*, 26: 89–92.
- Kloss-Brandstätter A, Weissensteiner H, Erhart G, Schäfer G, Forer L, Schönherr S, Pacher D, Seifarth C, Stöckl A, Fendt L, Sottas I, Klocker H, Huck CW, Rasse M, Kronenberg F, Kloss FR. (2015) Validation of Next-Generation Sequencing of Entire Mitochondrial Genomes and the Diversity of Mitochondrial DNA Mutations in Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 10: e0135643.
- Köchling M, Ewelt C, Fürtjes G, Peetz-Dienhart S, Koos B, Hasselblatt M, Paulus W, Stummer W, Brokinkel B. (2016) hTERT promoter methylation in pituitary adenomas. *Brain Tumor Pathol*, 33: 27–34.

- Kong X, Gong S, Su L, Cheng X, Li H, You T, Kong Y. (2017) Survivin overexpression is potentially associated with pituitary adenoma invasiveness. *Oncotarget*, 8: 105637–105647.
- Kontogeorgos G. (2006) Predictive markers of pituitary adenoma behavior. *Neuroendocrinology*, 83: 179–188.
- Kontogeorgos G, Kapranos N, Thodou E, Sambaziotis D, Tsagarakis S. (1999) Immunocytochemical accumulation of p53 in corticotroph adenomas: relationship with heat shock proteins and apoptosis. *Pituitary*, 1: 207–212.
- Korbonits M, Chahal HS, Kaltsas G, Jordan S, Urmanova Y, Khalimova Z, Harris PE, Farrell WE, Claret F-X, Grossman AB. (2002) Expression of phosphorylated p27(Kip1) protein and Jun activation domain-binding protein 1 in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 2635–2643.
- Krawczynski K, Bauersachs S, Reliszko ZP, Graf A, Kaczmarek MM. (2015) Expression of microRNAs and isomiRs in the porcine endometrium: implications for gene regulation at the maternal-conceptus interface. *BMC Genomics*, 16: 906.
- Kulasingam V, Diamandis EP. (2008) Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol*, 5: 588–599.
- Kulig E, Jin L, Qian X, Horvath E, Kovacs K, Stefanescu L, Scheithauer BW, Lloyd RV. (1999) Apoptosis in Nontumorous and Neoplastic Human Pituitaries. *Am J Pathol*, 154: 767–774.
- Kurelac I, MacKay A, Lambros MBK, Di Cesare E, Cenacchi G, Ceccarelli C, Morra I, Melcarne A, Morandi L, Calabrese FM, Attimonelli M, Tallini G, Reis-Filho JS, Gasparre G. (2013) Somatic complex I disruptive mitochondrial DNA mutations are modifiers of tumorigenesis that correlate with low genomic instability in pituitary adenomas. *Hum Mol Genet*, 22: 226–238.
- Lai EC. (2002) Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation. *Nat Genet*, 30: 363–364.
- Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. (2015) MicroRNAs as Potential Biomarkers in Cancer: Opportunities and Challenges. *Biomed Res Int*, 2015: 17.
- Lania AG, Ferrero S, Pivonello R, Mantovani G, Peverelli E, Di Sarno A, Beck-Peccoz P, Spada A, Colao A. (2010) Evolution of an aggressive prolactinoma into a growth

- hormone secreting pituitary tumor coincident with GNAS gene mutation. *J Clin Endocrinol Metab*, 95: 13–17.
- Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CSR, Harris AL. (2008) Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 141: 672–675.
- Lecoq A-L, Kamenický P, Guiochon-Mantel A, Chanson P. (2015) Genetic mutations in sporadic pituitary adenomas—what to screen for? *Nat Rev Endocrinol*, 11: 43–54.
- Lee EY, Cam H, Ziebold U, Rayman JB, Lees JA, Dynlacht BD. (2002) E2F4 loss suppresses tumorigenesis in Rb mutant mice. *Cancer Cell*, 2: 463–472.
- Lee LW, Zhang S, Etheridge A, Ma L, Martin D, Galas D, Wang K. (2010) Complexity of the microRNA repertoire revealed by next-generation sequencing. *RNA*, 16: 2170–2180.
- Lee M, Pellegata NS. (2013) Multiple endocrine neoplasia type 4. *Front Horm Res*, 41: 63–78.
- Levy A, Hall L, Yeudall WA, Lightman SL. (1994) p53 gene mutations in pituitary adenomas: rare events. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 41: 809–814.
- Lewis PD, Baxter P, Paul Griffiths A, Parry JM, Skibinski DO. (2000) Detection of damage to the mitochondrial genome in the oncocytic cells of Warthin's tumour. *J Pathol*, 191: 274–281.
- Li D, Wang P, Yu Y, Huang B, Zhang X, Xu C, Zhao X, Yin Z, He Z, Jin M, Liu C. (2018) Tumor-preventing activity of aspirin in multiple cancers based on bioinformatic analyses. *PeerJ*, 6: e5667.
- Li X, Liu L, Xi Q, Zhao X, Fang M, Ma J, Zhu Z, Wang X, Shi C, Wang J, Zhu H, Zhang J, Zhang C, Hu S, Ni M, Gu M. (2016) Short-term serum deprivation causes no significant mitochondrial DNA mutation in vascular smooth muscle cells revealed by a new next generation sequencing technology. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 48: 862–864.
- Lian B, Yang D, Liu Y, Shi G, Li J, Yan X, Jin K, Liu X, Zhao J, Shang W, Zhang R. (2018) miR-128 Targets the SIRT1/ROS/DR5 Pathway to Sensitize Colorectal Cancer to TRAIL-Induced Apoptosis. *Cell Physiol Biochem*, 49: 2151–2162.

- Liang S, Chen L, Huang H, Zhi D. (2013) The experimental study of miRNA in pituitary adenomas. *Turk Neurosurg*, 23: 721–727.
- Lightowlers RN, Chinnery PF, Turnbull DM, Howell N. (1997) Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease. *Trends in Genetics*, 13: 450–455.
- Lin J-C, Wang C-C, Jiang R-S, Wang W-Y, Liu S-A. (2015) Impact of Somatic Mutations in the D-Loop of Mitochondrial DNA on the Survival of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *PLOS ONE*, 10: e0124322.
- Lin Y, Jiang X, Shen Y, Li M, Ma H, Xing M, Lu Y. (2009) Frequent mutations and amplifications of the PIK3CA gene in pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*, 16: 301–310.
- Lincoln FA, Imig D, Boccellato C, Juric V, Noonan J, Kontermann RE, Allgöwer F, Murphy BM, Rehm M. (2018) Sensitization of glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by IAP- and Bcl-2 antagonism. *Cell Death Dis*, 9: 1112.
- Liu K, Xuekelati S, Zhang Y, Yin Y, Li Y, Chai R, Li X, Peng Y, Wu J, Guo X. (2017) Expression levels of atherosclerosis-associated miR-143 and miR-145 in the plasma of patients with hyperhomocysteinaemia. *BMC Cardiovasc Disord*, 17: 163.
- Liu L, Yu X, Guo X, Tian Z, Su M, Long Y, Huang C, Zhou F, Liu M, Wu X, Wang X. (2012) miR-143 is downregulated in cervical cancer and promotes apoptosis and inhibits tumor formation by targeting Bcl-2. *Molecular Medicine Reports*, 5: 753–760.
- Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, 25: 402–408.
- Lloyd RV, Erickson LA, Jin L, Kulig E, Qian X, Cheville JC, Scheithauer BW. (1999) p27kip1: a multifunctional cyclin-dependent kinase inhibitor with prognostic significance in human cancers. *Am J Pathol*, 154: 313–323.
- Lloyd RV, Jin L, Qian X, Kulig E. (1997) Aberrant p27kip1 expression in endocrine and other tumors. *Am J Pathol*, 150: 401–407.
- Lu M, Strohecker A, Chen F, Kwan T, Bosman J, Jordan VC, Cryns VL. (2008) Aspirin Sensitizes Cancer Cells to TRAIL-Induced Apoptosis by Reducing Survivin Levels. *Clin Cancer Res*, 14: 3168–3176.

- Luciani MG, Campregher C, Gasche C. (2007) Aspirin blocks proliferation in colon cells by inducing a G 1 arrest and apoptosis through activation of the checkpoint kinase ATM. *Carcinogenesis*, 28: 2207–2217.
- Ma J, Cai Z, Wei H, Liu X, Zhao Q, Zhang T. (2017) The anti-tumor effect of aspirin: What we know and what we expect. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95: 656–661.
- Ma Z-Y et al. (2015) Recurrent gain-of-function USP8 mutations in Cushing’s disease. *Cell Res*, 25: 306–317.
- Maas SLN, De Vrij J, Broekman MLD. (2014) Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *J Vis Exp*, e51623.
- Mao Z-G, He D-S, Zhou J, Yao B, Xiao W-W, Chen C-H, Zhu Y-H, Wang H-J. (2010a) Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol*, 5: 79.
- Mao Z-G, He D-S, Zhou J, Yao B, Xiao W-W, Chen C-H, Zhu Y-H, Wang H-J. (2010b) Differential expression of microRNAs in GH-secreting pituitary adenomas. *Diagn Pathol*, 5: 79.
- Martin M. (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17: 10–12.
- Martínez-Fuentes AJ et al. (2011) Expression of functional KISS1 and KISS1R system is altered in human pituitary adenomas: evidence for apoptotic action of kisspeptin-10. *Eur J Endocrinol*, 164: 355–362.
- Máximo V, Lima J, Soares P, Sobrinho-Simões M. (2009) Mitochondria and cancer. *Virchows Arch*, 454: 481–495.
- Melmed S. (2011) Pathogenesis of pituitary tumors. *Nature Reviews Endocrinology*, 7: 257–266.
- Mete O, Lopes MB. (2017) Overview of the 2017 WHO Classification of Pituitary Tumors. *Endocr Pathol*, 28: 228–243.
- Michael MZ, O’ Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. (2003) Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 1: 882–891.
- Mitchell PS et al. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *PNAS*, 105: 10513–10518.

- Miyazono F, Schneider PM, Metzger R, Warnecke-Eberz U, Baldus SE, Dienes HP, Aikou T, Hoelscher AH. (2002) Mutations in the mitochondrial DNA D-Loop region occur frequently in adenocarcinoma in Barrett's esophagus. *Oncogene*, 21: 3780–3783.
- Modica-Napolitano JS, Singh KK. (2004) Mitochondrial dysfunction in cancer. *Mitochondrion*, 4: 755–762.
- Molitch ME. (2017) Diagnosis and Treatment of Pituitary Adenomas: A Review. *JAMA*, 317: 516–524.
- Monsalves E, Juraschka K, Tateno T, Agnihotri S, Asa SL, Ezzat S, Zadeh G. (2014) The PI3K/AKT/mTOR pathway in the pathophysiology and treatment of pituitary adenomas. *Endocr Relat Cancer*, 21: R331-344.
- Montinari MR, Minelli S, De Caterina R. (2018) The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary. *Vascul Pharmacol*.
- Moreno CS, Evans C-O, Zhan X, Okor M, Desiderio DM, Oyesiku NM. (2005) Novel Molecular Signaling and Classification of Human Clinically Nonfunctional Pituitary Adenomas Identified by Gene Expression Profiling and Proteomic Analyses. *Cancer Res*, 65: 10214–10222.
- Motawi TK, Rizk SM, Ibrahim TM, Ibrahim IA-R. (2016) Circulating microRNAs, miR-92a, miR-100 and miR-143, as non-invasive biomarkers for bladder cancer diagnosis. *Cell Biochemistry and Function*, 34: 142–148.
- Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C. (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*, 123: 1603–1611.
- Nagy Z, Decmann Á, Perge P, Igaz P. (2018) Pathogenic and diagnostic roles of microRNAs in adrenocortical tumours. *Orvosi Hetilap*, 159: 245–251.
- Nakabayashi H, Sunada I, Hara M. (2001) Immunohistochemical analyses of cell cycle-related proteins, apoptosis, and proliferation in pituitary adenomas. *J Histochem Cytochem*, 49: 1193–1194.
- Nakahara T, Kita A, Yamanaka K, Mori M, Amino N, Takeuchi M, Tominaga F, Hatakeyama S, Kinoyama I, Matsuhisa A, Kudoh M, Sasamata M. (2007) YM155, a novel small-molecule survivin suppressant, induces regression of established human hormone-refractory prostate tumor xenografts. *Cancer Res*, 67: 8014–8021.

- Naziat A, Karavitaki N, Thakker R, Ansorge O, Sadler G, Gleeson F, Cranston T, McCormack A, Grossman AB, Shine B. (2013) Confusing genes: a patient with MEN2A and Cushing's disease. *Clinical Endocrinology*, 78: 966–968.
- Neilsen CT, Goodall GJ, Bracken CP. (2012) IsomiRs--the overlooked repertoire in the dynamic microRNAome. *Trends Genet*, 28: 544–549.
- Németh K et al. (2018a) Survivin as a potential therapeutic target of acetylsalicylic acid in pituitary adenomas. *Oncotarget*, 9: 29180–29192.
- Németh K, Darvasi O, Likó I, Szücs N, Czirják S, Reiniger L, Szabó B, Kurucz PA, Krokker L, Igaz P, Patócs A, Butz H. (2019) Next-generation sequencing identifies novel mitochondrial variants in pituitary adenomas. *J Endocrinol Invest*, 42.
- Németh K, Darvasi O, Szücs N, Czirják S, Butz H. (2018b) [The role of miRNAs in the pathogenesis of pituitary adenomas]. *Orv Hetil*, 159: 252–259.
- Neto AG, McCutcheon IE, Vang R, Spencer ML, Zhang W, Fuller GN. (2005) Elevated expression of p21 (WAF1/Cip1) in hormonally active pituitary adenomas. *Ann Diagn Pathol*, 9: 6–10.
- Ning S, Knox SJ, Harsh GR, Culler MD, Katznelson L. (2009) Lanreotide promotes apoptosis and is not radioprotective in GH3 cells. *Endocr Relat Cancer*, 16: 1045–1055.
- Nishioka H, Inoshita N. (2018) New WHO classification of pituitary adenomas (4th edition): assessment of pituitary transcription factors and the prognostic histological factors. *Brain Tumor Pathol*, 35: 57–61.
- Oh MC, Aghi MK. (2011) Dopamine agonist-resistant prolactinomas. *J Neurosurg*, 114: 1369–1379.
- Osamura RY, Lopes MBS, Grossman A, Matsuno A, Korbonits M, Trouillas J, Kovacs K. Tumours of the pituitary gland. In: Lloyd RV, Osamura RY, Klöppel G, Rosai J (szerk.), *WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2017: 14–18.
- Osteikoetxea X, Sódar B, Németh A, Szabó-Taylor K, Pálóczi K, Vukman KV, Tamási V, Balogh A, Kittel Á, Pállinger É, Buzás EI. (2015) Differential detergent sensitivity of extracellular vesicle subpopulations. *Org Biomol Chem*, 13: 9775–9782.

- Ou Y, Zhu W bo, Li Y, Qiu P, Huang Y, Xie J, He S, Zheng X, Leng T, Xu D, Yan G. (2010) Aspirin inhibits proliferation of gemcitabine-resistant human pancreatic cancer cells and augments gemcitabine-induced cytotoxicity. *Acta Pharmacol Sin*, 31: 73–80.
- Ozer E, Canda MS, Ulukus C, Guray M, Erbayraktar S. (2003) Expression of Bcl-2, Bax and p53 proteins in pituitary adenomas: an immunohistochemical study. *Tumori*, 89: 54–59.
- Pack SD, Kirschner LS, Pak E, Zhuang Z, Carney JA, Stratakis CA. (2000) Genetic and histologic studies of somatomammotropic pituitary tumors in patients with the “complex of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity and schwannomas” (Carney complex). *J Clin Endocrinol Metab*, 85: 3860–3865.
- Papadimitriou J. (2000) “Thanatosomes”: A unifying morphogenetic concept for tumor hyaline globules related to apoptosis. *Human Pathology*, 31: 1455–1465.
- Park JS, Sharma LK, Li H, Xiang R, Holstein D, Wu J, Lechleiter J, Naylor SL, Deng JJ, Lu J, Bai Y. (2009) A heteroplasmic, not homoplasmic, mitochondrial DNA mutation promotes tumorigenesis via alteration in reactive oxygen species generation and apoptosis. *Hum Mol Genet*, 18: 1578–1589.
- Pathi S, Jutooru I, Chadalapaka G, Nair V, Lee S-O, Safe S. (2012) Aspirin Inhibits Colon Cancer Cell and Tumor Growth and Downregulates Specificity Protein (Sp) Transcription Factors. *PLOS ONE*, 7: e48208.
- Pease M, Ling C, Mack WJ, Wang K, Zada G. (2013) The role of epigenetic modification in tumorigenesis and progression of pituitary adenomas: a systematic review of the literature. *PLoS ONE*, 8: e82619.
- Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggelkow H, Samson E, Bink K, Höfler H, Fend F, Graw J, Atkinson MJ. (2006) Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103: 15558–15563.
- Pennarun B, Kleibeuker JH, Boersma-van Ek W, Kruyt FAE, Hollema H, de Vries EGE, de Jong S. (2013) Targeting FLIP and Mcl-1 using a combination of aspirin and sorafenib sensitizes colon cancer cells to TRAIL. *J Pathol*, 229: 410–421.
- Perge P, Butz H, Pezzani R, Bancos I, Nagy Z, Pálóczi K, Nyíró G, Decmann Á, Pap E, Luconi M, Mannelli M, Buzás EI, Tóth M, Boscaro M, Patócs A, Igaz P. (2017)

- Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci Rep*, 7: 5474.
- Petiti JP, Sosa L del V, Sabatino ME, Vaca AM, Gutiérrez S, De Paul AL, Torres AI. (2015) Involvement of MEK/ERK1/2 and PI3K/Akt pathways in the refractory behavior of GH3B6 pituitary tumor cells to the inhibitory effect of TGF β 1. *Endocrinology*, 156: 534–547.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 271: 12687–12690.
- Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B. (1998) Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet*, 20: 291–293.
- Porcelli AM et al. (2010) The genetic and metabolic signature of oncocytic transformation implicates HIF1 α destabilization. *Hum Mol Genet*, 19: 1019–1032.
- RÁCZ K. Az endokrin rendszer betegségei. In: Tulassay Z (szerk.), *A belgyógyászat alapjai 2*. Medicina, Budapest, 2011: 237–274.
- Raitila A, Georgitsi M, Karhu A, Tuppurainen K, Mäkinen MJ, Birkenkamp-Demtröder K, Salmenkivi K, Orntoft TF, Arola J, Launonen V, Vahteristo P, Aaltonen LA. (2007) No evidence of somatic aryl hydrocarbon receptor interacting protein mutations in sporadic endocrine neoplasia. *Endocr Relat Cancer*, 14: 901–906.
- Ramos A, Santos C, Alvarez L, Nogués R, Aluja MP. (2009) Human mitochondrial DNA complete amplification and sequencing: A new validated primer set that prevents nuclear DNA sequences of mitochondrial origin co-amplification. *Electrophoresis*, 30: 1587–1593.
- Ramos A, Santos C, Barbena E, Mateiu L, Alvarez L, Nogués R, Aluja MP. (2011) Validated primer set that prevents nuclear DNA sequences of mitochondrial origin co-amplification: a revision based on the New Human Genome Reference Sequence (GRCh37). *Electrophoresis*, 32: 782–783.
- Rana K, Reinhart-King CA, King MR. (2012) Inducing apoptosis in rolling cancer cells: a combined therapy with aspirin and immobilized TRAIL and E-selectin. *Mol Pharm*, 9: 2219–2227.

- Rana M, de Coo I, Diaz F, Smeets H, Moraes CT. (2000) An out-of-frame cytochrome b gene deletion from a patient with parkinsonism is associated with impaired complex III assembly and an increase in free radical production. *Ann Neurol*, 48: 774–781.
- Rasheduzzaman M, Jeong J-K, Park S-Y. (2018) Resveratrol sensitizes lung cancer cell to TRAIL by p53 independent and suppression of Akt/NF- κ B signaling. *Life Sci*, 208: 208–220.
- Rauch A, Hennig D, Schäfer C, Wirth M, Marx C, Heinzl T, Schneider G, Krämer OH. (2014) Survivin and YM155: how faithful is the liaison? *Biochim Biophys Acta*, 1845: 202–220.
- Restrepo NA, Mitchell SL, Goodloe RJ, Murdock DG, Haines JL, Crawford DC. (2015) Mitochondrial variation and the risk of age-related macular degeneration across diverse populations. *Pac Symp Biocomput*, 243–254.
- Riedl SJ, Renucci M, Schwarzenbacher R, Zhou Q, Sun C, Fesik SW, Liddington RC, Salvesen GS. (2001) Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell*, 104: 791–800.
- Robertson AM, Heaney AP. (2016) Molecular markers in pituitary tumors. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 23: 324–330.
- Roelfsema F, Biermasz NR, Pereira AM. (2012) Clinical factors involved in the recurrence of pituitary adenomas after surgical remission: a structured review and meta-analysis. *Pituitary*, 15: 71–83.
- Rothwell PM, Fowkes FGR, Belch JFF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. (2011) Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*, 377: 31–41.
- Sahasrabudhe VV, Gunja MZ, Graubard BI, Trabert B, Schwartz LM, Park Y, Hollenbeck AR, Freedman ND, McGlynn KA. (2012) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use, chronic liver disease, and hepatocellular carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 104: 1808–1814.
- Salehi F, Agur A, Scheithauer BW, Kovacs K, Lloyd RV, Cusimano M. (2009) Ki-67 in pituitary neoplasms: a review--part I. *Neurosurgery*, 65: 429–437.
- Salehi F, Kovacs K, Scheithauer BW, Lloyd RV, Cusimano M. (2008) Pituitary tumor-transforming gene in endocrine and other neoplasms: a review and update. *Endocr Relat Cancer*, 15: 721–743.

- Salem O, Erdem N, Jung J, Münstermann E, Wörner A, Wilhelm H, Wiemann S, Körner C. (2016) The highly expressed 5'isomiR of hsa-miR-140-3p contributes to the tumor-suppressive effects of miR-140 by reducing breast cancer proliferation and migration. *BMC Genomics*, 17: 566.
- Sambaziotis D, Kapranos N, Kontogeorgos G. (2003) Correlation of bcl-2 and bax with apoptosis in human pituitary adenomas. *Pituitary*, 6: 127–133.
- Sapochnik M, Nieto LE, Fuertes M, Arzt E. (2016) Molecular Mechanisms Underlying Pituitary Pathogenesis. *Biochem Genet*, 54: 107–119.
- Saraga-Babic M, Bazina M, Vukojevic K, Bocina I, Stefanovic V. (2008) Involvement of pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in the early development of the human pituitary gland. *Histol Histopathol*, 23: 1259–1268.
- Sav A, Rotondo F, Syro LV, Scheithauer BW, Kovacs K. (2012) Biomarkers of pituitary neoplasms. *Anticancer Res*, 32: 4639–4654.
- Sawyers CL. (2008) The cancer biomarker problem. *Nature*, 452: 548–552.
- Sayers TJ, Murphy WJ. (2006) Combining proteasome inhibition with TNF-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL) for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*, 55: 76–84.
- Schamberger A, Orbán TI. (2014) 3' IsomiR species and DNA contamination influence reliable quantification of microRNAs by stem-loop quantitative PCR. *PLoS ONE*, 9: e106315.
- Scheithauer BW, Gaffey TA, Lloyd RV, Sebo TJ, Kovacs KT, Horvath E, Yapıcıer Ö, Young WF, Meyer FB, Kuroki T, Riehle DL, Laws ER. (2006) Pathobiology of Pituitary Adenomas and Carcinomas. *Neurosurgery*, 59: 341–353.
- Scheithauer BW, Laws ER, Kovacs K, Horvath E, Randall RV, Carney JA. (1987) Pituitary adenomas of the multiple endocrine neoplasia type I syndrome. *Semin Diagn Pathol*, 4: 205–211.
- Schernthaner-Reiter MH, Trivellin G, Stratakis CA. (2016) MEN1, MEN4, and Carney Complex: Pathology and Molecular Genetics. *NEN*, 103: 18–31.
- Schneeberger M, Altirriba J, García A, Esteban Y, Castaño C, García-Lavandeira M, Alvarez CV, Gomis R, Claret M. (2012) Deletion of miRNA processing enzyme Dicer in POMC-expressing cells leads to pituitary dysfunction, neurodegeneration and development of obesity. *Mol Metab*, 2: 74–85.

- Sharma H, Singh A, Sharma C, Jain SK, Singh N. (2005) Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer. *Cancer Cell Int*, 5: 34.
- Shiff SJ, Koutsos MI, Qiao L, Rigas B. (1996) Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibit the proliferation of colon adenocarcinoma cells: effects on cell cycle and apoptosis. *Exp Cell Res*, 222: 179–188.
- Siegel S, Castellan Jr. NJ. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. 2nd ed., England: Mcgraw-Hill Book Company, New York, 1988.
- Silva J, García V, Zaballos Á, Provencio M, Lombardía L, Almonacid L, García JM, Domínguez G, Peña C, Diaz R, Herrera M, Varela A, Bonilla F. (2011) Vesicle-related microRNAs in plasma of nonsmall cell lung cancer patients and correlation with survival. *Eur Respir J*, 37: 617–623.
- Simpson DJ, Bicknell JE, McNicol AM, Clayton RN, Farrell WE. (1999) 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: 328–336.
- Song Z, Yao X, Wu M. (2003) Direct interaction between survivin and Smac/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 278: 23130–23140.
- Stuckey DW, Shah K. (2013) TRAIL on Trial: Preclinical advances for cancer therapy. *Trends Mol Med*, 19(11): 685-94.
- Suliman M, Royds J, Cullen D, Timperley W, Powell T, Battersby R, Jones TH. (2001) Mdm2 and the p53 pathway in human pituitary adenomas. *Clinical Endocrinology*, 54: 317–325.
- Sun X, Dai G, Yu L, Hu Q, Chen J, Guo W. (2018) miR-143-3p inhibits the proliferation, migration and invasion in osteosarcoma by targeting FOSL2. *Scientific Reports*, 8: 606.
- Suojun Z, Feng W, Dongsheng G, Ting L. (2012) Targeting Raf/MEK/ERK pathway in pituitary adenomas. *Eur J Cancer*, 48: 389–395.
- Swerdlow RH, Weaver B, Grawey A, Wenger C, Freed E, Worrall BB. (2006) Complex I polymorphisms, bigenomic heterogeneity, and family history in Virginians with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 247: 224–230.

- Tamm I, Wang Y, Sausville E, Scudiero DA, Vigna N, Oltersdorf T, Reed JC. (1998) IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res*, 58: 5315–5320.
- Tan GC et al. (2014) 5' isomiR variation is of functional and evolutionary importance. *Nucleic Acids Res*, 42: 9424–9435.
- Tan GC, Dibb N. (2015) IsomiRs have functional importance. *Malays J Pathol*, 37: 73–81.
- Thapar K, Scheithauer BW, Kovacs K, Pernicone PJ, Laws ER. (1996) p53 expression in pituitary adenomas and carcinomas: correlation with invasiveness and tumor growth fractions. *Neurosurgery*, 38: 765–770.
- Théry C et al. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 7: 1535750.
- Thun MJ, Jacobs EJ, Patrono C. (2012) The role of aspirin in cancer prevention. *Nat Rev Clin Oncol*, 9: 259–267.
- Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW. (1991) Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med*, 325: 1593–1596.
- Todo M, Horinaka M, Tomosugi M, Tanaka R, Ikawa H, Sowa Y, Ishikawa H, Fujiwara H, Otsuji E, Sakai T. (2013) Ibuprofen enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation. *Oncol Rep*, 30: 2379–2384.
- Tolcher AW, Mita A, Lewis LD, Garrett CR, Till E, Daud AI, Patnaik A, Papadopoulos K, Takimoto C, Bartels P, Keating A, Antonia S. (2008) Phase I and pharmacokinetic study of YM155, a small-molecule inhibitor of survivin. *J Clin Oncol*, 26: 5198–5203.
- Trouillas J, Labat-Moleur F, Sturm N, Kujas M, Heymann M-F, Figarella-Branger D, Patey M, Mazucca M, Decullier E, Vergès B, Chabre O, Calender A, Groupe d'études des Tumeurs Endocrines. (2008) Pituitary tumors and hyperplasia in multiple endocrine neoplasia type 1 syndrome (MEN1): a case-control study in a series of 77 patients versus 2509 non-MEN1 patients. *Am J Surg Pathol* 32: 534–543.

- Turchinovich A, Weiz L, Langheinze A, Burwinkel B. (2011) Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 39: 7223–7233.
- Uren AG, Wong L, Pakusch M, Fowler KJ, Burrows FJ, Vaux DL, Choo KH. (2000) Survivin and the inner centromere protein INCENP show similar cell-cycle localization and gene knockout phenotype. *Curr Biol*, 10: 1319–1328.
- Urgese G, Paciello G, Acquaviva A, Ficarra E. (2016) isomiR-SEA: an RNA-Seq analysis tool for miRNAs/isomiRs expression level profiling and miRNA-mRNA interaction sites evaluation. *BMC Bioinformatics*, 17: 148.
- Valdivieso AG, Marcucci F, Taminelli G, Guerrico AG, Alvarez S, Teiber ML, Dankert MA, Santa-Coloma TA. (2007) The expression of the mitochondrial gene MT-ND4 is downregulated in cystic fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 356: 805–809.
- van Gisbergen MW, Voets AM, Starmans MHW, de Coo IFM, Yadak R, Hoffmann RF, Boutros PC, Smeets HJM, Dubois L, Lambin P. (2015) How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 764: 16–30.
- Vandeva S, Jaffrain-Rea M-L, Daly AF, Tichomirowa M, Zacharieva S, Beckers A. (2010) The genetics of pituitary adenomas. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 24: 461–476.
- Vanharanta S, Buchta M, McWhinney SR, Virta SK, Peçzkowska M, Morrison CD, Lehtonen R, Januszewicz A, Järvinen H, Juhola M, Mecklin J-P, Pukkala E, Herva R, Kiuru M, Nupponen NN, Aaltonen LA, Neumann HPH, Eng C. (2004) Early-onset renal cell carcinoma as a novel extraparaganglial component of SDHB-associated heritable paraganglioma. *Am J Hum Genet*, 74: 153–159.
- Vega A, Salas A, Gamborino E, Sobrido MJ, Macaulay V, Carracedo A. (2004) mtDNA mutations in tumors of the central nervous system reflect the neutral evolution of mtDNA in populations. *Oncogene*, 23: 1314–1320.
- Veitonmäki T, Tammela TLJ, Auvinen A, Murtola TJ. (2013) Use of aspirin, but not other non-steroidal anti-inflammatory drugs is associated with decreased prostate cancer risk at the population level. *Eur J Cancer*, 49: 938–945.
- Vergès B, Boureille F, Goudet P, Murat A, Beckers A, Sassolas G, Cougard P, Chambe B, Montvernay C, Calender A. (2002) Pituitary disease in MEN type 1 (MEN1):

- data from the France-Belgium MEN1 multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 457–465.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 13: 423–433.
- Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH. (1999) Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*, 5: 157–163.
- Waligórska-Stachura J, Jankowska A, Waško R, Liebert W, Biczysko M, Czarnywojtek A, Baszko-Błaszyk D, Shimek V, Ruchała M. (2012a) Survivin--prognostic tumor biomarker in human neoplasms--review. *Ginekol Pol*, 83: 537–540.
- Waligórska-Stachura J, Jankowska A, Waško R, Liebert W, Biczysko M, Czarnywojtek A, Baszko-Błaszyk D, Shimek V, Ruchała M. (2012b) Survivin--prognostic tumor biomarker in human neoplasms--review. *Ginekol Pol*, 83: 537–540.
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, Elsas LJ, Nikoskelainen EK. (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, 242: 1427–1430.
- Wang H, Li Q, Niu X, Wang G, Zheng S, Fu G, Wang Z. (2017) miR-143 inhibits bladder cancer cell proliferation and enhances their sensitivity to gemcitabine by repressing IGF-1R signaling. *Oncology Letters*, 13: 435–440.
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. (2010) The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem*, 56: 1733–1741.
- Wierinckx A, Auger C, Devauchelle P, Reynaud A, Chevallier P, Jan M, Perrin G, Fèvre-Montange M, Rey C, Figarella-Branger D, Raverot G, Belin M-F, Lachuer J, Trouillas J. (2007) A diagnostic marker set for invasion, proliferation, and aggressiveness of prolactin pituitary tumors. *Endocr Relat Cancer*, 14: 887–900.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, Sutherland GR, Smith TD, Rauch C, Smith CA. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, 3: 673–682.

- Wu Y-Y, Hsieh C-T, Chiu Y-M, Chou S-C, Kao J-T, Shieh D-C, Lee Y-J. (2018) GSK-3 inhibitors enhance TRAIL-mediated apoptosis in human gastric adenocarcinoma cells. *PLoS ONE*, 13: e0208094.
- Wyman SK, Knouf EC, Parkin RK, Fritz BR, Lin DW, Dennis LM, Krouse MA, Webster PJ, Tewari M. (2011) Post-transcriptional generation of miRNA variants by multiple nucleotidyl transferases contributes to miRNA transcriptome complexity. *Genome Res*, 21: 1450–1461.
- Xekouki P, Azevedo M, Stratakis CA. (2010) Anterior pituitary adenomas: inherited syndromes, novel genes and molecular pathways. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 5: 697–709.
- Xekouki P, Stratakis CA. (2012) Succinate dehydrogenase (SDHx) mutations in pituitary tumors: could this be a new role for mitochondrial complex II and/or Krebs cycle defects? *Endocr Relat Cancer*, 19: C33-40.
- Xu S, Li D, Li T, Qiao L, Li K, Guo L, Liu Y. (2018) miR-494 Sensitizes Gastric Cancer Cells to TRAIL Treatment Through Downregulation of Survivin. *Cell Physiol Biochem*, 51: 2212–2223.
- Yamanaka K, Nakahara T, Yamauchi T, Kita A, Takeuchi M, Kiyonaga F, Kaneko N, Sasamata M. (2011) Antitumor activity of YM155, a selective small-molecule survivin suppressant, alone and in combination with docetaxel in human malignant melanoma models. *Clin Cancer Res*, 17: 5423–5431.
- Yamasaki H, Mizusawa N, Nagahiro S, Yamada S, Sano T, Itakura M, Yoshimoto K. (2003) GH-secreting pituitary adenomas infrequently contain inactivating mutations of PRKAR1A and LOH of 17q23-24. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 58: 464–470.
- Yan K-H, Lee L-M, Hsieh M-C, Yan M-D, Yao C-J, Chang P-Y, Chen T-L, Chang H-Y, Cheng A-L, Lai G-M, Chuang S-E. (2013) Aspirin antagonizes the cytotoxic effect of methotrexate in lung cancer cells. *Oncol Rep*, 30: 1497–1505.
- Yan K-H, Yao C-J, Chang H-Y, Lai G-M, Cheng A-L, Chuang S-E. (2010) The synergistic anticancer effect of troglitazone combined with aspirin causes cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer cells. *Mol Carcinog*, 49: 235–246.

- Yang L, Zhu H, Liu D, Liang S, Xu H, Chen J, Wang X, Xu Z. (2011) Aspirin suppresses growth of human gastric carcinoma cell by inhibiting survivin expression. *J Biomed Res*, 25: 246–253.
- Yao N, Lu C-L, Zhao J-J, Xia H-F, Sun D-G, Shi X-Q, Wang C, Li D, Cui Y, Ma X. (2009) A network of miRNAs expressed in the ovary are regulated by FSH. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 14: 3239–3245.
- Ye C, Shu XO, Pierce L, Wen W, Courtney R, Gao Y-T, Zheng W, Cai Q. (2010) Mutations in the Mitochondrial DNA D-loop Region and Breast Cancer Risk. *Breast Cancer Res Treat*, 119: 431–436.
- Ye F, Samuels DC, Clark T, Guo Y. (2014) High-Throughput Sequencing in Mitochondrial DNA Research. *Mitochondrion*, 0: 157–163.
- Yoo J, Lee YJ. (2007) Aspirin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in hormone-refractory prostate cancer cells through survivin down-regulation. *Mol Pharmacol*, 72: 1586–1592.
- Yoshino A, Katayama Y, Ogino A, Watanabe T, Yachi K, Ohta T, Komine C, Yokoyama T, Fukushima T. (2007) Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas. *J Neurooncol*, 83: 153–162.
- Zatelli MC, Uberti EC degli. (2008) MicroRNAs and Possible Role in Pituitary Adenoma. *Semin Reprod Med*, 26: 453–460.
- Zhan X, Desiderio DM. (2010) Signaling pathway networks mined from human pituitary adenoma proteomics data. *BMC Med Genomics*, 3: 13.
- Zhang J, Ma D, Liu H, Wang J, Fan J, Li X. (2017) MicroRNA-143 shows tumor suppressive effects through inhibition of oncogenic K-Ras in pituitary tumor. *Int J Clin Exp Pathol*, 10: 10969–10978.
- Zhang Q, Feng Y, Liu P, Yang J. (2017) MiR-143 inhibits cell proliferation and invasion by targeting DNMT3A in gastric cancer. *Tumour Biol*, 39: 1010428317711312.
- Zhang QJ, Xu C. (2016) The role of microRNAs in the pathogenesis of pituitary tumors. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 21: 1–7.
- Zhang T, Yang Z, Gao H. (2017) Advancements in the study of miRNA regulation during the cell cycle in human pituitary adenomas. *J Neurooncol*, 134: 253–258.
- Zhang X, Sun H, Danila DC, Johnson SR, Zhou Y, Swearingen B, Klibanski A. (2002) Loss of expression of GADD45 gamma, a growth inhibitory gene, in human

pituitary adenomas: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 87: 1262–1267.

Zhang Z, Florez S, Gutierrez-Hartmann A, Martin JF, Amendt BA. (2010) MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression. *J Biol Chem*, 285: 34718–34728.

Zhao J, Dahle D, Zhou Y, Zhang X, Klibanski A. (2005) Hypermethylation of the Promoter Region Is Associated with the Loss of MEG3 Gene Expression in Human Pituitary Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90: 2179–2186.

Zhao Y-B, Yang H-Y, Zhang X-W, Chen G-Y. (2005) Mutation in D-loop region of mitochondrial DNA in gastric cancer and its significance. *World J Gastroenterol*, 11: 3304–3306.

Zimmermann KC, Waterhouse NJ, Goldstein JC, Schuler M, Green DR. (2000) Aspirin induces apoptosis through release of cytochrome c from mitochondria. *Neoplasia*, 2: 505–513.

Zubeldía-Brenner L, De Winne C, Perrone S, Rodríguez-Seguí SA, Willems C, Ornstein AM, Lacau-Mengido I, Vankelecom H, Cristina C, Becu-Villalobos D. (2019) Inhibition of Notch signaling attenuates pituitary adenoma growth in Nude mice. *Endocr Relat Cancer*, 26: 13–29.

X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

X.1. Az értekezés témájához kapcsolódó saját publikációk jegyzéke

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

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

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

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

X.2. Az értekezés témájához nem kapcsolódó saját publikációk jegyzéke

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

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

Darvasi O, Szabo PM, **Németh K**, Szabo K, Spisak S, Liko I, Czirjak S, Racz K, Igaz P, Patocs A, Butz H. (2017) Limitations of high throughput methods for miRNA expression profiles in non-functioning pituitary adenomas. *Pathol Oncol Res* 25: 169-182.

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

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

XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Butz Henriettnek**, akinek a szakmai segítsége nélkül ez a munka nem valósulhatott volna meg. Köszönöm, hogy példamutató munkabíráásával és fáradhatatlan lelkesedésével motiválni tudott, és hogy rengeteg új dolgot tanulhattam mellette.

Köszönöm **Dr. Patócs Attilának**, hogy lehetőséget nyújtott, hogy munkámat az Endokrin Genetikai Laboratóriumban végezhessem, valamint, hogy a lehetőségek megteremtésével, és értékes szakmai tanácsaival mindvégig támogott.

Köszönöm **Prof. Dr. Rácz Károly**, **Prof. Dr. Tóth Miklós** és **Prof. Dr. Igaz Péter** tanáruraknak, a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika volt és jelenlegi igazgatóinak, hogy kutatómunkámat mindvégig támogatták.

Köszönöm **Dr. Czirják Sándornak** az Országos Klinikai Idegtudományi Intézet idegsebész főorvosának a hypophysis adenoma minták gyűjtésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem I. sz. Patológia és Rákkutató Intézetében **Dr. Kovalszky Ilona** professzor asszony és munkacsoportja segítségét. Külön köszönöm **Dr. Reiniger Lilla** és **Karászi Katalin** immunhisztokémiai vizsgálatban nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönöm **Dr. Barna Gábornak** az áramlási citometriás mérésekben nyújtott segítségét.

Köszönöm **Dr. Paku Sándornak** a xenograft modell létrehozása során nyújtott támogatását és a szakmai tanácsokat, valamint köszönöm **Sztodola Andrásnak** az ebben nyújtott technikai segítségét.

Köszönöm **Dr. Buzás Edit** professzor asszonynak és **Dr. Pállinger Éva** docens asszonynak az extracelluláris vezikulák karakterizálásában nyújtott segítségét.

Köszönöm **Dr. Likó Istvánnak** és **Darvasi Ottónak** az újgenerációs szekvenálással nyert adatok bioinformatikai elemzésében nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönöm a támogatást a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinika endokrin munkacsoport minden tagjának, különösen **Dr. Szücs Nikolette** adjunktus asszonynak a betegminták gyűjtésében nyújtott nélkülözhetetlen segítséget. Köszönöm az Endokrin Genetikai Laboratórium posztdoktor kutatóinak, volt és jelenlegi PhD hallgatóinak és asszisztenseinek a tanácsokat, segítséget és jó hangulatot. Külön szeretném megköszönni **Dr. Doleschall Mártonnak, Dr. Grolmusz Vincének, Dr. Molnár Ágnesnek, Dr. Nyíró Gábornak, Dr. Perge Pálnak, Szabó Borbálának, és Benkő Mariann-nak** a sok szakmai és nem-szakmai beszélgetést, nevetést, szeretetet és barátságot.

Köszönöm a segítséget a Semmelweis Egyetem Molekuláris Gasztroenterológiai Laboratórium munkatársainak, különösen **Kalmár Alexandrának, Barták Barbarának** és **Nagy Zsófiának**, hogy bármilyen kérdéssel fordulhattam hozzájuk, és mindig szeretettel fogadtak.

Köszönetemet szeretném kifejezni továbbá korábbi TDK témavezetőmnek **Dr. Gócza Elennek**, aki megismertette és megszerettette velem a laboratóriumi munkát, és **Dr. Orbán Tamásnak**, akitől az eddigi pályám során sok hasznos tanácsot és támogatást kaptam.

Köszönöm **Dr. Tóke Judit** és **Udvardyné Dr. Galamb Orsolya** munkahelyi opponenseknek az alapos és gondos bírálatot. Lényeglátó kritikai megjegyzéseik és bölcs tanácsaik nagyban segítettek végső dolgozatom elkészítését.

Végül pedig szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik esetleg nem kerültek név szerint említésre, de bármilyen módon segítettek vagy könnyítették a munkámat.

Legfőképpen pedig köszönöm a **férjemnek** a hosszú évek során nyújtott segítségét és türelmét. Köszönöm, hogy minden egyes pillanatban mellettem állt és támogatott, nélküle soha nem jutottam volna el idáig. Köszönöm a **szüleim, nagynéném, testvéreim** és **barátaim** támogatását, különösen azokét, akik akkor is biztattak, amikor a legnagyobb szükségem volt rá.

XII. MELLÉKLETEK

1. kiegészítő táblázat – Az újgenerációs szekvenálással azonosított mitochondriális variánsok – A táblázatban bemutatom az általam azonosított 496 variáns adatait, és összehasonlítom azt a HmtDB adatbázisban található szintén hypophysis adenomákban leírt variánsokkal. Az általam azonosított variánsok közül 414 volt teljesen új. Ref: referencia allél, Var: variáns allél (Németh és mtsai 2019)

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_28	D-loop/NA	A	C	6	új		
chrM_72	D-loop/NA	T	C	2	új		
chrM_73	D-loop/NA	A	G	22		G-A	10
chrM_146	D-loop/NA	T	C	2		C-T	16
chrM_150	D-loop/NA	C	T	3		C-T	2
chrM_152	D-loop/NA	T	C	9		C-T	14
chrM_183	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_185	D-loop/NA	G	A	4	új		
chrM_188	D-loop/NA	A	G	2	új		
chrM_189	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_195	D-loop/NA	T	C	8		C-T	18
chrM_199	D-loop/NA	T	C	1	új		
chrM_204	D-loop/NA	T	C	2		T-C	1
chrM_207	D-loop/NA	G	A	2	új		
chrM_228	D-loop/NA	G	A	5	új		
chrM_235	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_239	D-loop/NA	T	C	1	új		
chrM_247	D-loop/NA	GA	G	1		A-G	19
chrM_263	D-loop/NA	A	G	43	új		
chrM_295	D-loop/NA	C	T	5		C-T	3
chrM_302	D-loop/NA	A	AC	3	új		
chrM_310	D-loop/NA	T	TC	38		T-C	1
chrM_316	D-loop/NA	G	A,C	2		G-C	1
chrM_317	D-loop/NA	CTT	C	1	új		
chrM_320	D-loop/NA	CTGG	C	1	új		
chrM_368	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_374	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_385	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_456	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_462	D-loop/NA	C	T	6		C-T	3

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_489	D-loop/NA	T	C	8		T-N	1
chrM_497	D-loop/NA	C	T	1		C-T	2
chrM_499	D-loop/NA	G	A	2		G-N	1
chrM_513	D-loop/NA	GCA	G	8		G-N	1
chrM_545	D-loop/NA	G	C	2		G-N	1
chrM_564	D-loop/NA	G	A	1		G-N	1
chrM_593	tRNA/TRNF	T	TC	1		T-N	1
chrM_709	rRNA/RNR1	G	A	8		G-A	1
chrM_750	rRNA/RNR1	A	G	43	új		
chrM_866	rRNA/RNR1	A	G	1	új		
chrM_877	rRNA/RNR1	G	A	1	új		
chrM_879	rRNA/RNR1	T	C	2	új		
chrM_930	rRNA/RNR1	G	A	3	új		
chrM_933	rRNA/RNR1	G	A	1	új		
chrM_951	rRNA/RNR1	G	A	1	új		
chrM_955	rRNA/RNR1	A	AC	3	új		
chrM_961	rRNA/RNR1	T	G	1	új		
chrM_989	rRNA/RNR1	T	G	1	új		
chrM_992	rRNA/RNR1	TA	T	3	új		
chrM_1030	rRNA/RNR1	G	A	1	új		
chrM_1189	rRNA/RNR1	T	C	1		T-C	2
chrM_1438	rRNA/RNR1	A	G	43	új		
chrM_1465	rRNA/RNR1	C	G	4	új		
chrM_1591	rRNA/RNR1	C	A	1	új		
chrM_1718	rRNA/RNR2	A	AG	1	új		
chrM_1719	rRNA/RNR2	G	A	2	új		
chrM_1811	rRNA/RNR2	A	G	3		A-G	2
chrM_1824	rRNA/RNR2	T	C	1	új		
chrM_1888	rRNA/RNR2	G	A	7	új		
chrM_1893	rRNA/RNR2	A	C	1	új		
chrM_1958	rRNA/RNR2	G	A	1	új		
chrM_2129	STS/RNR2	GA	G	26	új		
chrM_2135	STS/RNR2	AC	A	1	új		
chrM_2149	STS/RNR2	G	A	1	új		
chrM_2203	STS/RNR2	G	A	1	új		
chrM_2245	rRNA/RNR2	A	G	1	új		
chrM_2387	rRNA/RNR2	T	C	1	új		
chrM_2392	rRNA/RNR2	T	C	1		T-Y	1

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_2407	rRNA/RNR2	T	C	1	új		
chrM_2416	rRNA/RNR2	T	C	1	új		
chrM_2487	rRNA/RNR2	A	C	18	új		
chrM_2523	rRNA/RNR2	C	A	1	új		
chrM_2525	rRNA/RNR2	C	A	13	új		
chrM_2623	rRNA/RNR2	A	G	1	új		
chrM_2702	rRNA/RNR2	G	A	1	új		
chrM_2706	rRNA/RNR2	A	G	18		G-A	19
chrM_2772	rRNA/RNR2	C	T	1	új		
chrM_2807	rRNA/RNR2	T	G	0	új		
chrM_2817	rRNA/RNR2	G	A	1	új		
chrM_2850	rRNA/RNR2	T	C	1	új		
chrM_3010	rRNA/RNR2	G	A	11		G-A	4
chrM_3127	rRNA/RNR2	G	A	1	új		
chrM_3197	rRNA/RNR2	T	C	3		T-C	2
chrM_3240	tRNA/TRNL1	C	G	2	új		
chrM_3264	tRNA/TRNL1	T	C	1	új		
chrM_3314	CDS/ND1	T	A,C	7	új		
chrM_3317	CDS/ND1	CCA	C	6	új		
chrM_3380	CDS/ND1	G	A	2	új		
chrM_3392	CDS/ND1	G	A	2	új		
chrM_3414	CDS/ND1	C	G	9	új		
chrM_3480	CDS/ND1	A	G	1		A-G	2
chrM_3492	CDS/ND1	A	C	5	új		
chrM_3511	CDS/ND1	A	C	2	új		
chrM_3552	CDS/ND1	T	A	1	új		
chrM_3565	CDS/ND1	A	AC	2	új		
chrM_3604	CDS/ND1	CTAG	C	7	új		
chrM_3670	CDS/ND1	G	A	1	új		
chrM_3748	CDS/ND1	AT	A	1	új		
chrM_3796	CDS/ND1	A	G	2	új		
chrM_3832	CDS/ND1	C	T	1	új		
chrM_3915	CDS/ND1	G	A	1	új		
chrM_3918	CDS/ND1	G	A	1	új		
chrM_3997	CDS/ND1	A	AC	1	új		
chrM_4000	CDS/ND1	A	AG	1	új		
chrM_4002	CDS/ND1	TATAAT A	T	1	új		

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_4048	CDS/ND1	G	A	1	új		
chrM_4071	CDS/ND1	C	T	1	új		
chrM_4086	CDS/ND1	C	T	1	új		
chrM_4122	CDS/ND1	A	G	1	új		
chrM_4155	CDS/ND1	C	A	2		C-T	1
chrM_4164	CDS/ND1	A	G	1	új		
chrM_4216	CDS/ND1	T	C	13		T-C	4
chrM_4227	CDS/ND1	A	G	1	új		
chrM_4401	STS/NA	A	G	1	új		
chrM_4435	tRNA/TRNM	A	G	1	új		
chrM_4558	CDS/ND2	G	A	1	új		
chrM_4580	CDS/ND2	G	A	2	új		
chrM_4639	CDS/ND2	T	C	1	új		
chrM_4646	CDS/ND2	T	C	2	új		
chrM_4715	CDS/ND2	A	G	1	új		
chrM_4720	CDS/ND2	G	A	1	új		
chrM_4727	CDS/ND2	A	G	1	új		
chrM_4755	CDS/ND2	T	C	1	új		
chrM_4769	CDS/ND2	A	G	42	új		
chrM_4793	CDS/ND2	A	G	1	új		
chrM_4796	CDS/ND2	C	T	1		C-T	1
chrM_4820	CDS/ND2	G	A	1	új		
chrM_4917	CDS/ND2	A	G	7	új		
chrM_4937	CDS/ND2	T	C	1	új		
chrM_4966	CDS/ND2	GT	G	2	új		
chrM_4974	CDS/ND2	G	A	1	új		
chrM_5031	CDS/ND2	G	A	1	új		
chrM_5060	CDS/ND2	C	A	3	új		
chrM_5147	CDS/ND2	G	A	3	új		
chrM_5186	CDS/ND2	A	G	2	új		
chrM_5198	CDS/ND2	A	G	2	új		
chrM_5228	CDS/ND2	C	G	3	új		
chrM_5262	CDS/ND2	G	A	1	új		
chrM_5263	CDS/ND2	C	T	1	új		
chrM_5293	CDS/ND2	G	A	1	új		
chrM_5325	CDS/ND2	A	G	1	új		
chrM_5334	CDS/ND2	A	G	1	új		
chrM_5351	CDS/ND2	A	G	1	új		

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_5460	CDS/ND2	G	A	1		G-A	2
chrM_5471	CDS/ND2	G	A	2	új		
chrM_5530	tRNA/TRNW	C	A	1	új		
chrM_5687	tRNA/TRNN	CT	C	6	új		
chrM_5691	tRNA/TRNN	GT	G	4	új		
chrM_5693	tRNA/TRNN	TA	T	2	új		
chrM_5703	tRNA/TRNN	G	A	1	új		
chrM_5801	tRNA/TRNC	T	C	1	új		
chrM_5906	CDS/COX1	G	A	1	új		
chrM_5999	CDS/COX1	T	C	2	új		
chrM_6047	CDS/COX1	A	G	2	új		
chrM_6050	CDS/COX1	T	C	1	új		
chrM_6100	CDS/COX1	T	C	1	új		
chrM_6126	CDS/COX1	A	G	1	új		
chrM_6221	CDS/COX1	T	C	2	új		
chrM_6227	CDS/COX1	T	C	1	új		
chrM_6371	STS/COX1	C	T	2	új		
chrM_6386	STS/COX1	C	T	1	új		
chrM_6425	STS/COX1	T	C	1	új		
chrM_6455	STS/COX1	C	T	1	új		
chrM_6464	STS/COX1	C	A	1	új		
chrM_6554	STS/COX1	C	T	1	új		
chrM_6556	STS/COX1	C	A	0	új		
chrM_6626	STS/COX1	T	C	2	új		
chrM_6680	STS/COX1	T	C	1	új		
chrM_6741	STS/COX1	AT	A	1	új		
chrM_6756	STS/COX1	T	C	1	új		
chrM_6768	STS/COX1	G	A	1	új		
chrM_6776	STS/COX1	T	C	1	új		
chrM_6779	STS/COX1	A	G	1	új		
chrM_6791	STS/COX1	A	G	2	új		
chrM_6845	STS/COX1	C	T	7	új		
chrM_6851	STS/COX1	C	T	1	új		
chrM_7022	CDS/COX1	T	C	1	új		
chrM_7024	CDS/COX1	T	C	1	új		
chrM_7028	CDS/COX1	C	T	24		T-C	11
chrM_7080	CDS/COX1	T	C	1		T-C	1
chrM_7162	STS/NA	G	A	1	új		

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_7196	STS/NA	C	A	1	új		
chrM_7270	STS/NA	T	C	1	új		
chrM_7299	STS/NA	A	G	1	új		
chrM_7300	STS/NA	T	G	0	új		
chrM_7303	STS/NA	T	G	0	új		
chrM_7312	STS/NA	T	G	0	új		
chrM_7315	STS/NA	T	G	0	új		
chrM_7559	STS/NA	A	G	1	új		
chrM_7601	STS/NA	CA	C	23	új		
chrM_7603	STS/NA	AG	A	4	új		
chrM_7604	STS/NA	GT	G	3	új		
chrM_7621	STS/NA	T	C	1	új		
chrM_7645	STS/NA	T	C	1	új		
chrM_7684	STS/NA	T	C	1	új		
chrM_7706	STS/NA	GC	G	1	új		
chrM_7707	STS/NA	C	G	18	új		
chrM_7709	STS/NA	CT	C	5	új		
chrM_7714	STS/NA	C	T	1	új		
chrM_7789	STS/NA	G	A	1	új		
chrM_7819	STS/NA	C	G	1	új		
chrM_7853	STS/NA	G	A	1	új		
chrM_7879	STS/NA	AT	A	1	új		
chrM_7910	STS/NA	G	A	1	új		
chrM_7963	STS/NA	A	G	1	új		
chrM_8014	STS/NA	A	T	1	új		
chrM_8020	STS/NA	G	A	1	új		
chrM_8026	STS/NA	A	T	1	új		
chrM_8153	STS/NA	G	A	1	új		
chrM_8155	STS/NA	G	A	2	új		
chrM_8270	STS/NA	C	CACCC CCTCT	1	új		
chrM_8277	STS/NA	T	C	1	új		
chrM_8278	STS/NA	CTA	C	1	új		
chrM_8279	STS/NA	T	C	1	új		
chrM_8280	STS/NA	AC	A	1	új		
chrM_8281	STS/NA	C	A	18	új		
chrM_8286	STS/NA	T	C	1	új		
chrM_8287	STS/NA	CTAGAG	C	1		C-Y	1

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_8308	STS/NA	A	G	1	új		
chrM_8334	STS/NA	G	C	1	új		
chrM_8348	STS/NA	A	G	2	új		
chrM_8387	STS/NA	G	A	1	új		
chrM_8431	STS/NA	C	T	1	új		
chrM_8440	STS/NA	A	G	1	új		
chrM_8448	STS/NA	T	C	1	új		
chrM_8473	STS/NA	T	C	1		T-C	1
chrM_8482	STS/NA	A	C	4	új		
chrM_8483	STS/NA	A	T	4	új		
chrM_8503	STS/NA	T	C	2	új		
chrM_8521	STS/NA	A	G	1	új		
chrM_8584	CDS/ATP6	G	A	1	új		
chrM_8596	CDS/ATP6	A	G	1	új		
chrM_8697	CDS/ATP6	G	A	7	új		
chrM_8701	CDS/ATP6	A	G	2		G-A	19
chrM_8786	CDS/ATP6	TC	T	2	új		
chrM_8788	CDS/ATP6	CT	C	2	új		
chrM_8789	CDS/ATP6	T	C	1	új		
chrM_8818	CDS/ATP6	C	T	2	új		
chrM_8860	CDS/ATP6	A	G	42	új		
chrM_8869	CDS/ATP6	A	G	1	új		
chrM_8926	CDS/ATP6	C	T	1	új		
chrM_8950	CDS/ATP6	G	A	1	új		
chrM_9033	CDS/ATP6	A	G	1	új		
chrM_9044	CDS/ATP6	T	C	0	új		
chrM_9055	CDS/ATP6	G	A	0		G-A	2
chrM_9110	CDS/ATP6	T	C	1	új		
chrM_9128	CDS/ATP6	T	C	1	új		
chrM_9156	CDS/ATP6	A	G	1	új		
chrM_9182	CDS/ATP6	G	A	1	új		
chrM_9380	STS/COX3	G	A	1	új		
chrM_9398	STS/COX3	A	G	1	új		
chrM_9445	CDS/COX3	GA	G	1	új		
chrM_9477	CDS/COX3	G	A	2		G-A	2
chrM_9492	CDS/COX3	G	A	1	új		
chrM_9520	CDS/COX3	G	A	1	új		
chrM_9527	CDS/COX3	C	T	1	új		

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_9540	CDS/COX3	T	C	2		C-T	19
chrM_9545	CDS/COX3	A	G	1	új		
chrM_9548	CDS/COX3	G	A	1	új		
chrM_9554	CDS/COX3	G	A	1	új		
chrM_9575	CDS/COX3	G	A	1	új		
chrM_9698	CDS/COX3	T	C	1		T-C	2
chrM_9819	CDS/COX3	G	A	1	új		
chrM_9824	CDS/COX3	T	C	1	új		
chrM_9899	CDS/COX3	T	C	1	új		
chrM_9949	CDS/COX3	T	C	1	új		
chrM_9966	CDS/COX3	G	A	1		G-A	1
chrM_10014	tRNA/TRNG	G	A	1	új		
chrM_10084	CDS/ND3	T	C	2	új		
chrM_10162	CDS/ND3	C	A	8	új		
chrM_10177	CDS/ND3	G	A	1	új		
chrM_10192	CDS/ND3	C	T	1	új		
chrM_10217	CDS/ND3	A	G	1	új		
chrM_10253	CDS/ND3	T	C	1	új		
chrM_10316	CDS/ND3	AAT	A	1	új		
chrM_10334	CDS/ND3	CT	C	5	új		
chrM_10334	CDS/ND3	C	T	1	új		
chrM_10337	CDS/ND3	AT	A	1	új		
chrM_10345	CDS/ND3	T	C	1	új		
chrM_10360	CDS/ND3	G	A	1	új		
chrM_10394	CDS/ND3	C	T	1	új		
chrM_10398	CDS/ND3	A	G	9		G-A	19
chrM_10400	CDS/ND3	C	T	2	új		
chrM_10463	tRNA/TRNR	T	C	7	új		
chrM_10550	CDS/ND4L	A	G	1		A-G	2
chrM_10630	CDS/ND4L	T	C	1	új		
chrM_10813	CDS/ND4	CAA	C	1	új		
chrM_10873	CDS/ND4	T	C	2		C-T	19
chrM_10946	CDS/ND4	A	AC	1	új		
chrM_10948	CDS/ND4	C	T	1	új		
chrM_11009	CDS/ND4	T	C	1	új		
chrM_11016	CDS/ND4	G	A	1	új		
chrM_11031	CDS/ND4	GA	G	2	új		
chrM_11150	CDS/ND4	G	A	1	új		

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_11168	CDS/ND4	G	T	1	új		
chrM_11169	CDS/ND4	G	A	1	új		
chrM_11203	CDS/ND4	C	T	1	új		
chrM_11251	CDS/ND4	A	G	13		A-G	3
chrM_11253	CDS/ND4	T	C	1	új		
chrM_11299	CDS/ND4	T	C	1		T-C	2
chrM_11307	CDS/ND4	C	G	2	új		
chrM_11332	CDS/ND4	C	T	2	új		
chrM_11337	CDS/ND4	A	G	1	új		
chrM_11377	CDS/ND4	G	A	1	új		
chrM_11402	CDS/ND4	T	C	1	új		
chrM_11423	CDS/ND4	G	A	1	új		
chrM_11465	CDS/ND4	T	C	2	új		
chrM_11467	CDS/ND4	A	G	5		A-G	4
chrM_11652	CDS/ND4	TA	T	2	új		
chrM_11655	CDS/ND4	CA	C	0	új		
chrM_11656	CDS/ND4	AG	A	1	új		
chrM_11719	CDS/ND4	G	A	21		A-G	10
chrM_11812	CDS/ND4	A	G	4	új		
chrM_11832	CDS/ND4	G	A	1	új		
chrM_11866	CDS/ND4	AC	A	1	új		
chrM_11878	CDS/ND4	T	C	2	új		
chrM_11914	CDS/ND4	G	A	1		A-G	19
chrM_11959	CDS/ND4	A	G	1	új		
chrM_12103	CDS/ND4	C	A	1	új		
chrM_12127	CDS/ND4	G	A	1	új		
chrM_12161	tRNA/TRNH	T	C	1	új		
chrM_12308	tRNA/TRNL2	A	G	5		A-G	5
chrM_12372	CDS/ND5	G	A	5		G-A	5
chrM_12373	CDS/ND5	A	G	1	új		
chrM_12390	CDS/ND5	C	T	1	új		
chrM_12405	CDS/ND5	C	T	1	új		
chrM_12417	CDS/ND5	CA	C,CAA	4	új		
chrM_12458	CDS/ND5	CA	C	2	új		
chrM_12543	CDS/ND5	CACAAC CCAA	C	1	új		
chrM_12596	CDS/ND5	TA	T	2	új		
chrM_12612	CDS/ND5	A	G	7		A-G	3

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_12633	CDS/ND5	C	A	3	új		
chrM_12634	CDS/ND5	A	G	1		A-G	1
chrM_12645	CDS/ND5	C	T	1	új		
chrM_12684	CDS/ND5	G	A	7	új		
chrM_12705	CDS/ND5	C	T	10		T-C	18
chrM_12716	CDS/ND5	C	T	1	új		
chrM_12764	CDS/ND5	G	A	1	új		
chrM_12773	CDS/ND5	G	A	1	új		
chrM_12810	CDS/ND5	A	G	1	új		
chrM_12811	CDS/ND5	T	C	2	új		
chrM_12937	CDS/ND5	A	G	2	új		
chrM_12957	CDS/ND5	T	C	1	új		
chrM_13036	CDS/ND5	C	T	1	új		
chrM_13062	CDS/ND5	A	G	3	új		
chrM_13063	CDS/ND5	G	A	1	új		
chrM_13095	CDS/ND5	T	C	6	új		
chrM_13102	CDS/ND5	G	A	1	új		
chrM_13105	CDS/ND5	A	G	6		G-A	19
chrM_13117	CDS/ND5	A	G	1	új		
chrM_13158	CDS/ND5	A	G	2	új		
chrM_13169	CDS/ND5	T	C	1	új		
chrM_13230	CDS/ND5	CA	C	1	új		
chrM_13263	CDS/ND5	A	G	1	új		
chrM_13271	CDS/ND5	T	C	1	új		
chrM_13304	CDS/ND5	AC	A	2	új		
chrM_13336	CDS/ND5	T	C	1	új		
chrM_13368	CDS/ND5	G	A	7	új		
chrM_13385	CDS/ND5	T	C	1	új		
chrM_13437	CDS/ND5	T	A	14	új		
chrM_13441	CDS/ND5	A	C	25	új		
chrM_13528	CDS/ND5	A	G	1	új		
chrM_13563	CDS/ND5	AT	A	8	új		
chrM_13565	CDS/ND5	CT	C	1	új		
chrM_13567	CDS/ND5	AT	A	8	új		
chrM_13570	CDS/ND5	AC	A	6	új		
chrM_13613	CDS/ND5	T	C	1	új		
chrM_13617	CDS/ND5	T	C	2		T-C	2
chrM_13681	CDS/ND5	A	G	1	új		

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_13708	CDS/ND5	G	A	8		G-A	4
chrM_13759	CDS/ND5	G	A	1		G-A	1
chrM_13788	CDS/ND5	C	A	1	új		
chrM_13823	CDS/ND5	T	C	1	új		
chrM_13824	CDS/ND5	A	G	1	új		
chrM_13825	CDS/ND5	G	A	1	új		
chrM_13834	CDS/ND5	A	G	1	új		
chrM_13846	CDS/ND5	C	A	1	új		
chrM_13857	CDS/ND5	A	G	1	új		
chrM_13965	CDS/ND5	T	C	1	új		
chrM_13966	CDS/ND5	A	G	2	új		
chrM_13984	CDS/ND5	CT	C	1	új		
chrM_14003	CDS/ND5	C	T	1	új		
chrM_14016	CDS/ND5	G	A	1	új		
chrM_14110	CDS/ND5	T	C	2	új		
chrM_14167	CDS/ND6	C	T	1		C-T	2
chrM_14233	CDS/ND6	A	G	4	új		
chrM_14318	CDS/ND6	T	C	1	új		
chrM_14319	CDS/ND6	T	C	1	új		
chrM_14344	CDS/ND6	A	G	1	új		
chrM_14346	CDS/ND6	C	A	1	új		
chrM_14435	CDS/ND6	T	C	1	új		
chrM_14470	CDS/ND6	T	C	2	új		
chrM_14587	CDS/ND6	AC	A	1	új		
chrM_14588	CDS/ND6	C	A	1	új		
chrM_14620	CDS/ND6	C	T	2	új		
chrM_14687	tRNA/TRNE	A	G	1	új		
chrM_14766	CDS/CYTB	C	T	22		T-C	19
chrM_14783	CDS/CYTB	T	C	2	új		
chrM_14793	CDS/CYTB	A	G	2	új		
chrM_14798	CDS/CYTB	T	C	6		T-C	3
chrM_14893	CDS/CYTB	A	G	1	új		
chrM_14905	CDS/CYTB	G	A	7	új		
chrM_14925	CDS/CYTB	CA	C	10	új		
chrM_14927	CDS/CYTB	AC	A	26	új		
chrM_14929	CDS/CYTB	C	CTAG	5	új		
chrM_14971	CDS/CYTB	T	C	1	új		
chrM_15043	CDS/CYTB	G	A	3	új		

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_15050	CDS/CYTB	CT	C	2	új		
chrM_15052	CDS/CYTB	AT	A	2	új		
chrM_15054	CDS/CYTB	AT	A	1	új		
chrM_15062	CDS/CYTB	T	C	1	új		
chrM_15172	CDS/CYTB	G	A	1	új		
chrM_15204	CDS/CYTB	TC	T	0	új		
chrM_15218	CDS/CYTB	A	G	2		A-G	1
chrM_15245	CDS/CYTB	G	A	1	új		
chrM_15249	CDS/CYTB	A	G	1	új		
chrM_15299	CDS/CYTB	T	C	1	új		
chrM_15301	CDS/CYTB	G	A	2	új		
chrM_15314	CDS/CYTB	G	A	1	új		
chrM_15322	CDS/CYTB	A	G	1	új		
chrM_15323	CDS/CYTB	G	A	1	új		
chrM_15326	CDS/CYTB	A	G	43	új		
chrM_15331	CDS/CYTB	C	T	1	új		
chrM_15343	CDS/CYTB	CT	C	1	új		
chrM_15452	CDS/CYTB	C	A	13		C-A	3
chrM_15457	CDS/CYTB	C	T	1	új		
chrM_15487	CDS/CYTB	A	T	1	új		
chrM_15607	CDS/CYTB	A	G	7	új		
chrM_15620	CDS/CYTB	CT	C	3	új		
chrM_15693	CDS/CYTB	T	C	2	új		
chrM_15700	CDS/CYTB	C	T	1	új		
chrM_15732	CDS/CYTB	C	G	1	új		
chrM_15734	CDS/CYTB	G	A	2	új		
chrM_15750	CDS/CYTB	T	C	1	új		
chrM_15764	CDS/CYTB	G	A	1	új		
chrM_15873	CDS/CYTB	T	C	1	új		
chrM_15904	tRNA/TRNT	C	T	2	új		
chrM_15927	tRNA/TRNT	G	A	1	új		
chrM_15928	tRNA/TRNT	G	A	7	új		
chrM_16036	D-loop/NA	G	A	1	új		
chrM_16067	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_16069	D-loop/NA	C	T	6		C-T	4
chrM_16086	D-loop/NA	T	C	1	új		
chrM_16092	D-loop/NA	T	C	1	új		
chrM_16093	D-loop/NA	T	C	2		T-C	1

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_16126	D-loop/NA	T	C	13		T-C	4
chrM_16129	D-loop/NA	G	A	5		A-G	19
chrM_16134	D-loop/NA	C	T	2	új		
chrM_16148	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_16162	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_16163	D-loop/NA	A	G	3	új		
chrM_16164	D-loop/NA	A	G	0	új		
chrM_16182	D-loop/NA	A	AC	1	új		
chrM_16183	D-loop/NA	A	C	2		A-C	1
chrM_16185	D-loop/NA	C	CT	1	új		
chrM_16186	D-loop/NA	C	T	2	új		
chrM_16189	D-loop/NA	T	C	9		C-T	19
chrM_16192	D-loop/NA	C	T	3		C-T	1
chrM_16193	D-loop/NA	C	T	1		C-T	1
chrM_16194	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_16209	D-loop/NA	T	C	1	új		
chrM_16221	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_16223	D-loop/NA	C	T	4		T-C	14
chrM_16224	D-loop/NA	T	C	1		T-C	2
chrM_16234	D-loop/NA	C	T	2	új		
chrM_16239	D-loop/NA	C	T	1		C-T	1
chrM_16240	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_16256	D-loop/NA	C	T	1		C-T	1
chrM_16261	D-loop/NA	C	T	2		C-T	3
chrM_16263	D-loop/NA	T	C	1	új		
chrM_16265	D-loop/NA	A	T	1	új		
chrM_16266	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_16270	D-loop/NA	C	T	3		C-T	2
chrM_16278	D-loop/NA	C	T	2		T-C	19
chrM_16287	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_16288	D-loop/NA	T	C	1	új		
chrM_16293	D-loop/NA	A	G	0	új		
chrM_16294	D-loop/NA	C	T	8	új		
chrM_16296	D-loop/NA	C	T	3	új		
chrM_16297	D-loop/NA	T	C	1	új		
chrM_16298	D-loop/NA	T	C	4	új		
chrM_16302	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_16304	D-loop/NA	T	C	4		T-C	1

Pozíció	Típus/gén	Saját vizsgálatunkban előforduló variánsok (n=44)				HmtDB adatbázisban lévő variánsok (n=19)	
		Ref	Var	Érintett minták száma	Hypophysis adenomában új variánsok	Azonosított nukleotid csere	Érintett minták száma
chrM_16311	D-loop/NA	T	C	4		C-T	19
chrM_16327	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_16354	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_16355	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_16356	D-loop/NA	T	C	5		T-C	1
chrM_16362	D-loop/NA	T	C	3		T-C	1
chrM_16366	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_16399	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_16482	D-loop/NA	A	G	1	új		
chrM_16519	D-loop/NA	T	C	31		C-T	19
chrM_16526	D-loop/NA	G	A	1	új		
chrM_16527	D-loop/NA	C	T	1	új		
chrM_16545	D-loop/NA	T	C	2	új		