

**Egyetemi Doktori (PhD) Értekezés**

**Warburg effektusban szerepet játszó mikro-RNS-ek, valamint a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek szerepe felnőttkori hematológiai malignus betegségek patogenezisében**

**Dr. Gaál Zsuzsanna**

**Témavezető: Prof. Dr. Csernoch László**



**Debreceni Egyetem**

**Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola**

**Debrecen, 2017**

## Tartalomjegyzék

1. Összefoglalás	5
2. Summary	7
3. Rövidítések jegyzéke	9
4. Bevezetés	11
5. Irodalmi áttekintés	13
5.1 Az epigenetikai szabályozás főbb jellemzői	13
5.2 A DNS-metilációs mintázat szabályozása	14
5.2.1 DNS-metiláció	14
5.2.2 DNS-demetiláció és DNS-hidroximetiláció	14
5.3 A DNS-metilációs mintázatot szabályozó enzimek szerepe a hemopoézis és a karcinogenezis során	15
5.4 A DNS-metilációs mintázatot érintő változások hematológiai malignus betegségekben. Klinikai alkalmazások	16
5.5 Hiszton modifikáció és a hiszton kódot meghatározó enzimek	16
5.5.1 Hiszton acetiláció és deacetiláció	17
5.5.2 Hiszton metiláció és demetiláció	19
5.5.3 A hiszton modifikáció hemopoézis és karcinogenezis során betöltött szerepe	20
5.5.4 Hiszton modifikációt érintő változások hematológiai malignus betegségekben. Klinikai alkalmazások	21
5.6 Mikro-RNS-ek	22
5.6.1 A mikro-RNS-ek biogenezeise és nomenklatúrája	22
5.6.2 A mikro-RNS-ek hatásmechanizmusa és targetjei. Mikro-RNS-ek által szabályozott fiziológiás sejtfolyamatok	23
5.6.3 A mikro-RNS-ek hemopoézis során betöltött szerepe	23
5.6.4 A mikro-RNS-ek szerepe a karcinogenezis során	24
5.6.5 Megváltozott mikro-RNS expressziós szintek a leukémia egyes típusaiban	26
5.6.6 A mikro-RNS-ek lehetséges klinikai alkalmazásai az onkohematológiában	27
5.7 Epigenetika és metabolizmus kölcsönös egymásra hatása	29
5.8 A Warburg effektus	29

5.9	Kölcsönhatások citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések, valamint epigenetikai mechanizmusok között	33
5.10	Epigenetikai és metabolikus eltéréseket célzó terápiás szerek kombinációja egymással és konvencionális kemoterápiás szerekkel	35
5.11	Epigenetikai és metabolikus eltérések jelentősége a leukémia patogenezisében	36
6.	Célkitűzések	38
7.	Módszerek	40
7.1	Betegek és felhasznált minták	40
7.2	Etikai engedély	40
7.3	Laboratóriumi módszerek	41
7.3.1	Mintapreparálás Western blot analízishez	41
7.3.2	Western blot analízis és denzitometria	45
7.3.3	RNS-izolálás és az izolált RNS koncentrációjának meghatározása	46
7.3.4	Reverz transzkripció és kvantitatív polimeráz lánreakció	46
7.3.5	A qPCR adatok kiértékelése	47
7.4	Statisztikai analízis, klaszteranalízis és ábratervezés	48
8.	Eredmények	49
8.1	Hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintjének vizsgálata hematológiai malignus betegségekben	49
8.1.1	A HDAC4 enzim fehérjeszintű expressziós szintjének vizsgálata hematológiai malignus betegségekben	53
8.1.2	A SIRT6 enzim fehérjeszintű expressziós szintjének vizsgálata hematológiai malignus betegségekben	54
8.2	Szoros korreláció a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintje között	55
8.3	A HDAC4 és a SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintjének összehasonlítása hematológiai malignus betegségekben szenvedő betegek alcsoportjai között	56
8.4	Mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintje közötti korrelációk vizsgálata	58
8.4.1	Mikro-RNS-ek expressziós szintje közötti korrelációk	60
8.4.2	A HDAC4 és mikro-RNS-ek expressziós szintje közötti korrelációk	65
8.4.3	A SIRT6 és mikro-RNS-ek expressziós szintje közötti korrelációk	67

8.5 Mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjének korrelációja a diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszámmal hematológiai malignus betegségekben	68
8.6 A vizsgált mikro-RNS-ek, valamint a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintjének összehasonlító elemzése hematológiai malignus betegségek esetén, és azon belül az akut mieloid leukémia egyes alcsoportjai között	69
8.7 Mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjének változása FAB M5 altípusú AML kezelésének első négy hetében	77
9. Megbeszélés	78
10. Főbb új tudományos eredmények	88
11. Irodalomjegyzék	90
12. Saját közlemények jegyzéke	102
13. Tárgyszavak	106
14. Önálló munka jegyzéke	107
15. Köszönetnyilvánítás	108

## 1. Összefoglalás

A hematológiai malignus betegségek patogeneziséhez igazoltan hozzájárulnak a DNS-metilációs mintázatban, a hisztonkódban, illetve a mikro-RNS-ek expressziós szintjében bekövetkező változások, továbbá a malignusan transzformálódott sejtek metabolizmusának Warburg effektusként ismert, jellegzetes átalakulása. Az epigenetikai és metabolikus eltérések gyakran már a betegség korai stádiumában kialakuló, reverzibilis változások, ezért ígéretes terápiás célpontok.

Munkánk során hematológiai malignus betegségekből, elsősorban akut mieloid leukémiában szenvedő felnőtt betegek csontvelő mintáiban vizsgáltuk mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjét Western blot analízis, valamint reverz transzkripció és kvantitatív polimeráz láncreakció segítségével. Vizsgálati panelünkben szerepelt a miR-378\*, a miR-23b, illetve a miR-26a, melyek szolid tumorokban igazoltan szerepet játszanak a Warburg effektus kialakulásában. Vizsgáltuk három további, hematológiai malignus betegségekből jól karakterizált mikro-RNS, a tumorszuppresszor miR-124, az onkogén miR-155, valamint a mieloid sejtek differenciációjának szabályozásáért felelős miR-125b expressziós szintjét. A hiszton deacetiláz enzimek közül a glikolízis és a hemopoézis epigenetikai szabályozásáért egyaránt felelős, NAD<sup>+</sup>-függő SIRT6, továbbá a NAD<sup>+</sup>-független HDAC4 expresszióját tanulmányoztuk, melynek up-regulációja gyermekkori ALL-ben kemorezisztenciával és a betegség kedvezőtlen kimenetelével társul.

Legfőbb célkitűzéseink a miR-378\*, miR-23b, miR-26a, SIRT6 és HDAC4 felnőttkori hematológiai malignus betegségek patogenezisében betöltött szerepének tisztázása, valamint a NAD<sup>+</sup>-függő és NAD<sup>+</sup>-független hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintje közötti összefüggés tanulmányozása volt.

Vizsgálataink során erős pozitív korrelációt észleltünk a SIRT6 és a HDAC4 fehérjeszintű expressziós szintje között, ami a NAD<sup>+</sup>-függő és NAD<sup>+</sup>-független hiszton deacetiláz enzimek szinergisztikus szerepét jelzi a patogenezisben. A szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott miR-378\*, miR-23b és miR-26a expressziós szintje pozitívan korrelált egymással, a hemopoézis szabályozásában jelentős miR-125b és az onkogén miR-155 szintjével, valamint negatívan a tumorszuppresszor miR-124 szintjével. Ezen eredményeink a miR-378\*, miR-23b és miR-26a felnőttkori hematológiai malignus betegségek patogenezisében betöltött szerepét igazolják. Pozitív korrelációt észleltünk a SIRT6 mRNS és a miR-26a szintje között, továbbá a HDAC4 mRNS expressziós szintje pozitívan korrelált a miR-378\*, miR-23b, miR-26a, miR-125b és a miR-155 szintjével.

Mindkét vizsgált hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje negatívan korrelált a tumorsuppresszor miR-124 szintjével. Mindezek alapján a SIRT6 és a HDAC4 onkogén szerepe egyaránt felvetődik. Közülük a HDAC4 patogenezisben betöltött szerepéhez valószínűbb a Warburg effektust elősegítő metabolikus hatások hozzájárulása, míg a SIRT6 esetén vélhetően nem a metabolizmusra, hanem a hemopoézisre kifejtett hatás a jelentősebb. A diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszámmal több vizsgált gén expressziós szintje is korrelált. A FAB M5 altípusú AML kezelésének első négy hete során mind a vizsgált hiszton deacetiláz enzimek, mind a mikro-RNS-ek expressziós szintjében változásokat észleltünk, melyek legfontosabb potenciális klinikai alkalmazása az alkalmazott kezelés eredményességének előrejelzése lehet. A vizsgált gének expressziós szintjének az AML egyes alcsoportjai közötti összehasonlítása során statisztikailag szignifikáns különbségeket állapítottunk meg.

Az epigenetikai és metabolikus változások citogenetikai és molekuláris genetikai eltérésekkel történő együttes értékelése által a jövőben létrejöhet egy árnyaltabb prognosztikai rendszer, mely a személyre szabott kezelés elősegítésével a terápiás eredmények javulásához vezethet.

## 2. Summary

It has been confirmed, that changes in the DNA methylation pattern, the histone code, the expression levels of microRNAs and characteristic metabolic alterations referred to as the Warburg effect are all important contributors of the pathogenesis of hematological malignant diseases. Epigenetic and metabolic changes are reversible etiologic factors of leukemia, developing in early stages of the disease, therefore they are promising therapeutic targets.

We investigated the expression levels of microRNAs and histone deacetylase enzymes by Western blot analysis and reverse transcription with quantitative polymerase chain reaction in the bone marrow specimens of adult patients with malignant hematological diseases, principally acute myeloid leukemia. In solid tumors, miR-378\*, miR-23b and miR-26a contribute to the development of the Warburg effect. In addition, we determined the expression level of the tumorsuppressor miR-124, the oncogenic miR-155 and the hemopoiesis regulator miR-125b, which are well-characterized microRNAs in hematological malignant diseases. Among histone deacetylase enzymes, we evaluated the level of the NAD<sup>+</sup>-dependent SIRT6, responsible for the epigenetic regulation of both glycolysis and hemopoiesis, and the NAD<sup>+</sup>-independent HDAC4, which up-regulation is associated with chemoresistance and adverse prognosis in acute lymphoblastic leukemia of the childhood.

Our major aims were to elucidate the role of miR-378\*, miR-23b, miR-26a, SIRT6 and HDAC4 in the pathogenesis of malignant hematological diseases of the adulthood, and to investigate the relationship between the expression levels of NAD<sup>+</sup>-dependent and NAD<sup>+</sup>-independent histone deacetylase enzymes as well.

We observed strong positive correlation between the expression levels of SIRT6 and HDAC4 proteins, that indicates the synergistic pathogenetic role of NAD<sup>+</sup>-dependent and NAD<sup>+</sup>-independent histone deacetylase enzymes. The expression levels of miR-378\*, miR-23b and miR-26a positively correlated with each other, with the level of miR-125b and the oncogenic miR-155, while negative correlation was found with the expression level of the tumorsuppressor miR-124. These results confirm the role of the Warburg effect related miR-378\*, miR-23b and miR-26a in the pathogenesis of hematological malignant diseases of the adulthood. Positive correlation was detected between the expression levels of SIRT6 mRNA and miR-26a, moreover, the level of HDAC4 mRNA also showed positive correlation with the expression of miR-378\*, miR-23b, miR-26a, miR-125b and miR-155. The expression level of both SIRT6 and HDAC4 mRNA negatively correlated with the level of the tumorsuppressor miR-124. These relationships imply the potential oncogenic property of

SIRT6 and HDAC4. Among the two investigated histone deacetylase enzymes, the contribution of Warburg effect promoting metabolic influence is more likely to the pathogenetic role of HDAC4, while in the case of SIRT6, probably its impact on the epigenetic regulation of hemopoiesis is more important than metabolic consequences. The expression levels of some genes also showed statistically significant correlation with the white blood cell count determined at the time of the diagnosis. During the first four weeks of the treatment of FAB M5 subtype of AML, the expression levels of both microRNAs and histone deacetylase enzymes have changed, which most important clinical application could be to predict the efficiency of a distinct therapeutic approach. Comparison of the gene expression levels between the different subgroups of AML revealed statistically significant differences.

The comprehensive evaluation of epigenetic, metabolic, cytogenetic and molecular genetic alterations may lead to more complex prognostic stratification that could contribute to personalized treatment in a significant manner, leading to improved therapeutic results.

### 3. Rövidítések jegyzéke

2-HG: 2-hidroxi-glutarát	HCL: hajás sejtes leukémia
5-caC: 5-karboxicitozin	HDAC: hiszton deacetiláz
5-fC: 5-formilcitozin	HDM: hiszton demetiláz
5-hmC: 5-hidroximetilcitozin	HGB: hemoglobin szint (g/l)
5-mC: 5-metilcitozin	HIF1 $\alpha$ : hypoxia indukálta faktor 1 $\alpha$
<sup>18</sup> FDG: 18-fluoro-dezoxiglükóz	HK II: hexokináz II-es izoforma
$\alpha$ -KG: $\alpha$ -ketoglutarát	HL: Hodgkin lymphoma
Acetil-CoA: acetil koenzim A	HMT: hiszton metiltranszferáz
ALL: akut limfoid leukémia	HSC: hemopoetikus őssejt
AML: akut mieloid leukémia	IDH: izocitrát dehidrogenáz
BCA: 2-2'-bikinolin-4-4'-dikarboxilsav	ITD: belső tandem duplikáció
BSA: marhaszérum albumin	ITP: idiopathiás thrombocytopeniás purpura
CBP: CREB kötő fehérje	JAK: Janus arcú kináz
CDK6: ciklinfüggő protein kináz 6	LDH: laktát dehidrogenáz
CLL: krónikus limfoid leukémia	LNA: zárt szerkezetű nukleinsav
CML: krónikus mieloid leukémia	LSD1: lizinspecifikus demetiláz 1
DNMT: DNS metiltranszferáz	MCT1: monokarboxilát transzporter 1
EDTA: etilén-diamin tetraecetsav	MDS: mielodiszpláziás szindróma
ERR $\gamma$ : ösztrogénnel rokon receptor $\gamma$	miRNA: mikro-RNS
FAB: Francia-Amerikai-Brit	MLL: mieloid/limfoid leukémia gén
FAD: flavin adenin dinukleotid	MPAL: kevert fenotípusú akut leukémia
FDA: Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság	MTHFD2: metilén tetrahydrofolát dehidrogenáz 2
FH: fumarát hidratáz	MYST: MOZ, Ybf2, Sas2, Tip60
FLT3: fms-szerű tirozin kináz 3	NAD <sup>+</sup> : nikotinamid adenin dinukleotid
GABPA: guanin adenin ismétlődés kötő fehérje $\alpha$	NFW: nukleázmentes víz
GDH: glutamát dehidrogenáz	NPM1: nucleophosmin 1 gén
GLUT1: 1-es típusú glükóz transzporter	PDH: piruvát dehidrogenáz
GNAT: GCN5-höz hasonló N-acetiltranszferáz	PDHX: piruvát dehidrogenáz komplex X komponens
HAT: hiszton acetiltranszferáz	PDK: piruvát dehidrogenáz kináz

PET: pozitron emissziós tomográfia  
PFK I: foszfofruktokináz I  
PGC1 $\alpha/\beta$ : peroxiszóma proliferátor  
aktiválta receptor gamma koaktivátor 1 $\alpha/\beta$   
PGM2: foszfoglicerát mutáz 2  
PHGDH: foszfoglicerát dehidrogenáz  
PIC: proteázgátló koktél  
piRNA: piwi-vel kölcsönható RNS  
PIWI: P-elem által indukált Wimpy here  
fehérje  
PKM2: piruvát kináz M2 izoforma  
PLT: trombocitaszám (G/l)  
PML: promielocitás leukémia  
PRMT: feniletanolamin N-metiltranszferáz  
qPCR: kvantitatív polimeráz láncreakció  
RAR $\alpha$ : retinsav receptor  $\alpha$   
RBC: vörösvértestszám (T/l)  
RISC: RNS indukálta csendesítő komplex  
ROS: reaktív oxigéngyökök  
RT: reverz transzkripció

SAM: S-adenozil metionin  
SDH: szukcinát dehidrogenáz  
SDS: nátrium-dodecil-szulfát  
SET: Suppressor of variegation 3-9,  
*Enhancer of zeste, Trithorax*  
SHIP1: SH2 domént tartalmazó inozitol  
foszfatáz 1  
siRNA: kis interferáló RNS  
SIRT: sirtuin típusú hiszton deacetiláz  
SNP: egy pontos nukleotid-polimorfizmus  
snoRNA: kis nukleoláris RNS  
TDG: timin DNS-glikoziláz  
TET: tíz tizenegy transzlokáció  
TIGAR: tumor protein 53 indukálta  
glikolízis és apoptózis regulátor  
TKD: tirozin kináz domén  
UPL: univerzális próba könyvtár  
UTR: nem transzlálódó régió  
WBC: fehérvérsejtszám (G/l)  
WHO: Egészségügyi Világszervezet

#### 4. Bevezetés

A tumorokban bekövetkező epigenetikai változásokról közölt első adatok 1983-ból származnak [1]. Mára bebizonyosodott, hogy a génextpressziós mintázatban a DNS szekvenciájának módosulása nélkül bekövetkező változások - melyek érinthetik a DNS-metilációt, a hisztonkódot és a különböző nemkódoló RNS-eket egyaránt - a transzlokációkhoz és molekuláris genetikai eltérésekhez hasonlóan a malignus betegségek, és azon belül a leukémia patogenezisének fontos tényezői. Az egészséges hemopoézishez nélkülözhetetlen az epigenetikai szabályozó mechanizmusok zavartalansága, amelyek komplex kisiklását bizonyítékok növekvő sora támasztja alá az onkohematológiai kórképekben. A sejtek metabolizmusának Otto Warburgról elnevezett jellegzetes megváltozása, mely magában foglalja a fokozott glikolízist és laktátképződést, szintén a malignus betegségek jellemző sajátossága. A sejtanyagcsere és az epigenetikai szabályozás megváltozása ugyanakkor egymástól nem élesen elhatárolható, mivel a Warburg effektusban számos epigenetikai mechanizmus játszik szerepet. A metabolizmus és az epigenetika közös sajátossága, hogy az őket érintő változások a citogenetikai és molekuláris genetikai eltérésekkel ellentétben reverzibilisek, ezáltal a beavatkozás lehetősége alapvetően különbözik. Az ezen változásokat célzó terápiás szerek az eddigi adatok szerint eredményesen kombinálhatók mind egymással, mind konvencionális kemoterápiás szerekkel. Az epigenetikai változásokra a reverzibilitás mellett jellemző, hogy a genetikai eltéréseknél gyakran időben korábban bekövetkeznek, és a kromatinállomány szerkezetének módosulása révén következményes genetikai változásokat indukálnak. Az egyes tumorszuppresszor gének, onkogének és transzlokációk révén képződő fúziós onkoproteinek malignus betegség kialakulását gátló vagy elősegítő hatása ugyanakkor rendszerint másodlagosan kialakuló epigenetikai eltérésekhez kötött.

Genetikai és epigenetikai változások tehát együttesen, egymással sokszoros kölcsönhatásban állva járulnak hozzá a génextpressziós mintázatot meghatározó komplex szabályozó hálózat működésének malignus betegség kialakulásához vezető kisiklásához. A jövőben az egyes terápiás szerek kombinációjának megválasztása lehetőség szerint egyénre szabottan, a genetikai, epigenetikai és metabolikus eltérések együttes értékelése alapján kell, hogy történjen, ezáltal növekedhet a túlélők száma, és javulhat a túlélők életminősége.

Munkánk során hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegek csontvelő mintáiban vizsgáltuk  $\text{NAD}^+$ -függő és  $\text{NAD}^+$ -független hiszton deacetiláz enzimek, illetve mikro-RNS-ek expressziós szintjét, melyek egy részét szolid tumorokban a Warburg-

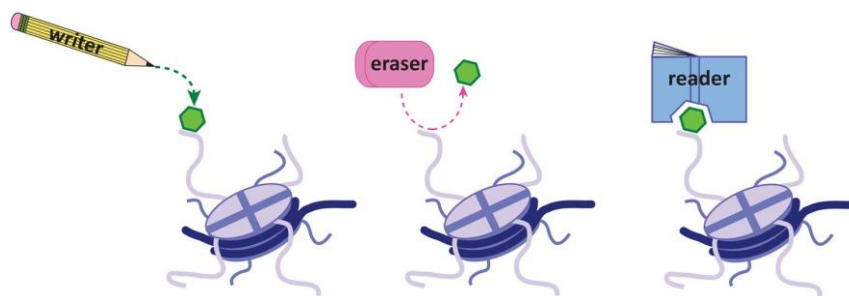
típusú metabolizmussal hoztak összefüggésbe. Az expressziós szinteket összevetettük a diagnózis idején meghatározott kariotípussal, molekuláris genetikai eltérésekkel és klinikai adatokkal.

## 5. Irodalmi áttekintés

### 5.1 Az epigenetikai szabályozás főbb jellemzői

Az epigenetika első definíciója 1942-ből, Conrad Hal Waddingtontól származik, mely szerint az epigenetika felelős a genotípus fenotípusban történő megnyilvánulásáért [2]. Az első definíció megszületését számos további követte. A 2000 óta leggyakrabban használt, Wolffe és Guschin nevéhez fűződő verzió értelmében az epigenetika mindazon szabályozó mechanizmusokat magába foglalja, melyek nyomán a génextpressziós mintázat a DNS szekvenciájának megváltozása nélkül módosul [3].

Az epigenetikai szabályozásért felelős enzimeket és fehérjéket három csoportba soroljuk aszerint, hogy epigenetikai módosítást létrehoznak („*writer*”), megszüntetnek („*eraser*”) vagy meghatározott domének által felismernek („*reader*”) (1. ábra) [4]. Ezen enzimek jellemzően multiprotein komplexek alkotóelemeiként fejtik ki hatásukat, melyek összetételét a sejttípus és differenciációs stádium egyaránt befolyásolja [5].



**1. ábra:** Az epigenetikai szabályozásért felelős fehérjék három nagy csoportját aszerint különböztetjük meg, hogy epigenetikai markerek létrehozásáért („*writers*”), eltávolításáért („*erasers*”), vagy felismeréséért („*readers*”) felelősek ([www.being-bioreactive.com](http://www.being-bioreactive.com))

Az epigenetikai módosítások legfőbb típusai a DNS-metiláció, a hiszton modifikáció, a nemkódoló RNS-ek által létrejövő génextpressziós változások és a nukleoszóma remodelling [2]. A molekula hossza alapján kis, illetve hosszú nemkódoló RNS-eket különböztetünk meg, utóbbiakról 200 nukleotid feletti hosszúság esetén beszélünk [6]. A kis nemkódoló RNS-ek közé a kis interferáló RNS-ek (siRNAs), mikro-RNS-ek (miRNAs), piwi-vel kölcsönható RNS-ek (piRNAs) és kis nukleoláris RNS-ek (snoRNAs) tartoznak [7]. A nukleoszómák szerkezetének szabályozásáért fehérje alegységekből álló, ATP-függő kromatin remodelláló komplexek felelősek [8].

A „*reader*” fehérjék három nagy csoportja a metilált citozint, az acetilált lizint, illetve a metilált lizin vagy arginin oldalláncokat felismerő fehérjék, amelyek az adott epigenetikai marker felismeréséhez szükséges doménekkal rendelkeznek, és sok esetben a marker

felismerését követően ahhoz további epigenetikai módosításokat létrehozó enzimeket toboroznak.

Az epigenetikai markerek fontos sajátossága, hogy örökölhető, ugyanakkor reverzibilis változások. Nagyfokú plaszticitás jellemző rájuk, hiszen a differenciáció és egyedfejlődés során, továbbá környezeti tényezők hatására rendkívül dinamikusan változnak [3]. Jelentősek például a táplálkozás, a testmozgás, a cirkadián ritmus, a stressz és egyéb pszichológiai tényezők által kiváltott epigenetikai hatások. 2010-ben közzétették azokat az eredményeket, melyek szerint stressz hatására a DNS-metilációs mintázat, a hisztonkód, illetve a nukleoszómák konformációja egyaránt megváltozik, többségbe kerülnek a génextpresszió represszióját okozó markerek, ezeknek a változásoknak az összessége pedig nagymértékben hozzájárul a malignus betegségekre jellemző kontrollálatlan sejtproliferációhoz [9].

## **5.2 A DNS-metilációs mintázat szabályozása**

### **5.2.1 DNS-metiláció**

A DNS-metilációt elsőként Feinberg és Vogelstein írta le, 1983-ban [10]. A DNS-metiláció kovalens módosítás, melynek során DNS metiltransferáz (DNMT) enzimek S-adenozil-metionin (SAM) molekuláról származó metilcsoportot kapcsolnak a CpG dinukleotidok citozin bázisainak 5' szénatomjához [11]. A DNS-metiláció a transzkripció represszióját eredményezi [11]. Számos fiziológiai folyamat, például az imprinting mintázat fenntartása, az X kromoszóma inaktiváció, valamint a szövetspecifikus génextpressziós mintázatok fenntartása során nélkülözhetetlen szerepet tölt be [12].

A replikáció során az újonnan képződő DNS-szál fenntartó metilációjáért a DNMT1 enzim felelős, mely a nem metilált DNS-szakaszokhoz viszonyítva 10-40-szeres affinitással rendelkezik a hemimetilált DNS iránt [13]. A de novo DNS-metiláció enzimeit a DNMT3A és a DNMT3B [10]. A DNMT3L enzimaktivitással nem rendelkező, a többi DNS metiltransferáz enzim aktivitásának szabályozásáért felelős fehérje [10]. A DNMT2 alapvetően transzfer-RNS metiltransferáz enzim, de gyenge DNS metiltransferáz aktivitással szintén rendelkezik [14]. A DNMT3A, DNMT3B, valamint a DNMT1 enzim hiánya állatkísérletek során embrionális vagy korai posztnatális életkorban letálisnak bizonyult [13].

### **5.2.2 DNS-demetiláció és DNS-hidroximetiláció**

A DNS demetilációja lehet passzív és aktív folyamat. Passzív demetiláció esetén a replikáció során újonnan képződő DNS-szálon elmarad a fenntartó metiláció, míg az aktív demetiláció több lépésben, 5-hidroximetiláción keresztül megvalósuló folyamat [15, 16].

Az 5-hidroxi-metilcitozint (5-hmC) elsőként Wyatt és Cohen azonosította bakteriofágokban, 1952-ben [15]. Az azóta hatodik bázisként is emlegetett 5-hmC emlős DNS-ben történő első leírása 2009-ből származik [15]. Szintén 2009 óta ismert, hogy az 5-hmC 5-metilcitozinból (5-mC) történő képződését a TET nevű, háromtagú enzimes család katalizálja, melyek kofaktorként Fe(II) ion és  $\alpha$ -ketoglutarát ( $\alpha$ -KG) jelenlétét igénylik [17]. Az aktív demetiláció során az 5-hmC több egymást követő, szintén TET enzimek által katalizált lépésben tovább módosul 5-formilcitozinná (5-fC), majd 5-karboxicitozinná (5-caC) [15]. Az 5-formilcitozin és 5-karboxicitozin markerek eltávolításáért a timin DNS-glikoziláz (TDG) enzim felelős, majd a keletkező abázikus helyet a bázis excíziós repair korigálja metilálatlan citozinnal [18]. Mivel a TET enzimek kofaktorául szolgáló  $\alpha$ -ketoglutarátot az izocitrát dehidrogenáz (IDH) enzimek állítják elő, ezért a DNS-metilációs mintázat szabályozásában az IDH1 és IDH2 közvetetten igen fontos szerepet tölt be [19].

### **5.3 A DNS-metilációs mintázatot szabályozó enzimek szerepe a hemopoézis és a karcinogenezis során**

A TET2 enzimnek kiemelt jelentőséget tulajdonítanak a hemopoézis epigenetikai szabályozásában. Mutáció révén kialakuló haploinsufficienciája a hemopoetikus őssejtek (HSC) homeosztázisnak felborulásához, önmegújító képességük kóros mértékű fokozódásához vezet [20]. Zavart szenved a hemopoetikus prekursorok differenciációja, és premalignusnak tekinthető, még nem teljes mértékben transzformálódott sejtklónok jönnek létre [17]. IDH mutációval társuló akut mieloid leukémiában (AML) a mieloid differenciációt szabályozó gének promoterének aberráns hipermetilációját figyelték meg [19].

A malignus betegségekre jellemző a DNS-metilációs mintázat megváltozása, mely utalhat mind a tumor típusára, mind annak stádiumára [11]. A globális DNS-hipometiláció a malignusan transzformálódott sejtekben elsőként felfedezett epigenetikai változás volt [13]. Az extenzív demetiláció számos potenciális következménye közül kiemelendő a genomi instabilitás és aneupoidia kialakulása, protoonkogének és parazita DNS-szakaszok aktivációja, illetve az imprinting mintázat megváltozása [11, 21]. A globális hipometiláció mellett bizonyos szekvenciaregionok hipermetilációja szintén jellemző, mely rendszerint tumorszuppresszor tulajdonságú fehérjekódoló gének és mikro-RNS-ek promotereit érinti [22].

A DNS-metilációs mintázat szabályozásában résztvevő enzimek megváltozott expressziós szintjét, illetve mutációját egyaránt a karcinogenezis etiológiai tényezőjeként tartják számon. A DNMT enzimek up-regulációját a szolid tumorok számos típusában

megfigyelték, az IDH, DNMT3A és TET2 enzimek mutációja pedig közvetlenül hozzájárul az aberráns DNS-metilációs mintázat kialakulásához [23].

#### **5.4 A DNS-metilációs mintázatot érintő változások hematológiai malignus betegségekben. Klinikai alkalmazások**

Mind akut, mind krónikus leukémiákban ismertek a DNMT enzimeket, illetve a DNS metilációs mintázatot érintő változások. AML-ben a DNMT enzimek up-regulációja igazolódott, továbbá a betegek 95%-ánál aberráns DNS-metilációs mintázatot észleltek legalább egy gén esetében [24]. A t(8;21), inv(16) és t(15;17) transzlokáció esetén jellegzetes DNS-metilációs profilokat azonosítottak [25]. Krónikus mieloid leukémiában (CML) a DNMT enzimek expressziós szintje a betegség stádiumával párhuzamosan változik [12]. Krónikus limfoid leukémiában (CLL) a DNMT3B enzim down-regulációja jellemző [26]. A DNS-metilációs mintázatban bekövetkező változások, illetve a DNS-metiláció szabályozásáért felelős enzimek mutációi alkalmasak prognosztikai következtetések levonására és kemorezisztencia előrejelzésére, illetve terápiás célpontokat is jelentenek egyben [25].

A rendelkezésre álló eredmények szerint a DNMT3A enzim mutációja AML-ben kedvezőtlen kimenetelt jelez, és elősegíti az antraciklinekkel szembeni kemorezisztencia kialakulását. Ugyanakkor a DNMT3A, TET2 és IDH mutációk prognosztikai relevanciájának megítélésakor az egyes molekuláris genetikai eltérések kombinációjának figyelembe vétele elengedhetetlen [20, 27]. Az IDH1 és IDH2 enzim mutációja például normál kariotípusú, FLT3-ITD eltéréssel nem kísért NPM1 mutációt hordozó AML-es betegekben kedvezőtlen prognózisra utal [28, 29].

A citozin analóg azacitidint (5-azacitidin) 2004-ben, a decitabint (5-aza-2'-deoxicitidin) 2006-ban fogadta el az FDA mielodiszpláziás szindróma (MDS) kezelésében [11]. Az első, klinikai tanulmányba bevont IDH inhibitor a mutáns enzim által termelt 2-hidroxiszüksav (2-HG) képződését meggátoló AG-221 volt [30].

#### **5.5 Hiszton modifikáció és a hisztonkódot meghatározó enzimek**

A hiszton fehérjék struktúrátlan N-terminális részén bekövetkező kovalens módosítások összességét hisztonkódnak nevezzük, mely kifejezés Strahl és Allis nevéhez fűződik [31]. A hiszton modifikációnak számos típusa ismert. Megkülönböztetünk hiszton acetilációt, metilációt, deiminációt, foszforilációt, ubikvitinációt, szumoilációt, ADP-ribosilációt, prolin izomerizációt, valamint biotilációt, melyek közül legtöbb adat az

acetilációról és metilációról áll rendelkezésre [32]. Az egyes hiszton oldalláncok modifikációs helyei közötti kis távolság kedvez a kölcsönhatások kialakulásának [31]. Egymást kizáró, illetve szekvenciális hisztonmódosítások egyaránt ismertek.

### 5.5.1 Hiszton acetiláció és deacetiláció

Az acetiláció és a deacetiláció a hiszton fehérjék lizin oldalláncain történik [2]. A hiszton acetiltranszferáz enzimek (HAT) által katalizált acetiláció során a lizin  $\epsilon$ -aminocsoportjához kapcsolódó acetilcsoport semlegesíti az oldallánc pozitív töltését, ezáltal gyengül a DNS és a hiszton fehérjék közötti elektrosztatikus kapcsolat, ami a transzkripció aktivációjához vezet [33].

A HAT enzimek sejten belüli lokalizációja szerint megkülönböztetünk a sejtmagban található A-típusú, illetve a citoplazmában jelenlévő B-típusú enzimeket [32]. Az elterjedtebb, doménszerkezet szerint történő rendszerezés a HAT enzimeket a GNAT, MYST és a p300/CBP nevű csoportokba sorolja (1. táblázat) [32].

<b>Hiszton acetiltranszferáz enzimek</b>		
<b>Csoport</b>	<b>Enzimek</b>	<b>Szubsztrát hiszton fehérjék</b>
<b>GNAT</b>	GCN5	H3, H2B
	PCAF	
	HAT1	H3, H4
	ELP3	H4, H2A
	HPA2	
<b>MYST</b>	ESA1	H2A, H4
	MOF	H4
	SAS2	
	SAS3	H3
	MORF	
	TIP60	
	HBO1	
	MOZ	H3, H4
<b>p300/CBP</b>	p300	
	CBP	

*1. táblázat:* A hiszton acetiltranszferáz enzimek (HAT) fő csoportjai

Az acetilációval szemben a deacetiláció a génexpresszió repressziójához vezet [11]. A hiszton deacetiláz (HDAC) enzimek hiszton és nem hiszton fehérjék lizin oldalláncainak deacetilációját egyaránt végzik, és nagyszámú biológiai folyamat szabályozásáért felelősek [34]. Az első HDAC enzimet (HDAC1) 1996-ban fedezték fel. A jelenleg ismert 18 különböző hiszton deacetiláz enzimet 4 csoportba soroljuk [35]. A HDAC fehérjék a III-as csoportba tartozó, kofaktorként  $\text{NAD}^+$ -ot hasznosító sirtuinok (SIRT) kivételével  $\text{Zn}^{2+}$ -függő enzimek [35].

Az I-es csoportba tartozó HDAC enzimekre (HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC8) ubikviter, míg a IIA csoport enzimeire (HDAC4, HDAC5, HDAC7, HDAC9) szövetspecifikus expresszió jellemző [33]. A IIB csoport duplikált katalitikus domént tartalmazó enzimei (HDAC6, HDAC10) főként a citoplazmában találhatóak meg [35]. A IV-es csoportba tartozó egyetlen enzim (HDAC11) az immuntolerancia szabályozásában vesz részt [35]. A NAD<sup>+</sup> kofaktort igénylő SIRT enzimek héttagú csoportjára (SIRT1-7) jellegzetes szubcelluláris lokalizáció jellemző (2. táblázat). A SIRT1, SIRT6 és SIRT7 főként a sejtmagban, a SIRT2 a citoplazmában, míg a SIRT3, SIRT4 és SIRT5 a mitokondriumban található [33].

Sirtuin	Lokalizáció	Enzimaktivitás	Metabolizmusban betöltött szerep
SIRT1	sejtmag	deacetiláz	sejtek inzulinnal szembeni érzékenységének szabályozása, glükoneogenezis, zsírsavak $\beta$ -oxidációja
SIRT2	citoplazma	deacetiláz, demirisztoiláció	koleszterol bioszintézis, sejtek inzulinnal szembeni érzékenységének szabályozása
SIRT3	mitokondrium	deacetiláz, deakrotoniláció	zsírsavak $\beta$ -oxidációja, piruvát dehidrogenáz (PDH) és citrátköri enzimek szabályozása, glutamin metabolizmus
SIRT4	mitokondrium	deacetiláz, ADP-riboziltranszferáz, lipoamidáció	glutamin metabolizmus
SIRT5	mitokondrium	deacetiláz, demaloniláz, deszukciniláz, deglutariláz	ketontestszintézis, ureaciklus
SIRT6	sejtmag	deacetiláz, ADP-riboziltranszferáz	glikolitikus gének expressziójának szabályozása
SIRT7	sejtmag	deacetiláz	

2. táblázat: Sirtuin típusú hiszton deacetiláz enzimek

A sirtuin enzimek a deacetiláció mellett számos további enzimaktivitással rendelkeznek. A SIRT2 demirisztoilációért, a SIRT3 deakrotonilációért, a SIRT4 pedig mono-ADP ribozilációért és lipoamidációért is felelős [36, 37]. A SIRT5 demaloniláz, deszukciniláz és deglutariláz aktivitással egyaránt rendelkezik [37, 38]. A SIRT6 a hiszton deacetiláció mellett a SIRT4-hez hasonlóan mono-ADP ribozilációt is végez [36].

A sirtuinok nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a metabolizmus szabályozásában [39]. A SIRT1 fokozza a sejtek inzulinnal szembeni érzékenységét, a glükoneogenezist és a zsírsavak  $\beta$ -oxidációját [40, 41]. A SIRT2 serkenti a koleszterol bioszintézisét, illetve a

SIRT1 enzimmel ellentétben a sejtek inzulinnal szembeni rezisztenciájának fokozódásához vezet [42, 43]. A SIRT3 serkenti a zsírsavak  $\beta$ -oxidációját, szabályozza a piruvát dehidrogenáz (PDH) enzimkomplexet, a citrátkör enzimei közül az izocitrát dehidrogenázt és a szukcinát dehidrogenázt (SDH), valamint aktiválja a glutamát dehidrogenáz (GDH) enzimet [37, 39, 44, 45]. Expressziós szintje kalóriamegszorítás, éhezés és a fizikai aktivitás következtében megemelkedik [37]. A SIRT4 a GDH enzimet ADP-riboziláció révén gátolja, ezáltal a glutamin metabolizmust a SIRT3 enzimmel ellentétes módon szabályozza [37]. A SIRT5 szabályozza a ketontestek szintézisét és az ureaciklust [37]. A SIRT6 kölcsönhat a glikolitikus gének expressziójáért felelős HIF1 $\alpha$  és c-Myc transzkripciós faktorokkal, ezáltal fontos szerepe van a glikolízis szabályozásában [36].

A SIRT enzimek a mitokondriumok intakt funkciójának fenntartásáért felelős legfontosabb epigenetikai szabályozó tényezők közé tartoznak [45]. A mitokondriumok különböző stresszhatásokkal szembeni ellenállását leginkább a SIRT3 biztosítja [37]. A mitokondriumok biogenezisének szabályozásában több sirtuin enzim is részt vesz. Az új mitokondriumok képződését serkentő PGC1 $\alpha$  transzkripciós faktort a SIRT1 enzim aktiválja, a SIRT4 pedig gátolja [39, 46]. A reaktív oxigéngyökök (ROS) mennyiségét a SIRT3 és a SIRT5 egyaránt csökkenti [36, 37]. A duplaszálú DNS-törést követő repair folyamatok és az öregedés sebességének szabályozásában a SIRT6 enzimnek tulajdonítanak kiemelt jelentőséget, amely a genom integritásának fenntartásához retrotranszpozonok csendesítésével is hozzájárul [47, 48].

### 5.5.2 Hiszton metiláció és demetiláció

A hiszton metiláció lizin vagy arginin oldalláncokon mehet végbe [2]. Ellentétben az acetilációval, a kromatinállomány töltésviszonyait nem befolyásolja, ugyanakkor a hiszton metilációs markerek sokszor biztosítanak dokkoló helyet további szabályozó fehérjék számára [49]. A módosítás a génexpresszió aktivációjához és repressziójához egyaránt vezethet az érintett lizin vagy arginin oldallánc, illetve az ahhoz kapcsolódó metilcsoportok számának függvényében [11, 50]. A lizin oldalláncokon mono-, di- és trimetiláció is lehetséges, míg az arginin oldalláncokon mono-, valamint szimmetrikus és aszimmetrikus dimetiláció történhet [32].

A hiszton oldalláncok metilációját hiszton metiltranszferáz (HMT) enzimek katalizálják. A lizin metilációért felelős enzimeknek két fő típusát különböztetjük meg aszerint, hogy tartalmazzák-e a SET domént [51]. Az arginin metiltranszferázok (PRMT enzimek) családjának 9 tagja ismert [20]. A hiszton metiláció reverzibilitását a hiszton demetiláz

(HDM) enzimek biztosítják, melyek két fő típusa a doménszerkezet szerint a flavin-dependens monoamin oxidázok családja, illetve a Jumonji C domént tartalmazó hiszton demetiláz enzimek [11]. A hiszton metilációért és demetilációért felelős metiltransferáz és demetiláz enzimeket a 3. táblázatban tüntettük fel.

### 5.5.3 A hiszton modifikáció hemopoézis és karcinogenezis során betöltött szerepe

Az utóbbi években számtalan, hiszton modifikációért felelős enzim hemopoézis során betöltött szerepe igazolódott. A vérképzés epigenetikai szabályozásának karmestereként számon tartott TET2 enzimet a hiszton deacetilázok közül a SIRT6 szabályozza, melynek csendesítését követően az 5-hmC szint megnövekedését észlelték, míg a SIRT6 overexpressziója az 5-hmC szint csökkenését eredményezte [52].

Hiszton lizin metiltransferáz enzimek		Arginin metiltransferáz enzimek	Szubsztrát oldalláncok	LSD demetilázok	Jumonji domént tartalmazó demetilázok
<b>SET-domént tartalmazó</b>	<b>szubsztrát oldalláncok</b>	PRMT1	H4R3	LSD1	UTX
MLL1	H3K4me	PRMT2		LSD2	JARID1A
MLL2	H3K4me	PRMT3			JARID1B
MLL3	H3K4me	PRMT4	H3R2, 17, 26		JARID1C
MLL4	H3K4me	PRMT5	H4R3, H3R8		JARID1D
MLL5	H3K4me <sub>1,2</sub>	PRMT6	H3R2		JMJD2A
SUV39H1	H3K9me <sub>3</sub>	PRMT7	H2A, H4R3		JMJD2B
SUV39H2	H3K9me <sub>3</sub>	PRMT8	H4?		JMJD2C
SUV420H1	H4K20me <sub>3</sub>	PRMT9	H4, H2A		JMJD2D
SUV420H2	H4K20me <sub>3</sub>	PRMT10			JMJD3
EZH2	H3K27me <sub>1,2,3</sub> , H3K9me	PRMT11			JMJD4
G9a	H3K9me <sub>1,2</sub> , H3K27me, H3K56me				JMJD5
GLP	H3K9me <sub>1,2</sub> , H3K27me				JMJD6
NSD1	H3K36me, H4K20me				JMJD7
SETD1A	H3K4me				JMJD8
SETD1B	H3K4me				PHF2
SETD2	H3K36me				PHF8
<b>SET-domént nem tartalmazó</b>	<b>szubsztrát oldalláncok</b>				
DOT1L	H3K79me				

3. táblázat: Hiszton lizin és arginin metilációért, valamint hiszton demetilációért felelős enzimek

A hiszton módosításokért felelős enzimek megváltozott expressziós szintje, mutációja, valamint a hisztonkódban bekövetkező változások a malignus betegségek kialakulásában egyaránt szerepet játszik [35]. Az EZH2 hiszton metiltransferáz enzim malignus betegségekben bekövetkező funkciónyeréses és funkcióvesztő mutációi egyaránt ismertek, ami az EZH2 tumortípustól függő onkogén vagy tumorszuppresszor tulajdonságára utal [51].

A hiszton deacetiláz enzimek potenciális tumorszuppresszor és onkogén sajátságáról ellentmondásos eredmények állnak rendelkezésre [33].

#### **5.5.4 Hiszton modifikációt érintő változások hematológiai malignus betegségekben. Klinikai alkalmazások**

Hasonlóan a szolid tumorokhoz, leukémiában is egyre több adat áll rendelkezésre a hiszton modifikációért felelős enzimeknek a betegség patogenezisében betöltött szerepéről. AML-ben igazolták a HDAC4 kölcsönhatását az FLT3 jelátviteli útvonalához tartozó PRL3 fehérjével, nem találtak azonban összefüggést az I-es csoportba tartozó HDAC enzimeket érintő egy pontos nukleotid-polimorfizmusok (SNP) és az AML kialakulásának valószínűsége között [53, 54]. CLL-ben a HDAC1, HDAC3, HDAC6, HDAC7, HDAC9, HDAC10, SIRT1 és SIRT6 up-regulációját, valamint az E-cadherin gén hipoacetiláció által bekövetkező down-regulációját észlelték [55, 56]. A csecsemőkori leukémia az esetek több mint 70%-ában a HMT enzimet kódoló MLL1 gén transzlokációjával társul [57]. A SET domént nem tartalmazó, azonban szintén hiszton metiltranszferáz aktivitású DOT1L enzim mutációja hematológiai malignus betegségekben csak ritkán fordul elő, helyette jellemzően az általa létrehozott H3K79 metilációs marker célra irányítása változik meg [51]. Gyermekkori akut limfoid leukémiában (ALL) a HDAC4 magas expressziós szintje kedvezőtlen prognózist jelez, és prednisonra adott kedvezőtlen terápiás válasszal társul [58]. CLL-ben a HDAC7 és HDAC10 up-regulációját, valamint a HDAC6 és SIRT3 alacsony szintjét hozták összefüggésbe a betegség kedvezőtlen kimenetelével [59].

Mind a különböző HAT, mind a HDAC, HMT és HDM enzimek inhibitorai növekvő számban állnak rendelkezésre (4. táblázat). Vannak közöttük az FDA által elfogadott szerek, számos további vegyülettel pedig jelenleg is klinikai vizsgálatok folynak. Az egyes inhibitorokra jellemző az epigenetikai szabályozásért felelős enzimek által alkotott multiprotein komplexek iránti eltérő affinitás, ugyanakkor egy adott enzimre szelektív gátlószerből csak kevés ismert, különösen HDAC inhibitorok esetén [35]. Az MLL1 gén transzlokációjával társuló akut leukémiában az ezidáig rendelkezésre álló eredmények alapján a hiszton metilációs mintázatot szabályozó többféle HMT és HDM enzim, köztük a DOT1L, az EZH2, illetve az LSD1 gátlószerei is hatékonyak lehetnek [60-62].

## 5.6 Mikro-RNS-ek

### 5.6.1 A mikro-RNS-ek biogenezise és nomenklatúrája

A mikro-RNS-ek 19-24 nukleotid hosszúságú, evolúciósan konzervált nemkódoló RNS-molekulák [63]. Kódoló régióik elsősorban intergénikus és intron régiókban találhatóak, kb. 50%-ban genetikailag instabil, ún. fragilis helyeken vagy rákkal asszociált régiókban [64]. A mitokondriumokban jelenlévő mikro-RNS-eket mitomiR-eknek nevezik [65].

<b>HAT inhibitorok</b>	C646 (p300), curcumin (CBP, p300), garcinol (PCAF, p300)
<b>HDAC inhibitorok</b>	AN-9, belinostat, depsipeptide, entinostat (SNDX-275), mocetinostat, nátrium-butirát, nátrium-fenilbutirát, panobinostat, pracinostat, SAHA, Selsa, trichostatin A, valproát, givinostat, vorinostat, LAQ-824, ST80 (HDAC6), BML-210, romidepsin
<b>HMT inhibitorok</b>	3-deazaneplanocin A (EZH2), AzaAdoMet, BIX-01294 (G9a), Sinefungin, UNC0224 (G9a), UNC0321 (G9a), chaetocin (SUV39H1), GSK126 (EZH2), E11 (EZH2), EPZ005687 (EZH2), EPZ5676 (DOT1L), EPZ004777 (DOT1L), GSK926 (EZH2), GSK343 (EZH2), EPZ6438 (EZH2), E7438 (EZH2), GSK2816126 (EZH2), A366
<b>HDM inhibitorok</b>	2-fenilciklopropilamin, N-oxalilglicin (JMJD)

**4. táblázat:** Epigenetikai támadáspontú célzott terápiás szerek (specifikus gátlószerek esetén a gátolt enzim nevét zárójelben feltüntettük)

A mikro-RNS-ek expressziós szintje a fehérjekódoló génekhez hasonló módon szabályozott [66]. A biogenezis első lépése során az RNS polimeráz II írja át a primer transzkriptumot (pri-mikro-RNS), melynek struktúrájához a fehérjekódoló génekhez hasonlóan hozzátartozik a 7-metilguanozin sapka és a poli-A farok rész [67]. A pri-mikro-RNS-ből az RNáz III típusú endonukleáz Drosha enzim hasítás révén létrehozza a 60-100 nukleotid hosszúságú, hajtú szerkezetű prekuzort, a pre-mikro-RNS-t, mely a Ran-GTP-függő Exportin-5 révén átkerül a sejtmagból a citoplazmába, és amelyet a Dicer nevű, szintén RNáz III típusú endonukleáz enzim tovább hasít egy 18-24 nukleotid hosszúságú, újabb duplaszálú előalakká [68, 69]. Ennek két szálát helikáz enzimek csavarják szét, ezt követően közülük a RISC nevű effektor komplexbe általában az a szál épül be, amelyiknek az 5' végét a bázispárosodás kevésbé szorosan rögzíti [63]. A RISC tagjai a PAZ és PIWI nevű RNS-kötő doméneket tartalmazó, Argonaute családba tartozó fehérjék [70].

A mikro-RNS-ek nomenklatúrájában általánosan elfogadottak az alábbi megjelölések [68, 71]:

*hsa/mmu/rno*: faj megjelölése

*mir-XX*: hajtúszerkezetű prekursor

*miR-XX*: érett szekvencia

*miR-XX-1/2*: megegyező szekvenciájú, de eltérő régióban kódolt mikro-RNS-ek

*miR-XX-a/b*: egy vagy két nukleotidban különböző szekvenciájú mikro-RNS-ek

*miR-XX-5p/3p*: ugyanazon prekursor ellentétes karjairól lehasadó mikro-RNS-ek

*miR-XX\**: „passenger” mikro-RNS, RISC komplexbe be nem épülő szál

### 5.6.2 A mikro-RNS-ek hatásmechanizmusa és targetjei. Mikro-RNS-ek által szabályozott fiziológiás sejtfolymatok

A mikro-RNS-ek a génexpressziót poszttranszkripció szinten szabályozzák [70]. A 2-8. nukleotid közötti szekvenciarészletük az ún. seed sequence, mely a target mRNS 3' nem translálódó (UTR) régiójához kapcsolódik [70]. A hatásmechanizmus pontos módját a komplementaritás foka határozza meg [69, 70]. Tökéletes vagy közel tökéletes komplementaritás esetén a target mRNS degradációja következik be, míg részleges komplementaritás esetén az eredmény a target mRNS translációjának gátlása [68]. Ismert ugyanakkor néhány ritkább hatásmechanizmus is, melyek biológiai jelentősége nem teljesen tisztázott, és amelyek nemcsak a génexpresszió repressziójához, hanem annak aktivációjához is vezethetnek [72].

Ismert, hogy a mikro-RNS-ek a fehérjekódoló gének kb. 50-60%-át szabályozzák [73]. Egy-egy mikro-RNS többszáz különböző target gén expresszióját szabályozhatja, és egyetlen mRNS-molekula többféle mikro-RNS-nek is targetje lehet [74]. A mikro-RNS-ek molekuláris célpontjai internetes programok segítségével valószínűsíthetőek [75].

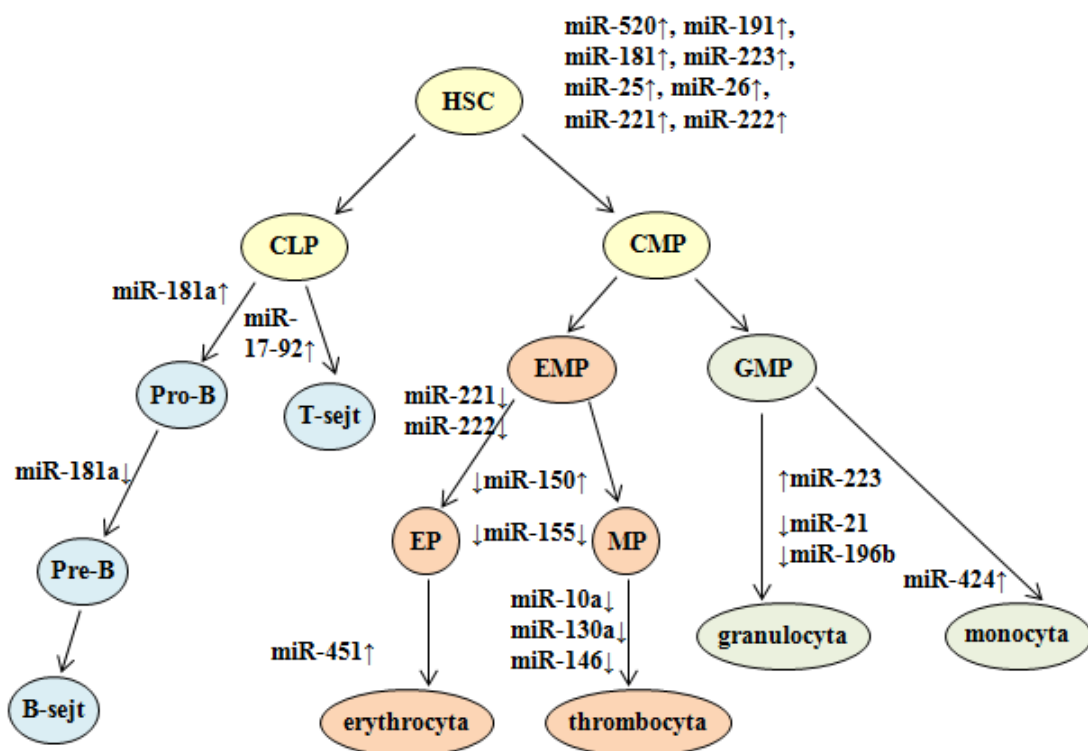
A mikro-RNS-ek számos fiziológiás sejtfolymat finomhangolásában nélkülözhetetlen szerepet töltenek be [75]. Intakt funkciójuk a sejtciklus, proliferáció, differenciáció és apoptózis, továbbá a metabolizmus, a jelátvitel, a szerzett és veleszületett immunválasz, a sejtadhézió, valamint az angiogenezis folymatának zavartalan végbemeneteléhez egyaránt szükséges [70, 71, 74, 76-79]. A mikro-RNS-ek biogenezise és processziója szintén mikro-RNS-ek által szabályozott folymatok [63].

### 5.6.3 A mikro-RNS-ek hemopoézis során betöltött szerepe

A mikro-RNS-ek expressziós szintje a hemopoetikus sejtek differenciálódása közben dinamikusan változik, szabályozó szerepük azonban az érett sejtek működésének,

funkciójának befolyásolására is kiterjed [80]. A szabályozás összetettségét jelzi, hogy egy-egy mikro-RNS többféle sejttípus érésére is hatással van, valamint egy adott mikro-RNS expressziós szintje ugyanazon sejttípus differenciálódásának különböző állomásain jelentősen eltérő lehet (2. ábra) [80-84].

A miR-125b a hemopoézis kapcsán egyik legintenzívebben tanulmányozott mikro-RNS [84]. A magas miR-125b expressziós szint igazoltan gátolja a mieloid sejtek differenciációját, ezáltal annak overexpressziója a hemopoetikus sejtek malignus transzformációjának irányába hat [84, 85]. A hemopoézis epigenetikai szabályozásának karmestereként számon tartott TET2 enzim szabályozásában egyéb mikro-RNS-ek mellett a miR-26a szerepét tartják jelentősnek [86].



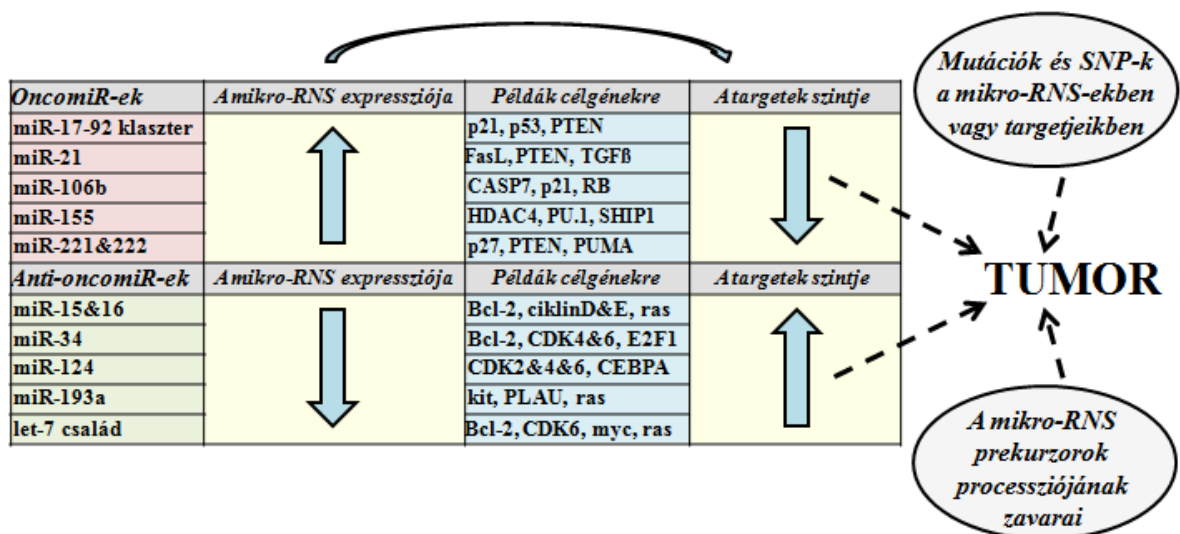
2. ábra: A hemopoézist szabályozó mikro-RNS-ek

#### 5.6.4 A mikro-RNS-ek szerepe a karcinogenezis során

Az első bizonyíték, mely mikro-RNS-ek és malignus betegség kialakulása közötti kapcsolatot igazolt, 2002-ből származik, amikor Calin és munkatársai a CLL-es betegek több mint felében deletálódó 13q14-es régióban két tumorszuppresszor tulajdonságú mikro-RNS-t azonosítottak [87]. Azóta bebizonyosodott, hogy a malignusan transzformálódott sejtekben észlelt változások a mikro-RNS-ek expressziós szintjében nem tekinthetők véletlen változásoknak, hanem a mikro-RNS-eknek szerepe van a daganatok iniciációjában és

progressziójában, továbbá az epithelialis-mesenchymalis tranzíció szabályozása révén a metasztázisok kialakulása során is [88]. A mikro-RNS expressziós profilokból sok esetben következtetni lehet a tumor típusára és annak stádiumára egyaránt [89]. Karcinogenezis során betöltött etiológiai szerepüket a kódoló régiók fentebb leírt, jellegzetes elhelyezkedése is alátámasztja. Daganat kialakulásához olyan SNP-k is hozzájárulhatnak, melyek a primer mikro-RNS transzkriptumot vagy annak processzióját érintik, továbbá előfordulhatnak a mikro-RNS-ek és a target mRNS-ek egymással kölcsönható szakaszain, megváltoztatva ezzel a mikro-RNS-nek a target gén expressziójára kifejtett szabályozó hatását [90, 91].

A fehérjekódoló génekhez hasonlóan onkogén és tumorszuppresszor tulajdonságú mikro-RNS-ek szintén ismertek (3. ábra) [69]. Az oncomiR-ek onkogén tulajdonságú mikro-RNS-ek, melyek a malignus betegségek kialakulásához a target tumorszuppresszor gének down-regulációja révén járulnak hozzá [69]. Tumorkban gyakran megfigyelhető a kódoló régiók amplifikációja [92]. Az oncomiR-ekkel szemben az anti-oncomiR-ek tumorszuppresszor sajátosságú mikro-RNS-ek, melyek down-regulációja a target onkogének expressziós szintjének kóros megnövekedéséhez vezet [67]. Malignus betegségekben gyakori az anti-oncomiR-ek kódoló régióinak deléciója [92].



3. ábra: Onkogén és tumorszuppresszor tulajdonságú mikro-RNS-ek

Jól ismert anti-oncomiR a let-7 és a miR-34 család mellett a miR-124 is, mely a CDK6 szabályozása, és ezáltal a kontrollálatlan sejtosztódás gátlása révén fejt ki tumorszuppresszor hatását [93]. Az oncomiR-ek sok esetben tumorszuppresszor tulajdonságú foszfatáz enzimek expressziós szintjét szabályozzák. Például a hematológiai malignus betegségekben egyik leginkább up-regulált onkogén tulajdonságú mikro-RNS-ként számon tartott miR-155 a SHIP1 protein foszfatáz down-regulációjáért felelős [82].

Egy adott mikro-RNS onkogén vagy tumorszuppresszor sajátsága ugyanakkor jelentősen módosulhat a szöveti környezettől és a tumor típusától függően. A miR-29 család tagjai például leukémiában tumorszuppresszorként viselkednek, azonban a szolid tumorok egyes típusaiban onkogén sajátságukra derült fény [88].

### 5.6.5 Megváltozott mikro-RNS expressziós szintek a leukémia egyes típusaiban

A leukémia változatos genetikai eltérésekkel társuló, mind patomechanizmusát, mind kimenetelét tekintve rendkívül heterogén betegség [81, 94]. Ezen heterogenitáshoz az epigenetikai változások sokszínűsége jelentős mértékben hozzájárul. A többi epigenetikai szabályozó mechanizmushoz hasonlóan a leukémia patogenezisében a mikro-RNS-ek is fontos szerepet játszanak [95].

A betegek különböző citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések alapján meghatározott csoportjai esetén jellegzetes mikro-RNS expressziós profilokat azonosítottak, melyek az életkor függvényében, elsősorban a gyermek- és felnőttkori akut leukémiákat összehasonlítva, további eltéréseket mutatnak (5. táblázat) [82, 96-99].

<b>AML</b>	
általánosan jellemző	miR-193a↓, gyermekeknél: miR-99a↑, miR-100↑, miR-125b↑, miR-146a↑, miR-335↑
M1	miR-100↑, miR-335↑
M2 t(8;21)	miR-29a↑, miR-100↑, miR-126↑, miR-133a↓, miR-223↓, let-7b↓, let-7c↓
M3 t(15;17)	miR-7↓, miR-17↓, miR-27b↓, miR-29a↓, miR-100↑, miR-101↓, miR-125b↑, miR-126↓, miR-127↑, miR-134↑, miR-181a↑, miR-181b↑, miR-199b↑, miR-224↑, miR-299↑, miR-323↑, miR-368↑, miR-376a↑, miR-382↑
M4	let-7b↓, let-7c↓, miR-100↑, miR-126↑, miR-127↓, miR-196a↓, miR-196b↓
M5-MLL	miR-21↑, miR-26a↑, miR-26b↑, miR-29a↓, miR-34b↓, miR-196a↓, miR-196b↑, miR-326↑
CEBPA-mutáció	miR-34a↓, miR-192↑, miR-194↓, miR-196a↓, miR-224↑
FLT3-ITD mutáció	miR-135a↑, miR-143↓, miR-145↓, miR-155↑, miR-203↓, miR-214↓, miR-511↑
NPM1-mutáció	miR-10a↑, miR-10b↑, miR-21↑, miR-128a↓, miR-196a↑, miR-196b↑, miR-424↓, miR-17-92 klaszter↑
<b>ALL</b>	
jellemzően csökkent	miR-30a↓, miR-34b↓, miR-34c↓, miR-126↓, miR-143↓, miR-152↓, miR-199b↓, miR-200↓, miR-223↓, miR-582↓
jellemzően emelkedett	miR-9↑, miR-128↑, miR-130b↑, miR-181a↑, miR-181b↑, miR-204↑, miR-218↑, miR-331↑, miR-363↑
gyermekkori ALL TEL-AML1 fúziós fehérjével	miR-30b↑, miR-99a↑, miR-100↑, miR-125b↑, miR-126↑, miR-151↑, miR-331↑, miR-383↑, miR-545↑
gyermekkori prekursor B-sejtes ALL	miR-10a↓, miR-127↓, miR-134↓, miR-143↓, miR-214↓
gyermekkori ALL az MLL gént érintő átrendeződéssel	miR-196b↑, let-7b↓, let-7c↓
gyermekkori hiperdiploid ALL	miR-98↑, miR-222↑, miR-223↑, miR-511↑
<b>CML</b>	miR-10a↓, miR-16↓, miR-22↓, miR-27a↓, miR-96↑, miR-150↓, miR-151↓, miR-192↓, let-7g↓, a BCR-ABL fúziós fehérje expresszióját szabályozó miR-203 szintje alacsony
<b>CLL</b>	miR-15a↓, miR-16a↓, miR-34a↓, B-sejtes CLL-ben a miR-181a nem detektálható

5. táblázat: A leukémia különböző típusaira jellegzetes eltérések a mikro-RNS expressziós szintjében

A fentebb írt két, malignus betegség kialakulásával elsőként összefüggésbe hozott mikro-RNS, a miR-15 és a miR-16 delécióját vagy down-regulációját a CLL-ben szenvedő betegek

68%-ánál igazolták [87]. AML-ben a legtöbb mikro-RNS-re down-reguláció jellemző, ugyanakkor a különböző FAB típusok, citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések esetén egyes mikro-RNS-ek kifejezett down-regulációja mellett mások overexpressziója szintén megfigyelhető [94]. A miR-125b patogenezisben betöltött szerepét jelzi, hogy AML-ben az expressziós szint nem kevesebb mint 90-szeres megemelkedése jellemző [84]. Egerekben overexpressziója dóziszfüggő módon eredményezett letális akut mieloid leukémiába progrediáló mieloproliferatív betegséget [80].

A mikro-RNS-ek expressziós szintje, valamint a diagnózis idején megállapított klinikai adatok között szintén figyeltek meg összefüggéseket. AML-ben pozitív korrelációt észleltek a diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszám, valamint a miR-30b, miR-30c, miR-155, illetve miR-181b expressziós szintje között [94].

#### **5.6.6 A mikro-RNS-ek lehetséges klinikai alkalmazásai az onkohematológiában**

A mikro-RNS-ek klinikumban történő alkalmazását elősegíti nagyfokú stabilitásuk, ugyanis degradációra csak kevésbé hajlamosak. Az mRNS-ekhez képest 10-szer stabilabbak, féléletidejük pedig átlagosan 5 nap [34, 100, 101]. A mikro-RNS-ek alkalmazhatók a diagnosztika és a prognosztika területén egyaránt, emellett expressziós szintjük módosítása terápiás célokra is felhasználható [81, 99]. Az expressziós profilok legígéretesebb klinikai alkalmazásának a kezelésre adott válasz előrejelzését tekintik [99]. Felnőtt AML-es betegekben például a miR-29c expressziós szintje alapján megjósolható az azactidinre adott terápiás válasz [102]. Előzetes eredmények szerint a mikro-RNS expressziós szintek vizsgálata a jövőben a minimális reziduális betegség megállapításában is segítséget nyújthat [103].

Az akut leukémiában szenvedő betegek és az egészségesek elkülönítésében segítséget nyújthat a miR-92 és a miR-638 expressziós szintek arányának meghatározása, mivel akut leukémiában a miR-92 down-regulációja jellemző [99]. A közelmúltban igazolták, hogy az AML-t és az ALL-t 97-99% biztonsággal el lehet különíteni egymástól négy mikro-RNS, a miR-128a, miR-128b, let-7b és a miR-223 közül bármelyik kettő expressziós szintjének meghatározása révén [104]. A bilinealis akut leukémiák a mikro-RNS expressziós profilok alapján nem alkotnak egységes entitást, de a mintázatok hasonlóak vagy a B- vagy a T-sejtes ALL-ben, vagy az AML-ben látottakhoz. Ez az immunfenotípus alapján kérdéses esetekben segítséget nyújthat abban, hogy a leukémiát inkább mieloid, vagy inkább limfoid

természetűnek tartjuk, ami támpontot jelent a terápiás megközelítések közötti választásban [105].

Leukémiában általában mikro-RNS panelek vizsgálatát, illetve az expressziós szintek citogenetikai és molekuláris genetikai eltérésekkel történő összevetését ajánlják a betegség kimenetelének pontosabb előrejelzése céljából, ritkán azonban egy-egy mikro-RNS expressziós szintjének is van prognosztikai jelentősége. 2010-ből származik az első olyan megfigyelés, ami a citogenetikai eltérést nem hordozó AML-es betegek csoportjában egyetlen mikro-RNS expressziós szintjéből von le prognosztikai következtetést. Eszerint a miR-181a magas szintje normál kariotípusú AML-ben kedvező prognózist jelez [106]. AML-ben emellett általánosan jellemző, hogy a miR-155, miR-191 és miR-199a magas expressziós szintje kedvezőtlen kimenetellel társul, ALL-ben pedig a miR-124 down-regulációja szintén kedvezőtlen prognózist jelez [73, 93, 107, 108].

A mikro-RNS-ek a kemorezisztencia kialakulásához a kemoterápiás szer sejtekből történő exportjának vagy a daganatsejtek apoptózistól történő megmenekülésének elősegítésével is hozzájárulhatnak [109]. Ismert, hogy az ún. multidrog rezisztencia fehérjék szabályozásáért több mikro-RNS is felelős, amelyek megváltozott expressziós szintjét többféle tumorban is kimutatták [109]. Fontos ugyanakkor hangsúlyozni, hogy a gyógyszer típusától is függhet egy adott mikro-RNS hatása. A miR-34a például emlőtumor sejtvonalon a docetaxel rezisztencia kialakulását segíti elő, ezzel szemben a Ewing sarcoma sejteket érzékenyíti doxorubicin és vincristin kezeléssel szemben [109]. Gyermekkori ALL-ben a miR-99a, miR-100 és a miR-125b overexpressziója daunorubicin és vincristin rezisztenciával társult, aszparagináz rezisztencia esetén a miR-454 down-regulációját észlelték, továbbá a miR-708 szintje a prednisonkezelésre jól reagálóknál magasnak bizonyult, míg a kezelésre nem reagáló csoportban alacsony volt [110-112].

Tumorelles hatás elérése érdekében az oncomiR-ek szintjét csökkenteni, míg az anti-oncomiR-ek expresszióját növelni szükséges [113]. Az expressziós szintek csökkentése és növelése egyaránt többféle módon lehetséges. Az első olyan mikro-RNS-t célzó terápiás szer, mellyel klinikai tanulmányt kezdtek meg, az LNA-anti-miR-122 volt [96]. Az LNA szerkezetre a ribóz 2' oxigén- és 4' szénatomja közötti extra híd jellemző. E módosítás következtében az LNA-próbák a konvencionális DNS- vagy RNS-próbáknál jóval nagyobb affinitással kötődnek a komplementer RNS-szekvenciákhoz [114]. A mikro-RNS-ek érett alakjának gátlása mellett az érett alak képződése is megakadályozható, a mikro-RNS-ek processzióját célzó inhibitorok segítségével [115].

## 5.7 Epigenetika és metabolizmus kölcsönös egymásra hatása

2010 óta ismert, hogy az intermedier metabolizmus szinte valamennyi enzimének aktivitását befolyásolja a HAT enzimek által katalizált poszttranszlációs acetiláció, melynek mértéke összefüggést mutat az egyes tápanyagok, köztük a glükóz, aminosavak és zsírsavak koncentrációjával [116]. A metabolikus enzimek aktivitásának szabályozásában tehát az epigenetikai módosításokért felelős fehérjék fontos szerepet töltenek be, azonban a metabolizmus is visszhat az epigenetikai szabályozásra, hiszen az utóbbiért felelős „writer” és „eraser” funkciókat ellátó enzimek túlnyomó többsége metabolit kofaktorokat igényel működéséhez (6. táblázat) [117].

Metabolit kofaktor	Epigenetikai szabályozásért felelős enzim
S-adenozil metionin (SAM)	DNMT, HMT
acetil-koenzim A (acetil-CoA)	HAT
nikotinamid adenin dinukleotid (NAD <sup>+</sup> )	Sirtuinok
flavin adenin dinukleotid (FAD)	LSD típusú HDM enzimek
$\alpha$ -ketoglutarát ( $\alpha$ -KG)	TET, Jumonji C domént tartalmazó HDM enzimek

6. táblázat: Metabolit kofaktorokkal rendelkező, epigenetikai szabályozásért felelős enzimek

Megállapítható tehát, hogy az egyes metabolitok szintjének függvényében az epigenetikai módosításokért felelős enzimek aktivitása és következményesen a génexpressziós mintázat is módosul, továbbá hogy a sejtek elérhető tápanyagmennyiséghez történő alkalmazkodásában az epigenetikai szabályozó mechanizmusok kiemelt szerepet töltenek be [49, 118].

A metabolitszintek azonban nemcsak az epigenetikai szabályozásért felelős enzimek, hanem poszttranszlációs aciláció (például acetiláció, maloniláció, szukciniláció és glutariláció) révén a mitokondriumban jelenlévő enzimek aktivitását is befolyásolják. Az aciláció részben passzív módon megy végbe, részben azonban sirtuinok által katalizált enzimatis folyamat, mely újabb adatok szerint a mitomiR-eket is érintheti [38, 45, 65].

## 5.8 A Warburg effektus

Ismert, hogy a malignusan transzformálódott sejtek anyagcseréje jellegzetes módon megváltozik, melyet az epigenetikai szabályozás komplex kisiklásához hasonlóan a daganatsejteket jellemző karakterisztikus tulajdonságok közé sorolnak („novel hallmarks of cancer”) [119-121]. Az 1931-ben Nobel díjjal kitüntetett Otto Warburg 1920-as években tett megfigyelése szerint a tumorsejtek elegendő oxigén jelenlétében is a fokozott laktátképződést, az aerob glikolízist preferálják az oxidatív foszforilációval szemben [122-124]. A

tumorsejtekre jellemző fokozott glikolízis felfedezése képezi az alapját ma is a 18-fluorodezoxiglükóz (<sup>18</sup>FDG) PET diagnosztikában történő alkalmazásának [117]. A megfigyelés korszakalkotó jelentőségét jelzi továbbá, hogy az első onkogént csak 1970-ben, Otto Warburg halálának évében, míg az első tumorszuppresszor gént 14 évvel később azonosították [124]. Azóta bebizonyosodott, hogy a róla elnevezett, a tumorsejtek megváltozott metabolizmusát jelölő Warburg effektushoz a fokozott glikolízis mellett számos egyéb változás is hozzátartozik, melyek a szénhidrátok, lipidek, fehérjék és nukleinsavak anyagcseréjét egyaránt érintik [117]. A megváltozott metabolizmus szerepét a malignus betegségek patogenezise során alátámasztja, hogy számos fehérjekódoló onkogén és tumorszuppresszor gén rendelkezik a Warburg effektust elősegítő metabolikus hatással [119].

A malignusan transzformálódott sejtekre jellemző fokozott glükózfelvételért a glükóz transzporterek, különösen a GLUT1 up-regulációja felelős [119]. A glikolízis üteme az egészséges sejtekhez képest akár 200-szoros is lehet, amelyhez a fokozott glükózfelvétel mellett a glikolitikus gének overexpressziója is jelentős mértékben hozzájárul [119, 123]. A glikolitikus gének többségének transzkripciója mind a c-Myc, mind a hypoxia indukálta faktor 1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) által szabályozott [124]. Overexpressziójuk fenntartásáért limfoblasztoid sejtvonalakban főként a HIF1 $\alpha$ , míg Burkitt lymphoma esetén a c-Myc transzkripció faktor tartják felelősnek [125]. Ezzel szemben a fokozott glikolízist a tumorszuppresszor p53 ellensúlyozza a foszfofruktokináz I (PFK I) allosztrikus aktivátorát, a fruktóz-2,6-biszfoszfátot hasító TIGAR enzim aktivációja és a foszfoglicerát mutáz 2 (PGM2) gátlása révén [101, 124].

A fokozott glikolízis során nagy mennyiségben képződő laktátot a tumorsejtek az extracelluláris térbe választják ki, aminek immunszuppresszív hatást tulajdonítanak [126]. Feltételezett ugyanakkor, hogy a tumorsejtek egy kisebb hányada, illetve a strómasejtek esetében az oxidatív foszforiláció a hangsúlyosabb, aminek szerepe van a fokozott laktátképződés tumorra nézve kedvezőtlen hatásainak megelőzésében, például a túlzottan savas környezet kialakulásának megakadályozásában [127]. A laktát koncentrációja általában csak lokálisan, a tumoros mikrokörnyezetben emelkedik meg jelentősen, és a fokozott laktátképződésnek ritkán van szisztémás hatása, azonban a normoxia mellett kialakuló, hirtelen súlyosbodó, B típusú laktátacidózis a Warburg effektus ritka, életveszélyes szövődménye lehet hematológiai malignus betegségekben [128].

A glikolízis során egy molekula glükóz felhasználásával az oxidatív foszforilációhoz képest gyorsabban, de lényegesen kevesebb, 36 helyett mindössze 2 ATP-molekula képződik [126]. Az oxidatív foszforiláció háttérbe szorulásának következtében a termelődő ATP

mennyisége mellett a sejtek oxigénfogyasztása, valamint a mitokondriumokban képződő reaktív oxigéngyökök mennyisége is jelentős mértékben visszaesik [122, 126]. A HSC sejtek megfelelő differenciációjához azonban a reaktív oxigéngyökök magas szintje szükséges, így annak lecsökkenése a hemopoézis megzavarását eredményezi [129]. Ezzel összhangban a reaktív oxigéngyökök szintjének növekedését eredményező, már nem antioxidáns, hanem prooxidáns hatású, magas dózisú aszkorbinsav kezelés FAB M2 típusú HL-60 sejtvonalon a transzformálódott mieloid sejtek apoptózisának fokozódását eredményezte [130].

A malignusan transzformálódott sejtekben számos további, az egy szénatomtartalmú csoportok metabolizmusát érintő változást leírtak. Ezzel összhangban a folát metabolizmus gátlása a kemoterápia szerves részét képezi több mint 60 éve, míg a metilén tetrahydrofolát dehidrogenáz 2 (MTHFD2) a daganatsejtekben egyik leggyakrabban overexpresszáldó metabolikus enzim [1]. A tumorsejtek jelentős hányadára jellemző a metionin dependencia, melynek megvonásakor a SAM metabolizmus és a hiszton metilációs mintázat megváltozását észlelték, a transzszulfurációs útvonal által felszabadított kén-hidrogénről pedig igazolódott a daganatok növekedésére kifejtett gátló hatása [1].

A Warburg effektusra a fentiek mellett jellemző az anabolikus folyamatok, valamint a makromolekulák prekursoraiként szolgáló szerin és glicin szintézisének fokozódása [122, 131]. A 3-foszfoglicerát/2-foszfoglicerát arányának emelkedése a foszfoglicerát dehidrogenáz enzim (PHGDH) fokozott expressziójával együtt jelentős mértékben hozzájárul a glikolízis intermedierjeinek bioszintetikus reakciókban történő hasznosításához [131]. A tumorsejtek által az egészséges sejtekhez képest jóval nagyobb mennyiségben felhasznált glutamin glutaminolízis során történő hasítása a citrátköri intermedierek szintjének növekedését, valamint a lipid- és koleszterolszintézishez szükséges acetyl-CoA képződését egyaránt elősegíti [131]. A fokozott glutaminolízis emellett a malignusan transzformálódott sejtek glutathionszintjének növekedéséhez is hozzájárul, ezáltal csökkentve a reaktív oxigéngyökök mennyiségét, ami védelmet biztosít a sejt számára az oxidatív stresszel szemben [124, 132].

A daganatos betegségekre jellemző bizonyos metabolikus enzimek tumorspecifikus izoformáinak expressziója, melyek közül legismertebbek a piruvát kináz M2-es (PKM2), illetve a hexokináz II-es izoformája (HK II). A piruvát kináz PKM2 izoformájának a tumorsejtekben észlelt up-regulációjáért a c-Myc által indukált splicing faktorok felelősek [124, 131, 133]. Fokozott glikolízis irányában ható dimer és az oxidatív foszforilációt fokozó tetramer formája egyaránt létezik, melyek közül tumorokban az előbbi forma van túlnyomó többségben, emellett a PKM2 a HIF1 $\alpha$  koaktivátoraként elősegíti a laktát dehidrogenáz (LDH) és a piruvát dehidrogenáz kináz (PDK) fokozott transzkripcióját, és egyes hiszton

oldalláncok foszforilációja révén a génextpresszió szabályozásában is részt vesz [120, 133]. A hexokináz daganatsejtekben expresszálandó HK II-es izoformájának aktivációjához újabb adatok szerint az Akt fehérje jelentős mértékben hozzájárul [124].

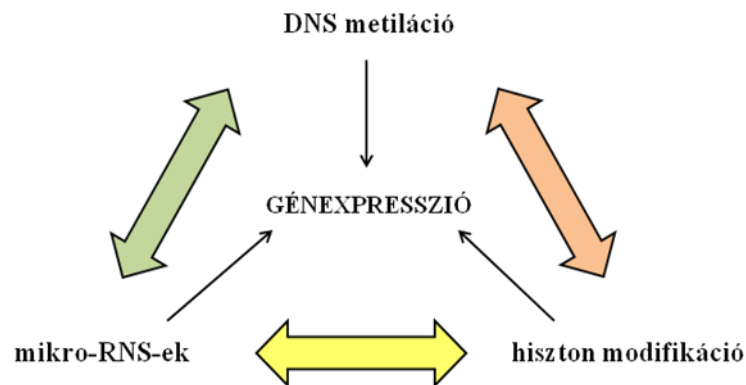
A malignus betegségekben gyakoriak a citrátkör enzimeit érintő mutációk, melyek a citrátköri intermedierek szintjének megváltozásához vezetnek [124]. A mutációk által leggyakrabban érintett enzimek hematológiai malignus betegségekben az izocitrát dehidrogenáz, szolid tumorokban pedig a fumarát hidratáz (FH) és a szukcinát dehidrogenáz. Mindhárom esetben  $\alpha$ -ketoglutarát analóg molekulák szaporodnak fel, ami kompetitív antagonizmus révén az  $\alpha$ -KG-dependens enzimek, köztük az epigenetikai módosításokért felelős TET2 és a Jumonji C domént tartalmazó hiszton demetilázok gátlását eredményezi [17]. Az IDH mutációk funkcionyerésesnek tekinthetők, mivel a mutáns IDH enzimek új enzimaktivitásra tesznek szert, és  $\alpha$ -ketoglutarát képzése helyett az onkometabolitnak tartott 2-hidroxi-glutarátot hozzák létre [17]. Az FH és SDH mutációk nyomán felszaporodó fumarát és szukcinát az IDH mutációkhoz hasonlóan gátolja a TET, valamint a Jumonji C domént tartalmazó HDM enzimek aktivitását, de emellett a szintén  $\alpha$ -ketoglutarát dependens proliil-hidroxiáz enzim gátlása révén a HIF1 $\alpha$  stabilizációjához, és ezáltal a fokozott glikolízis fenntartásához is hozzájárulnak [134].

Warburg a fokozott glikolízis és laktátképződés háttérében mitokondriális diszfunkciót valószínűsített, és bár azóta bebizonyosodott, hogy a jelenség oka alapvetően a glikolízis szabályozásának felborulása, a mitokondriális légzési lánc enzimeit érintő mutációk szintén ismertek daganatos megbetegedésekben [124, 135]. Ezen mutációk következtében sérül az oxidatív foszforiláció mechanizmusa, és megemelkedik a reaktív oxigéngyökök szintje, mely változások a mitokondriális membránpotenciál csökkenéséhez és a mitokondrium diszfunkciójához, valamint a HIF1 $\alpha$  transzkripció faktor stabilizációjához vezetnek [135].

Mára bebizonyosodott, hogy a Warburg effektusban a fentiek mellett az epigenetikai szabályozó mechanizmusok zavara is fontos szerepet tölt be. Közülük legtöbb adat a sirtuinok, valamint a mikro-RNS-ek metabolizmusra gyakorolt hatásáról áll rendelkezésre, melyekre a diszkusszióban térünk vissza részletesebben. A malignusan transzformálódott sejtek metabolizmusában bekövetkező, fentebb ismertetett jellegzetes változások mellett fontos kiemelni, hogy különböző típusú malignus betegségek esetén a Warburg-típusú metabolizmus más-más elemei lehetnek hangsúlyosabbak. Mindezt alátámasztja, hogy leukémia sejtvonalak összehasonlító vizsgálata során azok eltérő érzékenységet mutattak a különböző metabolikus változásokat célzó terápiás szerekkel szemben [136].

## 5.9 Kölcsönhatások citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések, valamint epigenetikai mechanizmusok között

A fentebb ismertetett epigenetikai szabályozó mechanizmusok egymás működését kölcsönösen befolyásolják. Ismertek hiszton deacetiláz és DNS metiltranszferáz enzimek közötti kölcsönhatások, melyek közül sok szerepel a mikro-RNS-ek target génjei között, a mikro-RNS-ek expressziós szintje ugyanakkor DNS-metiláció és hiszton modifikáció által szintén szabályozott (4. ábra) [2, 72].



4. ábra: Az epigenetikai szabályozó mechanizmusok kölcsönösen befolyásolják egymást

ALL és AML esetén az ismert tumorszuppresszor miR-124 promoter DNS-hipermetiláció révén bekövetkező gyakori inaktivációját észlelték, mely a CDK6 up-regulációját, a retinoblasztóma fehérje következményes foszforilációját és a sejtek fokozott proliferációját eredményezi [93, 137]. A miR-124 epigenetikai úton bekövetkező csendesítése az akut leukémiák mellett CLL, CML, myeloma multiplex és non-Hodgkin lymphoma esetén is gyakorinak bizonyult [137]. A hipermetiláció mellett promoter hipometiláció szintén okozhatja egyes mikro-RNS-ek expressziós szintjének megváltozását [99]. CLL-ben a HDAC enzimek overexpressziója igazoltan hozzájárul a tumorszuppresszor tulajdonságú miR-15, miR-16 és miR-29b down-regulációjához [138].

Az egyes epigenetikai szabályozó mechanizmusokért felelős enzimek és mikro-RNS-ek nemcsak egymással, hanem a hematológiai malignus betegségekre jellemző fúziós géntermékekkel és a molekuláris genetikai eltérések által érintett fehérjékkal is sokszoros kölcsönhatásban állnak [70]. AML-ben a molekuláris genetikai eltérések előfordulásának gyakorisága közel 80% [139]. Ezen mutációk jelentős része epigenetikai módosításokért felelős enzimeket érint, melyeknek a betegség patogenezisében fontos szerepet tulajdonítanak [140]. A mutációk gyakorisága sokszor a társuló citogenetikai eltérések függvényében

változik, illetve azok sok esetben kombinációban fordulnak elő, ami az egyes eltérések prognosztikai relevanciáját jelentősen befolyásolja.

A DNS-metilációs mintázat megváltozásához vezető, hematológiai malignus betegségekben gyakran előforduló molekuláris genetikai eltérések az IDH, a TET2, valamint a DNMT3A enzimeket érintő mutációk. Közülük az IDH és TET2 mutációk egymást kölcsönösen kizárják [140]. Gyermekkori AML-ben az IDH enzimeket érintő mutációk t(8;21) és t(15;17) transzlokáció esetén gyakoribbnak bizonyultak [141]. Az IDH1 R132 és IDH2 R140 mutációk esetén gyakori a normál kariotípus mellett jelenlévő NPM1 mutáció, míg az IDH2 R172 mutációhoz egyéb molekuláris genetikai eltérés általában nem társul [141]. IDH mutáció az NPM1 mellett FLT3-ITD-vel is társulhat, amely tripla mutáció a blaszto sejtmagjának jellegzetes „cup-like” morfológiájával párosul [141]. Érdekességképpen megjegyezzük, hogy előzetes eredmények szerint a miR-125b magas expressziós szintje utalhat IDH2 R172 mutáció jelenlétére [141]. A TET2 enzim mutációja az AML-es betegeknél általában heterozigóta formában van jelen [17, 140]. Az általa létrehozott 5-hmC marker szintje a mutációt hordozók csontvelő mintájában lényegesen alacsonyabbnak bizonyult, mint a TET2 mutációt nem hordozó betegek esetén [19, 20, 30]. A de novo DNS-metilációért felelős DNMT3A enzim mutációinak többsége az R882 arginin aminosavat érintő heterozigóta mutáció, amely domináns negatív hatást fejt ki, és csökkent enzimaktivitáshoz vezet [140]. A DNMT3A mutáció gyakoribb FAB M4 és M5 altípusú AML esetén, továbbá FLT3, NPM1 vagy IDH mutáció egyidejű jelenléte esetén, ugyanakkor csak elvétve fordul elő t(8;21), inv(16) és t(15;17) transzlokáció esetén [29].

Leukémiában nemcsak az epigenetikai szabályozásért felelős fehérjéket érintő mutációk, hanem a citogenetikai eltérések által előidézett epigenetikai változások is gyakoriak. A hematológiai malignus betegségekben transzlokációk révén képződő fúziós onkoproteinek egyik tagja sok esetben valamilyen epigenetikai marker létrehozásáért felelős enzim, továbbá a fúziós géntermékek gyakran indukálnak következményes epigenetikai változásokat [50]. Mindez elsőként PML/RAR $\alpha$  transzlokációval társuló AML-ben igazolódott, melyben a fúziós géntermék DNMT és HDAC enzimek toborzása révén idézi elő a RARB2 gén inaktivációját [21].

Az MLL nevű, SET domént tartalmazó hiszton metiltranszferáz enzim a leukémiákban előforduló nagyszámú különböző transzlokáció révén sokféle fehérjével alkothat fúziós onkoproteint [19]. Ezen fúziós géntermékek az MLL-lel szemben nem tartalmazzák a H3K4 HMT aktivitásért felelős SET domént, azonban a transzlokációs partnerek és a DOT1L H3K79 hiszton metiltranszferáz enzim közötti kölcsönhatás által részt vesznek a hiszton

metilációs mintázat indirekt szabályozásában [20]. Az MLL fúziós partnerei közül elsőként az AF10 kölcsönhatása igazolódott a DOT1L fehérjével, amely transzlokáció esetén az MLL/AF10 fúziós géntermék a DOT1L enzim HOX génekhez történő toborzása révén azok H3K79 metilációjához és következményes overexpressziójához vezet [11, 51]. Az MLL/AF4 és MLL/AF9 transzlokációk esetén a H3K79me<sub>3</sub> marker szintjének megemelkedését szintén a fúziós géntermékek DOT1L enzimet toborzó hatásának tulajdonítják [19, 142]. Fentiek mellett az MLL számos epigenetikai módosításért felelős enzimmel is képezhet transzlokáció révén fúziós gént. A DNS hidroximetilációját katalizáló TET1 enzimet eredetileg az MLL transzlokációs partnereként azonosították t(10;11)(q22;q23) transzlokációval társuló AML-ben [17]. Az MLL és hiszton acetiltranszferázok közti transzlokációk révén képződő MLL/CBP és MLL/p300 fúziós fehérjék a hiszton metilációs és acetilációs mintázat megváltozásáért egyaránt felelősek [50].

Fentiek mellett a hematológiai malignus betegségekben bekövetkező transzlokációk révén létrejövő fúziós gének mikro-RNS-ekkel is kölcsönhatnak. Például az AML1/ETO fúziós onkoprotein HDAC, DNMT, valamint reader fehérjék toborzása révén gátolja a mieloid differenciáció szabályozásáért felelős miR-223 expresszióját [35, 143]. A fehérjekódoló onkogének és tumorszuppresszor gének szabályozásáért epigenetikai mechanizmusok is felelősek, továbbá maguk is előidézhetnek következményes epigenetikai változásokat. A malignus betegségek sokféle típusa esetén jellemző például a miR-17-92 klaszter c-Myc általi aktivációja, illetve a p53 targetjei közé tartozó, evolúciósan konzervált miR-34 család down-regulációja [66, 67].

### **5.10 Epigenetikai és metabolikus eltéréseket célzó terápiás szerek kombinációja egymással és konvencionális kemoterápiás szerekkel**

A rendelkezésre álló eredmények alapján az epigenetikai támadáspontú szerek kombinációja egymással és konvencionális kemoterápiás szerekkel egyaránt ígéretes lehetőség a hematológiai malignus betegségek kezelésében (4. táblázat) [2, 34]. AML és ALL sejtvonalakon a NAD<sup>+</sup>-független hiszton deacetiláz enzimek és a NAD<sup>+</sup>-függő sirtuinok egyidejű gátlása esetén szinergisztikus antileukémiás hatást tapasztaltak, ami a HDAC enzimek eltérő kofaktor alapján megkülönböztetett két csoportja közötti kooperációra utal a leukémia patogenezise során [144]. Hasonlóan szinergisztikus hatást eredményezett AML sejtvonalakon a chaetocin nevű HMT inhibitornak, valamint az ismert HDAC inhibitor trichostatin A-nak az együttes alkalmazása [145]. FLT3-ITD mutációt hordozó AML sejtvonalakon a HDAC inhibitor pracinostat és a JAK2/FLT3 inhibitor pacritinib együttes

alkalmazása esetén is szinergisztikus antileukémiás hatást észleltek [146]. Szintén egymás hatékonyságát fokozta az MLL gént érintő transzlokációt hordozó sejtvonalakban a DOT1L hiszton metiltransferáz és az LSD1 hiszton demetiláz enzimek egyidejű gátlása [62].

Előzetes eredmények alapján a hiszton deacetiláz inhibitorok alkalmazása érzékenyebbé teszi a sejteket a sugárterápiával, a topoizomeráz gátlókkal, továbbá a ciszplatin kezeléssel szemben [147, 148]. A HDAC inhibitorok mellett a DNMT enzimek gátlószerei is növelhetik a malignusan transzformálódott sejtek fogékonyságát a konvencionális kemoterápiás szerekkel szemben, illetve elősegítik a daganatsejtek elleni immunválasz kifejlődését [4]. Ugyanakkor nemcsak az epigenetikai támadáspontú szerek befolyásolhatják a konvencionális terápiás szerek alkalmazásának eredményességét. Bizonyítékok növekvő sora igazolja, hogy a konvencionális kemoterápiás szerek szerteágazó epigenetikai változásokat indukálnak. Befolyásolják például nagyszámú mikro-RNS expressziós szintjét, valamint előidézhetik egyes gének promoter metilációs mintázatának, illetve a hisztonkódnak a megváltozását is [113, 149]. CML-ben például az imatinib kezelés megkezdésétől számított 2 hét múlva a miR-146a és a miR-150 up-regulációját, továbbá a miR-142-3p és a miR-199b-5p expressziós szintjének csökkenését tapasztalták, az onkogén sajátságú miR-17-92 klaszter down-regulációja mellett [81, 99].

A daganatsejtek megváltozott metabolizmusát célzó terápiás szerek szintén alkalmazhatóak lehetnek a jövőben a szolid tumorok mellett a leukémiák kezelése során is. A Warburg effektus gátlása céljából adható a 2-deoxiglükóz, a dikloroacetát, valamint a 3-bromopiruvát [127, 150]. Azonban a malignusan transzformálódott sejtekben az oxidatív foszforiláció mechanizmusa általában intakt, ami a glikolízis inhibitorokkal szembeni rezisztencia kialakulásához vezethet, továbbá felveti a glikolízis és az oxidatív foszforiláció egyidejű gátlásának szükségességét [127, 151]. A megváltozott metabolizmust célzó szerek az epigenetikai támadáspontú szerekhez hasonlóan citosztatikumokkal kombinálva a kemorezisztencia áttörését eredményezhetik [152].

### **5.11 Epigenetikai és metabolikus eltérések jelentősége a leukémia patogenezisében**

A javuló terápiás eredmények ellenére az akut leukémiában szenvedő betegek jelentős részét továbbra is elveszítjük a terápiára adott elégtelen válasz vagy éppen annak toxicitása következtében. Felnőttkori AML-ben az 5 éves túlélés napjainkban is mindössze 25% körüli [29]. Mára bebizonyosodott, hogy a malignus betegségek kialakulásának hátterében a génexpressziós mintázatot meghatározó komplex szabályozó hálózat számos elemének

egyidejű funkciózavara áll, és a tumorok létrejöttében a genetikai eltérések mellett az epigenetikai változások halmozódása szintén kiemelt jelentőséggel bír [20]. Ennek megfelelően a leukémiát nemcsak genetikai, hanem epigenetikai betegségnek is kell tekintenünk, amelyre az epigenetikai szabályozás komplex zavara jellemző [11].

Az eddig rendelkezésre álló eredmények alapján az epigenetikai és metabolikus eltérések a malignus betegségek patogenezisének bármely fázisában bekövetkezhetnek. Jelenlétük azonban sokszor már a citogenetikai és molekuláris genetikai eltéréseket megelőzően észlelhető, ezzel összhangban szolid tumorokban a kromatinállományt érintő változások jóval az invazív betegség kifejlődése előtt megfigyelhetőek, a tumorszuppresszor gének promotor régiójának hipermetilációját és egyes mikro-RNS-ek expressziós szintjének megváltozását pedig a karcinogenezis kifejezetten korai eseményének tartják [23, 34, 153]. Leukémiában az epigenetikai szabályozásért felelős enzimeket érintő mutációk közül az ASXL1, DNMT3A, IDH1/2 és TET2 mutáció létrejöttét szintén korai stádiumban bekövetkező eseménynek tartják [20, 29, 140]. Mindez, az epigenetikai és metabolikus változások reverzibilis természetével együttesen a terápiás beavatkozás lehetőségének új szintjét nyitja meg, és egyben jelzi az eltérések lehető leghamarabb történő kimutatásának jelentőségét.

Az eredményesebb kezeléshez feltétlenül szükséges a jelenlegieknél specifikusabban ható és kevésbé toxikus szerek alkalmazása, amely feltételeknek az epigenetikai és metabolikus támadáspontú terápiás szerek a klinikai vizsgálatok eredményei alapján sok szempontból megfelelnek, azonban fontos szem előtt tartanunk, hogy a specificitás sokszor ezen esetekben is elégtelen, valamint kemorezisztencia a konvencionális kemoterapeutikumokhoz hasonlóan a célzott terápiás szerekkel szemben is kialakulhat [20, 34].

## 6. Célkitűzések

Az epigenetikai szabályozás kisiklása, illetve a sejtanyagcsere Warburg effektus néven ismert jellegzetes megváltozása a malignus betegségek kialakulásának igazoltan fontos etiológiai tényezői, melyek leukémiában is ígéretes terápiás célpontok.

In vitro vizsgálatok eredményei a NAD<sup>+</sup>-függő sirtuinok és a NAD<sup>+</sup>-független hiszton deacetiláz enzimek egyidejű gátlásának szinergisztikus antileukémiás hatását jelzik, továbbá felvetik a SIRT6 és a HDAC4 patogenetikai szerepét hematológiai malignus betegségekben. Potenciális onkogén vagy tumorszuppresszor tulajdonságukról ugyanakkor ellentmondásos adatok állnak rendelkezésre, akut mieloid leukémiában pedig expressziós szintjüket korábban nem tanulmányozták.

Számos mikro-RNS szerepe ismert a hematológiai malignus betegségek patogenezisében, melyek onkogén vagy tumorszuppresszor tulajdonságúak, illetve a hemopoézis szabályozásáért felelősek. Akut mieloid leukémiában nem tisztázták még azonban a Warburg effektushoz szolid tumorokban igazoltan hozzájáruló miR-378\*, miR-23b, illetve miR-26a patogenetikai szerepét.

Az általunk tanulmányozott hiszton deacetiláz enzimeket és mikro-RNS-eket, valamint a hozzájuk kapcsolódó legfontosabb irodalmi adatokat a 7. táblázatban foglaltuk össze. A felnőttkori hematológiai malignus betegségekben, elsősorban akut mieloid leukémiában szenvedő betegek csontvelő mintáin végzett Western blot és RT-qPCR vizsgálataink legfőbb céljai az alábbiak voltak:

- (1) NAD<sup>+</sup>-függő és NAD<sup>+</sup>-független hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintje közötti kapcsolat vizsgálata**
- (2) A SIRT6 és a HDAC4 hiszton deacetiláz enzimek patogenetikai szerepének vizsgálata**
- (3) A miR-378\*, miR-23b, illetve miR-26a patogenetikai szerepének vizsgálata**
- (4) Hiszton deacetilázok és mikro-RNS-ek expressziós szintjének összehasonlítása a felnőttkori AML különböző alcsoportjaiban**
- (5) Hiszton deacetiláz enzimek és mikro-RNS-ek expressziós szintje, valamint a diagnózis idején megállapított klinikai adatok közötti összefüggések vizsgálata**
- (6) Kemoterápia indukálta változások tanulmányozása hiszton deacetiláz enzimek és mikro-RNS-ek expressziós szintjében**

<b>SIRT6</b>	NAD-függő HDAC enzim [35] glikolízis epigenetikai szabályozása [126] a hemopoézis során jelentős TET2 enzimet szabályozza [52] CLL-ben up-reguláció [55]
<b>HDAC4</b>	NAD-független HDAC enzim [35] kölsönhat az FLT3 jelátviteli útvonallal [54] gyermekkori ALL-ben up-regulációja kedvezőtlen [58]
<b>miR-124</b>	tumorsuppresszor mikro-RNS (anti-oncomiR) [93] tumorspecifikus piruvát kináz M2 izoforma expressziójának gátlása [122] hematológiai malignus betegségekben gyakori inaktiváció [137]
<b>miR-155</b>	onkogén mikro-RNS (oncomiR) [82] tumorspecifikus hexokináz II-es izoforma expressziójának elősegítése [122] hematológiai malignus betegségekben up-reguláció [96]
<b>miR-125b</b>	mieloid sejtek differenciációjának szabályozása [84] AML-ben up-reguláció [84]
<b>miR-378*</b>	citrátköri enzimek expressziójának gátlása [123]
<b>miR-23b</b>	peroxiredoxin III up-regulációja, ROS szintek csökkenése [129] fokozott glutaminolízis gátlása [123]
<b>miR-26a</b>	peroxiredoxin III up-regulációja, ROS szintek csökkenése [129] PDH X komponens szabályozása [160] a hemopoézis során jelentős TET2 enzimet szabályozza [86]

7. táblázat: Vizsgált hiszton deacetiláz enzimek és mikro-RNS-ek

## 7. Módszerek

### 7.1 Betegek és felhasznált minták

Munkánk során összesen 45, hematológiai malignus betegségben szenvedő felnőtt betegtől származó, egyenként 1,5-2 ml mennyiségű, a diagnózis idején EDTA-tartalmú csőbe levett csontvelő mintában határoztuk meg fehérjék, mRNS-ek és mikro-RNS-ek expressziós szintjét (8. táblázat). A mintákat BM001-től BM080-ig kódoltuk, és a feldolgozás kezdetéig -20°C-os hőmérsékleten tároltuk. A betegek túlnyomó többsége akut mieloid leukémiában szenvedett (n=32 a fehérjeszintű vizsgálatok esetén és n=27 az RNS-vizsgálatok során). Ezen felül mind a fehérje-, mind az RNS-szintű vizsgálatok során felhasználtuk akut limfoid leukémiában (n=2), kevert fenotípusú akut leukémiában (n=1), mielodiszplázias szindrómában (n=4), hajjas sejtes leukémiában (n=1), illetve csontvelői infiltrációval társuló Hodgkin lymphomában (n=1) szenvedő betegek mintáit. További két minta egyéb típusú malignitásokban szenvedő betegektől származott (BM067: tüdő adenocarcinoma, BM039: mieloid sarcoma), melyek csontvelői érintettség jeleit nem mutatták. Két, FAB M5 altípusú AML-es beteg esetén a diagnózis idején levett minta mellett egy-egy, a kezelés kezdetétől számított 4 hét múlva levett csontvelő minta vizsgálata is megtörtént. A citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések (kariotípus, FLT3-ITD és FLT3-TKD mutáció, az NPM1 gén 12-es exonjában bekövetkező 4 bázispárnyi inszerció), a csontvelői blaszt arány meghatározása, továbbá a perifériás vérkép vizsgálata a rutin diagnosztikai eljárások keretében történt a Debreceni Egyetem Laboratóriumi Medicina-, illetve Pathológiai Intézetében. Mivel a mieloproliferatív betegségek és az akut leukémiák klasszifikációját az Egészségügyi Világszervezet (WHO) 2016-ban újította meg [154], és a betegek jelentős részénél ezt megelőzően igazolódott a diagnózis, ezért ezt a szempontrendszert az AML-es betegek csoportosítása során nem követtük.

### 7.2 Etikai engedély

A csontvelő minták levétele, tárolása és az azokon végzett valamennyi laboratóriumi vizsgálómódszer végrehajtása a Helsinki Deklarációban foglalt irányelvek szerint, valamint az általunk benyújtott DEOEC RKEB/IKEB 3955-2013 protokoll azonosítójú kutatás Egészségügyi Tudományos Tanács Tudományos és Kutatásetikai Bizottság által jóváhagyott etikai engedélyében (ETT TUKEB 12497-5/2014 EKV, 115/2014) foglaltak betartásával történt. Ezen engedély nem terjedt ki egészséges önkéntes donoroktól történő csontvelői mintavételre.

## 7.3 Laboratóriumi módszerek

### 7.3.1 Mintapreparálás Western blot analízishez

500 µl mennyiségű, EDTA-tartalmú csőbe levett, a feldolgozásig -20°C-os hőmérsékleten tárolt csontvelő mintát a felolvasztást követően proteáz inhibitor koktélt (PIC) (Sigma, katalógusszám: P8340) tartalmazó lízispufferben lizáltunk, majd szonikáltunk. A minták fehérjetartalmát BCA fehérjemeghatározó reagensek (Life Technologies, katalógusszám: 23225) felhasználásával, 490 nm hullámhosszon történő spektrofotometria segítségével határoztuk meg. Az eredményeket az Origin 8 programmal értékeltük ki. Az így előkészített minták 20-20 µl-es mennyiségeit 2x-es SDS mintapuffer tartalmú oldatban (Sigma, katalógusszám: S3401-10VL) 4 µg/µl koncentrációjúra hígítottuk, és felfőzést követően (ThermoBlock, 10 min, 100°C) további felhasználásig ismételtelen lefagyasztottuk (-20°C).

Minta azonosító kód	Diagnózis	FAB típus (AML esetén)	Kariotípus	Blaszt %	MDS-ből történt transzformáció (AML)	FLT3-ITD mutáció (AML)	FLT3-TKD mutáció (AML)	NPM1 mutáció (AML)	WBC (G/l)	RBC (T/l)	HGB (g/l)	PLT (G/l)
BM001	AML	M0	46, XX	91	Nem	Nem	Igen	Nem	107,1	1,25	45	30
BM002	AML	M5	46, XX, 6q deléció	88	Nem	Nem	Nem	Nem	144,3	3,38	94	61
BM003	MDS		46, XX	Nincs adat					1,91	3,89	80	166
BM004	AML	M4	46, XY	40	Nem	Nem	Nem	Nem	39,1	2,69	80	139
BM005	AML	M2	Nincs adat	90	Igen	Nincs adat	Nincs adat	Nincs adat	1,61	2,72	87	98
BM006	AML	M5	47, XX, 8 triszómia	90	Nem	Nincs adat	Nincs adat	Nincs adat	10,04	4,33	130	51
BM007	AML	M0	46, XX, 3p deléció, 5 monoszómia, +marker kromoszóma	95	Nem	Nem	Igen	Nem	182	2,26	78	46
BM008	AML	M4	45-48, XX, komplex kariotípus	35	Igen	Nincs adat	Nincs adat	Nincs adat	9,86	2,96	84	7
BM009	AML	Nincs adat	46, XX, t(3;5)(q21;q31)	49	Nem	Igen	Nem	Nem	89,48	3,12	102	170
BM014	AML	Nincs adat	Nincs adat	67	Nem	Nincs adat	Nincs adat	Nincs adat	23,77	2,61	83	24
BM015	MDS		46, XY, inv(9)	<1					2,92	2,06	72	33
BM019	AML	M2	46, XX	50	Nem	Nem	Igen	Igen	1,46	3,29	106	79

<b>BM020</b>	ALL		47, XY, 8 triszómia	100					221,6	4,14	128	16
<b>BM024</b>	MDS		46, XY	<1					3,78	2,56	80	76
<b>BM026</b>	AML	M5	46, XY	Nincs adat	Nem	Nem	Nem	Igen	213,6	2,17	73	121
<b>BM028</b>	AML	M5	Nincs adat	Nincs adat	Igen	Nincs adat	Nincs adat	Nincs adat	27,99	3,27	99	9
<b>BM029</b>	MPAL		Nincs adat	70					6,28	3,21	100	45
<b>BM030</b>	AML	M2	Nincs adat	36	Igen	Nem	Nem	Nem	3,7	3,24	97	15
<b>BM032</b>	AML	M2	46, XX	65	Igen	Nem	Nem	Nem	2,12	2,88	87	32
<b>BM033</b>	AML	M2	46, XX	80	Igen	Nem	Nem	Igen	10,86	2,38	75	82
<b>BM034</b>	HL, csontvelői érintettséggel		46, XY	0,6					4,77	4,16	96	137
<b>BM035</b>	AML	M4	46, XX	65	Nem	Nem	Nem	Nem	0,82	2,11	75	117
<b>BM039</b>	Mieloid sarcoma, csontvelői érintettség nélkül		Nincs adat	0					5,05	4,43	125	343
<b>BM040</b>	AML	M5	46, XX	95	Nem	Igen	Nem	Igen	110,5	2,06	84	116
<b>BM043</b>	AML	Nincs adat	43-44, X, -Y, komplex kariotípus	Nincs adat	Igen	Nincs adat	Nincs adat	Nincs adat	1,93	2,89	84	11
<b>BM050</b>	AML	M0	46, XY	79	Nem	Nem	Nem	Nem	3,72	2,98	85	100
<b>BM052</b>	MDS		46, XY, t(16;16)	Nincs adat					13,52	2,54	67	547
<b>BM059</b>	HCL		46, XY	Nincs adat					2,08	2,69	96	312
<b>BM061</b>	AML	M3	46, XX, t(15;17)	90	Nem	Igen	Igen	Nem	22,45	2,3	69	8
<b>BM063</b>	AML	Nincs adat	47, XX, komplex kariotípus	45	Nem	Nincs adat	Nincs adat	Nincs adat	1,7	1,65	55	71
<b>BM066</b>	AML	Nincs adat	46, XX	80	Igen	Nem	Nem	Igen	12,14	2,73	88	189

<b>BM067</b>	Tüdő adenocarcinoma, csontvelői érintettség nélkül		Nincs adat	0					8,35	4,06	106	270
<b>BM068</b>	AML	M2	46, XX	90	Nem	Igen	Nem	Igen	74,25	3,08	109	48
<b>BM069</b>	AML	M4	46, XY, 18p deléció	80	Nem	Nincs adat	Nincs adat	Nincs adat	47,2	3,43	103	24
<b>BM070</b>	AML	M2	46, XY	90	Igen	Nem	Nem	Nem	18,88	2,21	65	34
<b>BM071</b>	AML	M4	46, XX	80	Nem	Igen	Nem	Nem	41,26	2,01	74	149
<b>BM072</b>	AML	M4	47, XX, 8 triszómia	25	Nem	Nem	Nem	Nem	2,43	2,35	75	82
<b>BM073</b>	AML	M6	47, XY, 8 triszómia	Nincs adat	Nem	Nem	Nem	Nem	3,06	2,67	91	9
<b>BM074</b>	AML	M1	46, XX	85	Igen	Nem	Nem	Igen	16,48	1,32	49	28
<b>BM075</b>	AML	M4	46, XY	22	Nem	Igen	Nem	Igen	28,14	4,11	129	370
<b>BM076</b>	AML	M4	46, XY, inv(16)	45	Nem	Nem	Nincs adat	Nem	16	2,64	87	53
<b>BM077</b>	AML	M4	46,XX	47	Igen	Igen	Nem	Igen	303,9	1,38	41	55
<b>BM080</b>	ALL		46, XX, t(9;22)(q34;q11)	96					664	1,76	60	35
<b>BM055</b>	ismételt méréshez vett minta (BM026)											
<b>BM064</b>	ismételt méréshez vett minta (BM006)											

**8. táblázat:** Hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegek (n=45) diagnózis idején megállapított klinikai adatai, valamint a csontvelő mintákban észlelt citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések. Az ismételt mérésekhez (BM055, BM064) a diagnózist és egyben a kezelés megkezdését követően 4 héttel ismételt csontvelői mintavétel történt.

### 7.3.2 Western blot analízis és denzitometria

A fentebb írtak szerint előkészített mintákból 50 µg fehérjét tartalmazó mennyiségeket (12,5 µl) vittünk fel 10%-os gélekre SDS poliakrilamid gélelektroforézishez (SDS-PAGE), melyet 120 V feszültség beállításával végeztünk, 90 percig, Dual Color fehérjestandard (BioRad, katalógusszám: 1610374) felhasználásával. Ezt követően a fehérjék nitrocellulóz membránra történő transzferálási lépését 110 V-on hajtottuk végre, szintén 90 percig. A membrán aspecifikus kötőhelyeit 5%-os marhaszérum albumin (BSA) tartalmú oldatban való inkubációval blokkoltuk, 60 percen át. Az alkalmazott primer és szekunder antitesteket a 9. táblázatban foglaltuk össze.

<b>antitest</b>	<b>gyártó</b>	<b>katalógusszám</b>	<b>hígítás</b>
<i>anti-HDAC4</i>	Cell Signaling	2072	1:1000
<i>anti-SIRT6</i>	Cell Signaling	8771	1:1000
<i>anti-LAMIN A/C</i>	Santa Cruz Biotechnology	sc-20681	1:1000
<i>anti-GAPDH</i>	Santa Cruz Biotechnology	sc-47724	1:5000
<i>anti-rabbit</i>	Sigma	A0545	1:7000
<i>anti-mouse</i>	Cell Signaling	7076	1:5000

9. táblázat: Az alkalmazott primer és szekunder antitestek

A vizsgált fehérjék molekulatömege: HDAC4: 140 kDa, SIRT6: 42 kDa, LAMIN A&C: 69&62 kDa, GAPDH: 37 kDa. A membránok inkubációját az elsődleges antitestekkel 16 órán keresztül, 4°C-on, a másodlagos antitestekkel 2 órán át, szobahőn végeztük. Az anti-GAPDH kivételével valamennyi elsődleges antitest esetén anti-rabbit másodlagos antitestet alkalmaztunk. Az anti-GAPDH esetén az alkalmazott szekunder antitest anti-mouse volt. SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Life Technologies, katalógusszám: 34080) és SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Life Technologies, katalógusszám: 34095) felhasználásával a keletkező kemilumineszcens jeleket a FluorChem FC2 géldokumentációs rendszer (Alpha Innotech) és az AlphaEase FC szoftver segítségével detektáltuk. Az aspecifikus sávok meghatározása érdekében második antitest kontroll vizsgálatot (anti-rabbit) végeztünk. Denzitometriás analízis céljából az Image J szoftvert alkalmaztuk. A belső kontrollokra (LAMIN A/C, illetve GAPDH) történő normalizálás révén meghatároztuk a vizsgált fehérjék (HDAC4, illetve SIRT6) relatív expressziós szintjét az egyes mintákban. Adott fehérje átlagos relatív expressziós szintjét minden esetben két Western blot vizsgálat eredménye alapján határoztuk meg. A hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegek csontvelő mintáiban így nyert átlagos relatív

expressziós szinteket a fentebb írt két, csontvelői infiltrációt nem mutató mintában (BM039, BM067) nyert relatív expressziós szintek átlagára normáltuk.

### 7.3.3 RNS-izolálás és az izolált RNS koncentrációjának meghatározása

Az EDTA-tartalmú csövekbe levett csontvelő minták 500-500 µl-éhez megegyező mennyiségű TRI reagenst adtunk hozzá (Sigma, katalógusszám: T9424), majd kloroform, izopropanol és etanol felhasználásával izoláltuk a teljes RNS-frakciót. Az izolált RNS-t koncentrátor készülékkel (Concentrator plus, Eppendorf) beszárítottuk, majd nukleázmentes vízben (NFW) (Lonza, katalógusszám: 51200) reszuszpendáltuk. Az izolált teljes RNS-frakció koncentrációját NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer készülék segítségével határoztuk meg, 260 nm hullámhosszon. Az izolált RNS-t további felhasználásig -70°C-on tároltuk.

### 7.3.4 Reverz transzkripció és kvantitatív polimeráz lánreakció

Munkánk során 6 különböző mikro-RNS (miR-124, miR-155, miR-378\*, miR-23b, miR-26a) és 2 különböző hiszton deacetiláz enzim (HDAC4, SIRT6) relatív expressziós szintjét határoztuk meg hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegek csontvelő mintáiból a fentiek szerint izolált teljes RNS-frakciókban, reverz transzkripció (RT) és kvantitatív polimeráz lánreakció (qPCR) segítségével. Referencia génként az irodalomban ajánlott [66, 73, 155-160] U6 spliceosomal RNS-t alkalmaztuk. Az izolált teljes RNS-frakció koncentrációjától függően 900-1500 ng RNS reverz transzkripcióját végeztük el az Omniscript RT kit (Qiagen, katalógusszám: 205113) segítségével, 20 µl reakciótérfogatban, mely minden esetben tartalmazott 0,25µl 40 U/µl koncentrációjú RNáz inhibitor (Promega, katalógusszám: N261A). A reverz transzkripciót 60 percig végeztük, 37°C hőmérsékleten. A qPCR reakciókat LightCycler 480 Master készülékkel (Roche) hajtottuk végre, melyek során a mikro-RNS-ek esetén UPL21 próbát (Roche, katalógusszám: 04686942001) és 5 U/µl koncentrációjú Taq polimeráz enzimet (ThermoFisher Scientific, katalógusszám: EP0402), míg a hiszton deacetiláz enzimek és az U6 spliceosomal RNS esetén 2x SYBR Green Mastermixet (Roche, katalógusszám: 04887352001) alkalmaztunk. A qPCR reakciókat minden esetben triplikátumban végeztük, 20 µl reakciótérfogatban, mely a 2x-re hígított RT-termékből 5 µl-t tartalmazott. A qPCR reakciók során alkalmazott hőmérsékleti profil az alábbi volt:

- iniciáció: 3 perc 95°C (1x)
- amplifikáció: 10 sec 95°C, 30 sec 58°C, 1 sec 72°C (45x)
- hűtés: 10 perc 40°C (1x).

Az RT és qPCR reakciók során alkalmazott primerek szekvenciái a 10. táblázatban találhatóak. A mikro-RNS-ek MirBase adatbázisban megtalálható ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)) szekvenciája alapján szekvensspecifikus stem-loop és forward primereket terveztünk, egy a Czimmerer Zsolt és munkatársai által 2013-ban publikált, online elérhető szoftver segítségével ([www.mirnadesigntool.astridresearch.com](http://www.mirnadesigntool.astridresearch.com)) [161]. A mikro-RNS-ek relatív expressziós szintjének qPCR segítségével történő meghatározásához univerzális reverz primert alkalmaztunk. A HDAC és SIRT6 mRNS-szintű relatív expressziós szintjének meghatározásához szükséges primereket az online elérhető Universal Probe Library Assay Design Center ([www.lifescience.roche.com](http://www.lifescience.roche.com)) segítségével terveztük meg. Az U6 spliceosomal RNS vizsgálatához korábban publikált primerszekvenciákat alkalmaztunk [73]. Az RT-reakciókhoz szükséges stem-loop primereket 100  $\mu$ M koncentrációjára hígítottuk, amely oldatokból a 20  $\mu$ l térfogatú reakcióelegyek 0,2  $\mu$ l-t tartalmaztak. A mikro-RNS-ek esetén a qPCR során összeállított 20  $\mu$ l térfogatú reakcióelegyek a 100  $\mu$ M koncentrációjára hígított forward és univerzális reverz primerekből 0,06  $\mu$ l-t tartalmaztak. A HDAC4, SIRT6 és U6 esetén a szükséges primerekből, melyeket 10  $\mu$ M koncentrációjára hígítottunk, 1-1  $\mu$ l-t tartalmaztak a szintén 20  $\mu$ l térfogatú reakcióelegyek a qPCR során.

### 7.3.5 A qPCR adatok kiértékelése

Valamennyi qPCR reakciót triplikátumban végeztük. A  $C_p$  értékeket a Light Cycler 480 SW 1.5.0 szoftverrel, a relatív kópiaszámot a  $\Delta C_p$  módszer segítségével határoztuk meg. Az így nyert értékekből triplikátumonként átlagot számítottunk, majd a vizsgált gének és a referenciagén esetén kiszámított átlagértékek hányadosának meghatározásával kaptuk meg a vizsgált gének relatív expressziós szintjét.

hsa-miR-124-1-stem-loop	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC GGCATT
hsa-miR-155-5p-stem-loop	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC ACCCCT
hsa-miR-378*-stem-loop	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC ACACAG
hsa-miR-23b-3p-stem-loop	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC GGTAAT
hsa-miR-125b-1-stem-loop	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC TCACAA
hsa-miR-26a-5p-stem-loop	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAC AGCCTA
hsa-miR-124-1-forward	TTGGTAAGGCACGCGGTG
hsa-miR-155-5p-forward	GTGGGTTAATGCTAATCGTGAT
hsa-miR-378*-forward	GTTTCTCCTGACTCCAGGT
hsa-miR-23b-3p-forward	GTTGATCACATTGCCAGGG
hsa-miR-125b-1-forward	GTTTCCCTGAGACCCTAAC
hsa-miR-26a-5p-forward	GTTTGGTTCAAGTAATCCAGGA
universal reverse primer	GTGCAGGGTCCGAGGT
SIRT6-left	TCTTCCAGTGTGGTGTTC
SIRT6-right	CCTCCATGGTCCAGACTCC
HDAC4-left	AGATCCTCATCGTGGACTGG
HDAC4-right	GCTGGGGTCGCTGTAGAA
U6-reverse	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAATA
U6-upstream	CTCGCTTCGGCAGCACATA
U6-downstream	GTGCAGGGTCCGAGGT

10. táblázat: Az RT és qPCR reakciók során alkalmazott primerek szekvenciái

## 7.4 Statisztikai analízis, klaszteranalízis és ábratervezés

A statisztikai analízist (Kolmogorov-Smirnov teszt, t-teszt, Mann-Whitney teszt, Pearson-féle korreláció, Spearman-féle rangkorreláció) a SigmaStat 3.0 szoftver segítségével végeztük. A korrelációs koefficiens ( $r$ ) abszolút értéke szerint nagyon szoros ( $0.7 \leq |r| < 1.00$ : Pearson,  $0.8 \leq |r| < 1.00$ : Spearman), szoros ( $0.4 \leq |r| < 0.7$ : Pearson,  $0.6 \leq |r| < 0.8$ : Spearman), közepes ( $0.3 \leq |r| < 0.4$ : Pearson,  $0.4 \leq |r| < 0.6$ : Spearman), gyenge ( $0.2 \leq |r| < 0.3$ : Pearson,  $0.2 \leq |r| < 0.4$ : Spearman), illetve elhanyagolható ( $0 \leq |r| < 0.2$ : Pearson,  $0 \leq |r| < 0.2$ : Spearman) korrelációkat állapítottunk meg. Klaszteranalízis céljából a Cluster 3.0 szoftvert, az ábrák tervezéséhez a Java Treeview és a GraphPad Prism 5.00 szoftvereket alkalmaztuk. Az egyes betegcsoportok összehasonlítása esetén az ábrákon feltüntettük a medián értéket és az interkvartilis terjedelmet.

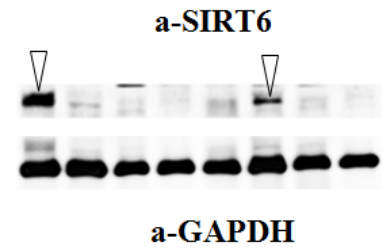
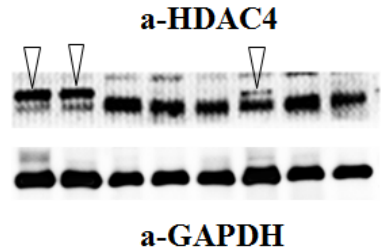
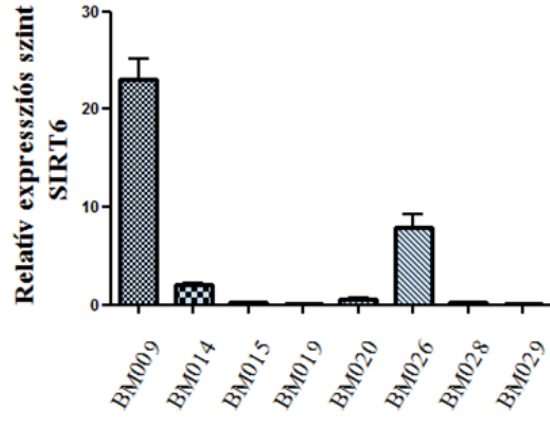
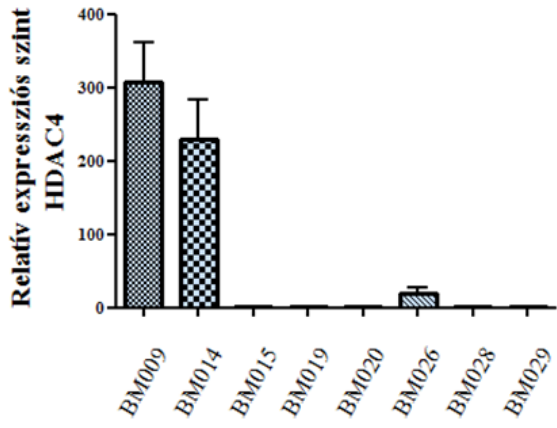
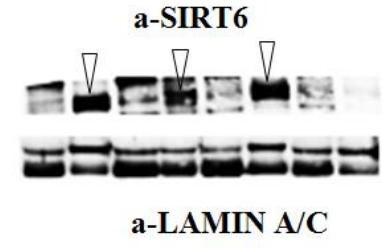
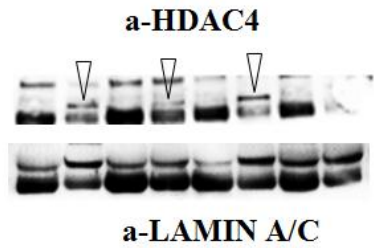
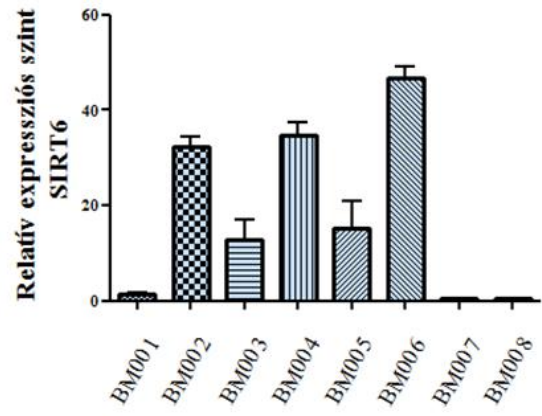
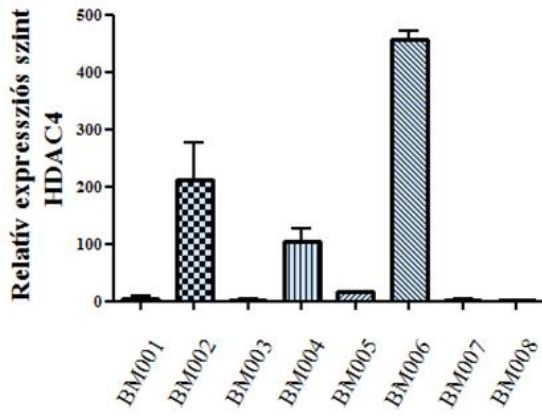
## 8. Eredmények

Munkánk során hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegek diagnózis idején levett csontvelő mintáiban határoztuk meg a 7. táblázatban feltüntetett vizsgálati panelben szereplő mikro-RNS-ek, továbbá hiszton deacetiláz enzimek mRNS- és fehérjeszintű expressziós szintjét Western blot analízis és RT-qPCR segítségével. Vizsgáltuk, hogy az expressziós szintek milyen összefüggést mutatnak egymással, illetve a diagnózis idején meghatározott klinikai adatokkal, citogenetikai- és molekuláris genetikai eltérésekkel. Két esetben az expressziós szintek kezelés megkezdését követő változását is tanulmányoztuk.

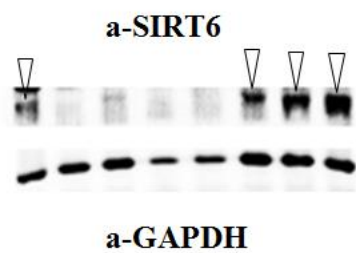
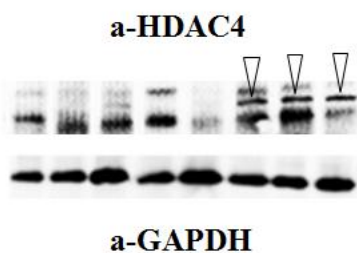
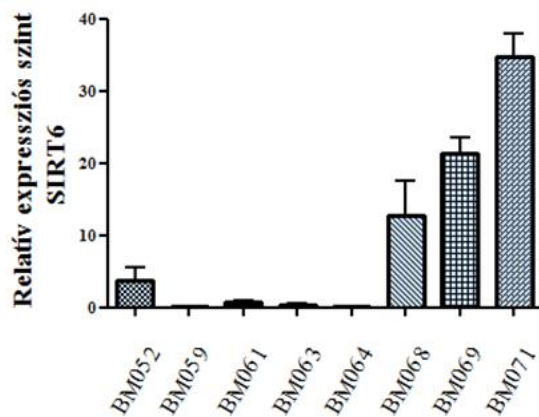
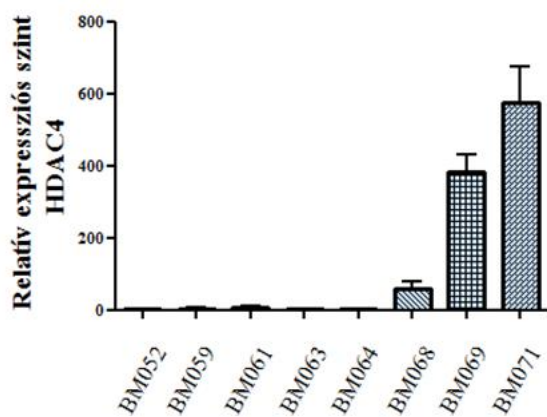
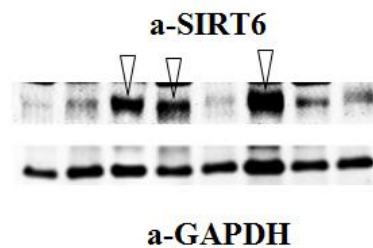
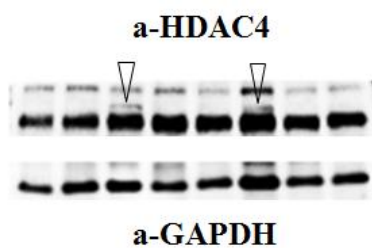
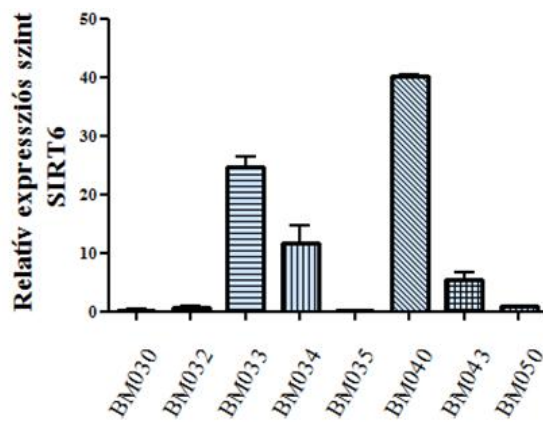
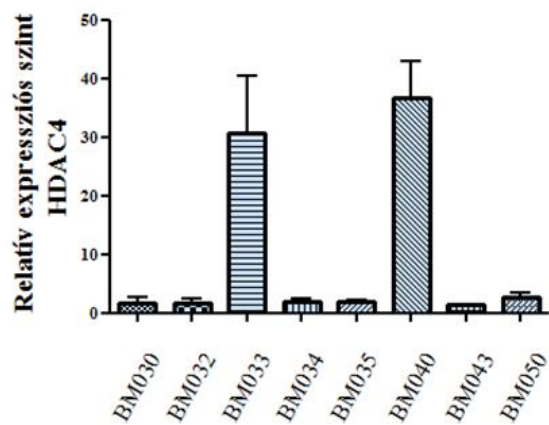
### 8.1 Hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintjének vizsgálata hematológiai malignus betegségekben

A vizsgált hiszton deacetiláz enzimek belső kontrollra normalizált, relatív expressziós szintjét egy adott beteg csontvelő mintájában relatíve magasnak vagy alacsonynak tekintettük annak függvényében, hogy a teljes vizsgálati anyagban (n=45) meghatározott medián expressziós szintnél magasabbnak vagy alacsonyabbnak bizonyult. Adott betegcsoport esetén a csoport medián expressziós szintjét viszonyítottuk a teljes vizsgálati anyag medián expressziós szintjéhez.

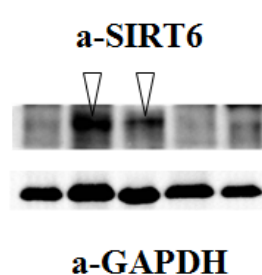
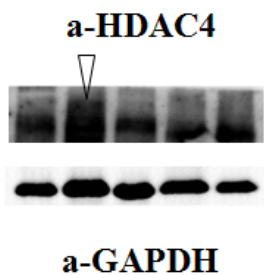
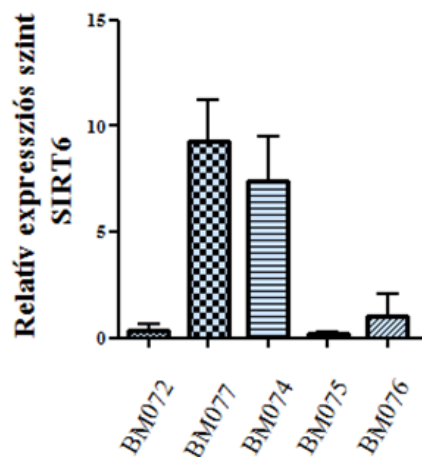
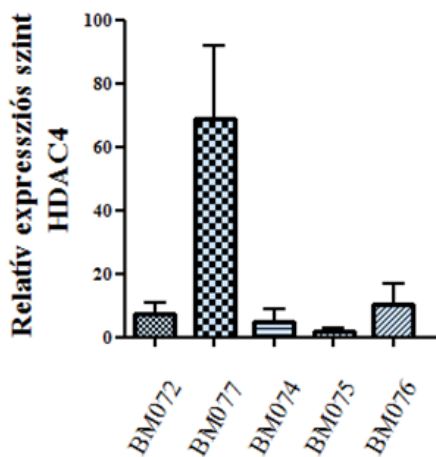
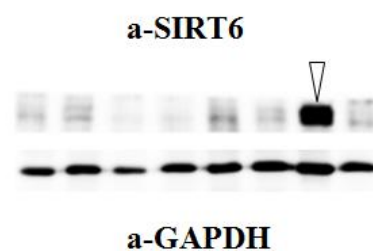
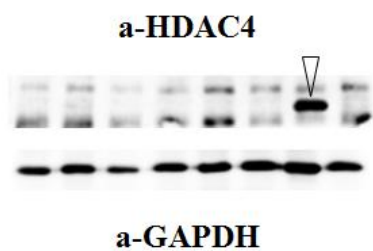
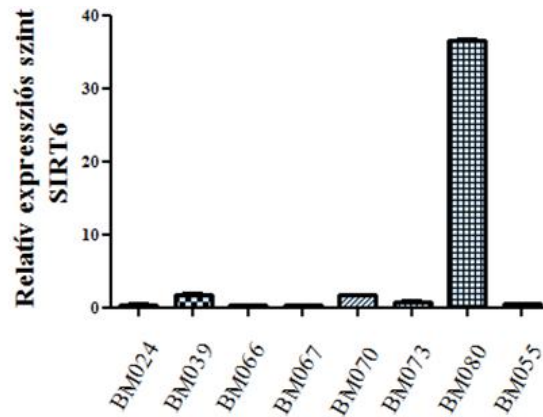
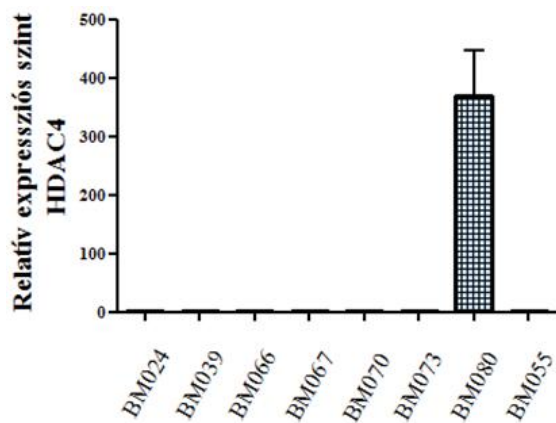
Mindkét vizsgált hiszton deacetiláz enzim esetén heterogén fehérjeszintű expressziós szinteket észleltünk (5. ábra). Az alábbiakban az eredményeket a diagnózist, illetve a társuló citogenetikai és molekuláris genetikai eltéréseket figyelembe véve tekintjük át.



5. ábra: Heterogén HDAC4 és SIRT6 expressziós szintek hematológiai malignus betegségekben



5. ábra (folytatás): Heterogén HDAC4 és SIRT6 expressziós szintek hematológiai malignus betegségekben



5. ábra (folytatás): Heterogén HDAC4 és SIRT6 expressziós szintek hematológiai malignus betegségekben

### 8.1.1 A HDAC4 enzim fehérjeszintű expressziós szintjének vizsgálata hematológiai malignus betegségekben

FAB M0 altípusú AML (n=3) esetén relatíve alacsony, míg FAB M1 altípusú AML (n=1) esetén relatíve magas HDAC4 szintet észleltünk. A három FAB M0 altípusú AML-ben szenvedő beteg közül ketten FLT3-TKD mutációt hordoztak (BM001, BM007), azonban a mutációs státusz és a HDAC4 fehérje expressziós szintje között nem találtunk összefüggést. A FAB M2 altípusú AML-es betegek csoportjában (n=7, relatíve alacsony HDAC4 expressziós szint) három betegnél igazolódott NPM1 mutáció (BM019, BM033, BM068), közülük egy beteg FLT3-ITD mutációt (BM068), egy másik pedig FLT3-TKD mutációt is hordozott (BM019). Közülük az FLT3-TKD mutációt hordozó betegnél a HDAC4 szintje relatíve alacsonynak, míg az FLT3-ITD mutáció esetén relatíve magasnak bizonyult. A FAB M3 altípusú AML-ben szenvedő, a t(15;17) transzlokáció mellett FLT3-ITD és FLT3-TKD mutációt egyaránt hordozó beteg mintájában (n=1, BM061) relatíve magas HDAC4 expressziós szintet kaptunk. A FAB M4 altípusú AML-es csoportba tartozó betegeknél (n=9, relatíve magas HDAC4 expressziós szint) változatos citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések igazolódtak. Ebben a csoportban a komplex kariotípus (BM008), a 18p deléció (BM069), a 8-as kromoszóma triszómiája (BM072) és a 16-os kromoszóma inverziója (BM076) közül a legmagasabb HDAC4 szintet a 18p deléciót hordozó beteg mintájában detektáltuk. A FAB M4 altípusú AML-es csoportba tartozó két, NPM1 és FLT3-ITD mutációt egyaránt hordozó beteg közül (BM077, BM075) MDS-ből transzformálódott AML esetén (BM077) relatíve magas, míg megelőző MDS hiányában (BM075) relatíve alacsony HDAC4 szintet mértünk. A FAB M4 altípusú AML-es betegek csoportjának egészét tekintve a legmagasabb HDAC4 szintet a normál kariotípus mellett FLT3-ITD mutációt hordozó beteg (BM071) esetén észleltük. Valamennyi FAB altípus közül a FAB M5 altípusú AML-es betegek csoportjában (n=5) bizonyult legmagasabbnak a HDAC4 fehérje medián expressziós szintje. Ezen csoportban magasabb HDAC4 szintet észleltünk a 8-as kromoszóma triszómiája esetén (BM006), mint a 6q deléciójakor (BM002), továbbá a HDAC4 fehérje szintje szintén magasabbnak bizonyult egyidejű FLT3-ITD és NPM1 mutáció esetén (BM040), mint az NPM1 mutáció önálló hordozásakor (BM026). A FAB M6 altípusú AML-ben szenvedő beteg (n=1, BM073) mintájában relatíve alacsony HDAC4 expressziós szintet mértünk.

Az ALL-es felnőtt betegek közül (n=2, relatíve magas medián HDAC4 expressziós szint) a Philadelphia kromoszómát hordozó beteg esetén (BM080) extrém magas HDAC4 szintet detektáltunk. Az MDS-ben szenvedő betegek csoportjában (n=4) a HDAC4 fehérje medián

expressziós szintje relatíve alacsonynak bizonyult. Közülük ketten hordoztak citogenetikai eltéréseket, melyek közül magasabb HDAC4 szintet láttunk t(16;16) transzlokáció (BM052) esetén, mint a 9-es kromoszóma inverziójakor (BM015). MPAL (n=1, BM029), valamint csontvelői infiltrációval társuló Hodgkin lymphoma esetén (n=1, BM034) egyaránt relatíve alacsony volt a HDAC4 fehérje expressziós szintje, míg hajás sejtes leukémiában (n=1, BM059) relatíve magas HDAC4 szintet észleltünk.

### **8.1.2 A SIRT6 enzim fehérjeszintű expressziós szintjének vizsgálata hematológiai malignus betegségekben**

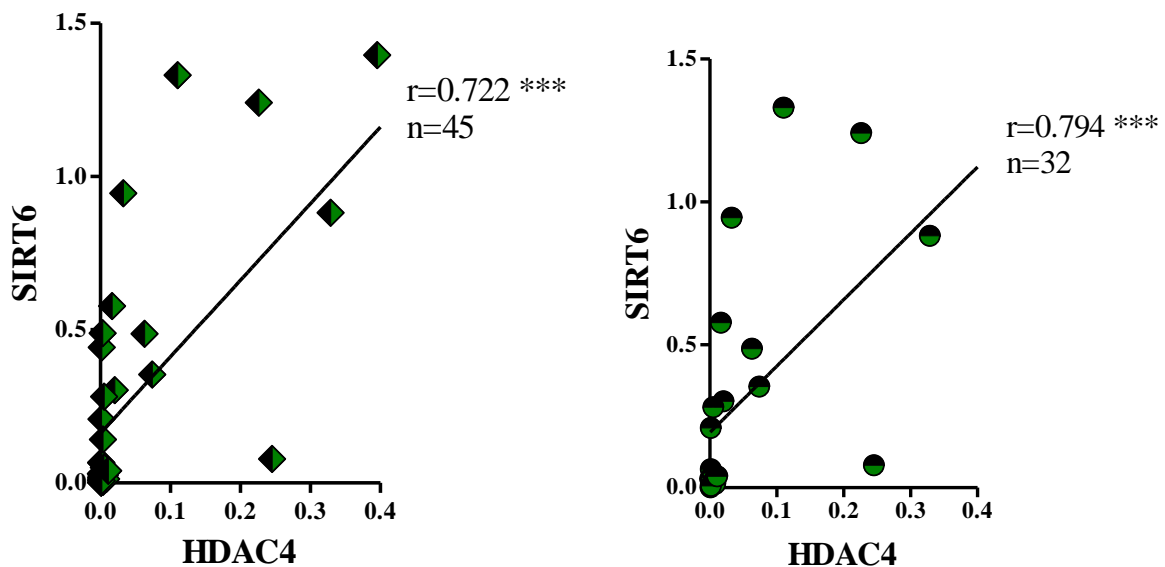
FAB M0 altípusú AML-ben (n=3) alacsony medián SIRT6 expressziós szintet detektáltunk. A csoportba tartozó két, FLT3-TKD mutációt hordozó beteg (BM001, BM007) közül citogenetikai eltérések hiányában (BM001) relatíve magas, míg 3p deléció, az 5-ös kromoszóma monoszómiája és egy marker kromoszóma egyidejű jelenléte (BM007) esetén relatíve alacsony SIRT6 szintet kaptunk. A FAB M1 altípusú AML-ben szenvedő beteg (n=1) mintájában a SIRT6 fehérje expressziós szintje relatíve magasnak bizonyult. A FAB M2 altípusú AML-es betegek csoportjában (n=7, relatíve magas SIRT6 expressziós szint) öt esetben állt fenn MDS-ből transzformálódott AML, melyek közül a legmagasabb SIRT6 szintet az NPM1 mutációt hordozó beteg (BM033) mintájában észleltük. A fennmaradó két, nem MDS-ből transzformálódott FAB M2 altípusú, kombinált molekuláris genetikai eltéréseket hordozó AML-es beteg közül a SIRT6 fehérje expressziós szintje magasabbnak bizonyult egyidejű NPM1 és FLT3-ITD mutáció esetén (BM068), mint NPM1 és FLT3-TKD mutáció társulásakor (BM019). A FAB M3 altípusú AML-ben szenvedő betegnél (n=1, BM061) relatíve alacsony SIRT6 szintet mértünk. A FAB M4 altípusú AML-es betegek (n=9, relatíve magas SIRT6 expressziós szint) csoportjában két esetben igazolódott kombinált NPM1 és FLT3-ITD mutáció (BM077, BM075). Közülük MDS-ből transzformálódott betegség esetén (BM077) relatíve magas, míg megelőző MDS hiányában kialakult AML-ben (BM075) relatíve alacsony SIRT6 szintet észleltünk. A fentebb részletezett négy, citogenetikai eltéréseket hordozó, FAB M4 altípusú AML-ben szenvedő beteg (BM008, BM069, BM072, BM076) közül a SIRT6 szintje 18p deléció esetén (BM069) volt a legmagasabb. A HDAC4 fehérjéhez hasonlóan a SIRT6 medián expressziós szintje is FAB M5 altípusú AML-ben (n=5) adódott a legmagasabbnak. Ebben a csoportban egyetlen esetben, az MDS-ből transzformálódott AML-ben szenvedő beteg (BM028) mintájában észleltünk relatíve alacsony SIRT6 szintet. Szintén a FAB M5-ös altípusú AML-es csoportot tekintve, a 6q deléciójával (BM002) összehasonlítva magasabb SIRT6 szintet detektáltunk a

8-as kromoszóma triszómiája esetén (BM006), továbbá a SIRT6 szintje magasabbnak bizonyult NPM1 és FLT3-ITD mutáció társulása esetén (BM040), mint az NPM1 mutáció önálló hordozásakor (BM026). A FAB M6 altípusú AML-ben szenvedő beteg (n=1, BM073) mintájában relatíve alacsony SIRT6 expressziós szintet láttunk.

ALL-ben (n=2), illetve MDS-ben (n=4) egyaránt magas medián SIRT6 expressziós szintet észleltünk. A HDAC4 fehérjéhez hasonlóan a SIRT6 szintje is extrém magasnak bizonyult a Philadelphia kromoszómát hordozó ALL-es beteg mintájában (BM080). MDS esetén a t(16;16) transzlokáció (BM052) a 9-es kromoszóma inverziójához képest (BM015) magasabb SIRT6 expressziós szinttel társult. MPAL (n=1, BM029) és hajjas sejtes leukémia (n=1, BM059) esetén relatíve alacsony, míg csontvelői infiltrációval járó Hodgkin lymphomában (n=1, BM034) relatíve magas SIRT6 szintet detektáltunk.

## 8.2 Szoros korreláció a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintje között

A teljes vizsgálati anyagban (n=45), illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=32) egyaránt szoros korrelációt észleltünk a NAD<sup>+</sup>-független HDAC4 és a NAD<sup>+</sup>-függő SIRT6 hiszton deacetiláz enzim fehérjeszintű expressziós szintje között (Spearman-féle rangkorreláció, n=45 esetén  $r=0.722$ , illetve n=32 esetén  $r=0.794$ ) (6. ábra).



6. ábra: A HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintje között szoros korreláció áll fenn hematológiai malignus betegségekben (n=45) és azon belül akut mieloid leukémiában (n=32) (Spearman-féle rangkorreláció, \*\*\*:  $p < 0.001$ )

### 8.3 A HDAC4 és a SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintjének összehasonlítása hematológiai malignus betegségekben szenvedő betegek alcsoportjai között

Az AML különböző FAB altípusait összehasonlítva, mindkét vizsgált hiszton deacetiláz enzim medián expressziós szintje a FAB M5-ös altípusú AML-es betegek csoportjában bizonyult a legmagasabbnak. A HDAC4, illetve a SIRT6 fehérje egyes AML FAB altípusokban észlelt medián expressziós szintjének csökkenő sorrendje a következőképpen alakult (7. ábra):

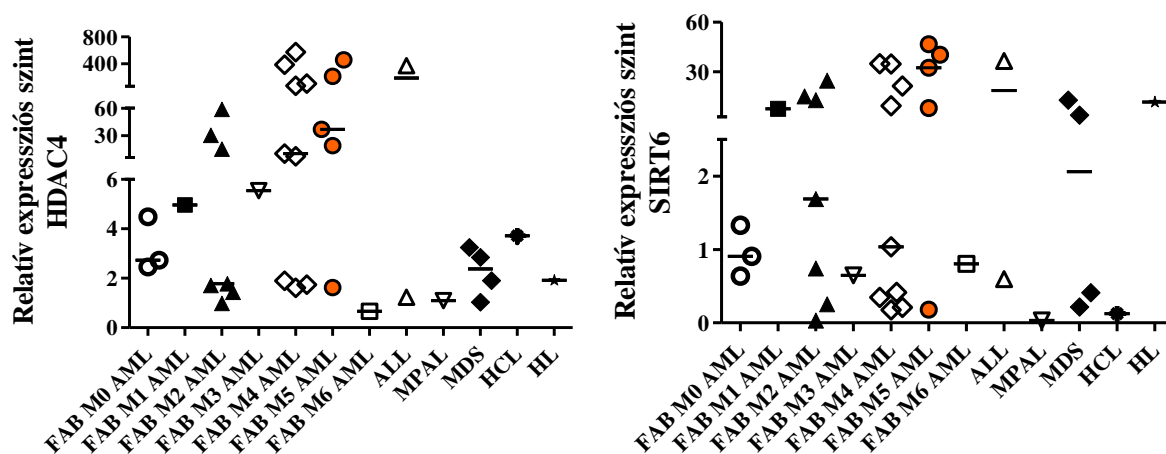
*HDAC4*: M5 > M4 > M3 > M1 > M0 > M2 > M6

*SIRT6*: M5 > M1 > M2 > M4 > M0 > M6 > M3.

Az AML-től különböző hematológiai malignus betegségek esetén az egyes betegcsoportokban észlelt medián expressziós szintek csökkenő sorrendje az alábbi volt (7. ábra):

*HDAC4*: ALL > HCL > MDS > HL > MPAL

*SIRT6*: ALL > HL > MDS > HCL > MPAL.



7. ábra: A HDAC4 és a SIRT6 fehérje medián expressziós szintje az AML egyes FAB altípusaiban, illetve az AML-től különböző hematológiai malignus betegségekben. Az ábrán narancssárga színnel tüntettük fel az AML azon FAB altípusának adatait, amelyiknél a legmagasabb medián expressziós szintet észleltük (FAB M0 AML n=3, FAB M1 AML n=1, FAB M2 AML n=7, FAB M3 AML n=1, FAB M4 AML n=9, FAB M5 AML n=5, FAB M6 AML n=1, ALL n=2, MPAL n=1, MDS n=4, HCL n=1, HL n=1)

A jobb áttekinthetőség kedvéért az AML egyes FAB típusaiban észlelt medián HDAC4, illetve SIRT6 expressziós szinteket a 11. és a 12. táblázatban a teljes vizsgálati anyag medián expressziós szintjéhez viszonyított egységekben (fold change) is feltüntettük.

	HDAC4
M0	0,959014
M1	1,742999
M2	0,626492
M3	1,948305
M4	3,658936
M5	12,91795
M6	0,231635

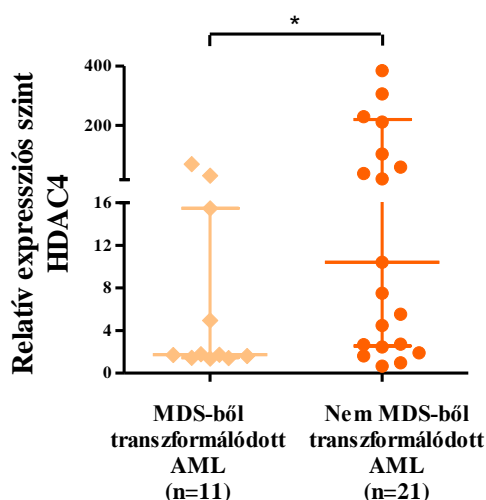
	SIRT6
M0	0,874213
M1	7,1122
M2	1,63067
M3	0,623889
M4	1
M5	31,28815
M6	0,774872

**11. táblázat:** Az AML egyes FAB típusaiban észlelt medián HDAC4 szintek, a teljes vizsgálati anyag medián értékéhez viszonyítva (fold change)

**12. táblázat:** Az AML egyes FAB típusaiban észlelt medián SIRT6 szintek, a teljes vizsgálati anyag medián értékéhez viszonyítva (fold change)

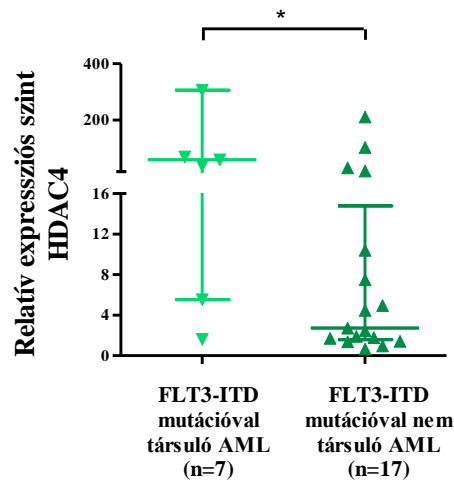
A HDAC4 hiszton deacetiláz enzim fehérjeszintű expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult nem MDS-ből transzformálódott AML esetén (n=21), mint MDS-ből transzformálódott betegségben (n=11) (Mann-Whitney teszt,  $p < 0.05$ ) (8. ábra). A HDAC4 fehérjével szemben a SIRT6 medián expressziós szintje az MDS-ből transzformálódott AML-es betegek csoportjában adódott magasabbnak, de ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns (nem bemutatott eredmény).

Szintén nem bizonyult statisztikailag szignifikánsnak azon két megfigyelésünk sem, melyek szerint mindkét hiszton deacetiláz enzim medián expressziós szintje magasabb az NPM1 mutációt hordozó AML-es betegek csoportjában (n=9), mint NPM1 mutációval nem társuló AML esetén (n=15), továbbá mindkét fehérje medián expressziós szintje alacsonyabb FLT3-TKD mutációval társuló AML-ben (n=4), mint az FLT3-TKD mutációt nem hordozó AML-es betegek csoportjában (n=19) (nem bemutatott eredmények).



**8. ábra:** A HDAC4 fehérje expressziós szintje szignifikánsan magasabb nem MDS-ből transzformálódott AML (n=21), mint MDS-ből transzformálódott betegség (n=11) esetén (Mann-Whitney teszt,  $*, p < 0.05$ )

A HDAC4 és a SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintje egyaránt magasabb volt FLT3-ITD mutációval társuló AML-ben (n=7), mint az FLT3-ITD mutáció hiányában (n=17). Ezen különbség a HDAC4 esetén statisztikailag szignifikánsnak bizonyult (Mann-Whitney teszt,  $p < 0.05$ ) (9. ábra).



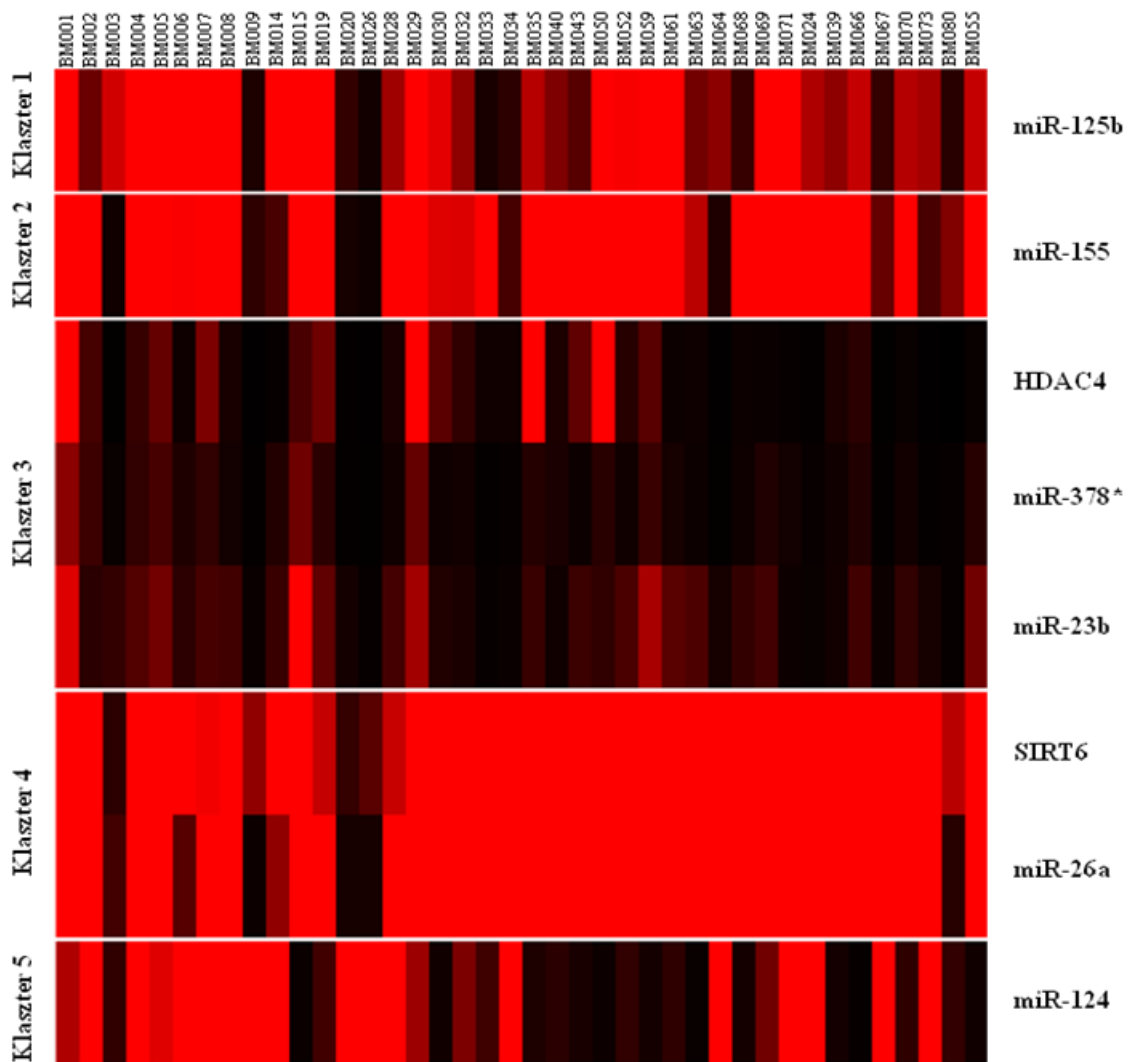
**9. ábra:** A HDAC4 fehérje expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult FLT3-ITD mutációval társuló AML (n=7) esetén, mint az FLT3-ITD mutáció hiányában (n=17) (Mann-Whitney teszt,  $*:p < 0.05$ )

#### 8.4 Mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintje közötti korrelációk vizsgálata

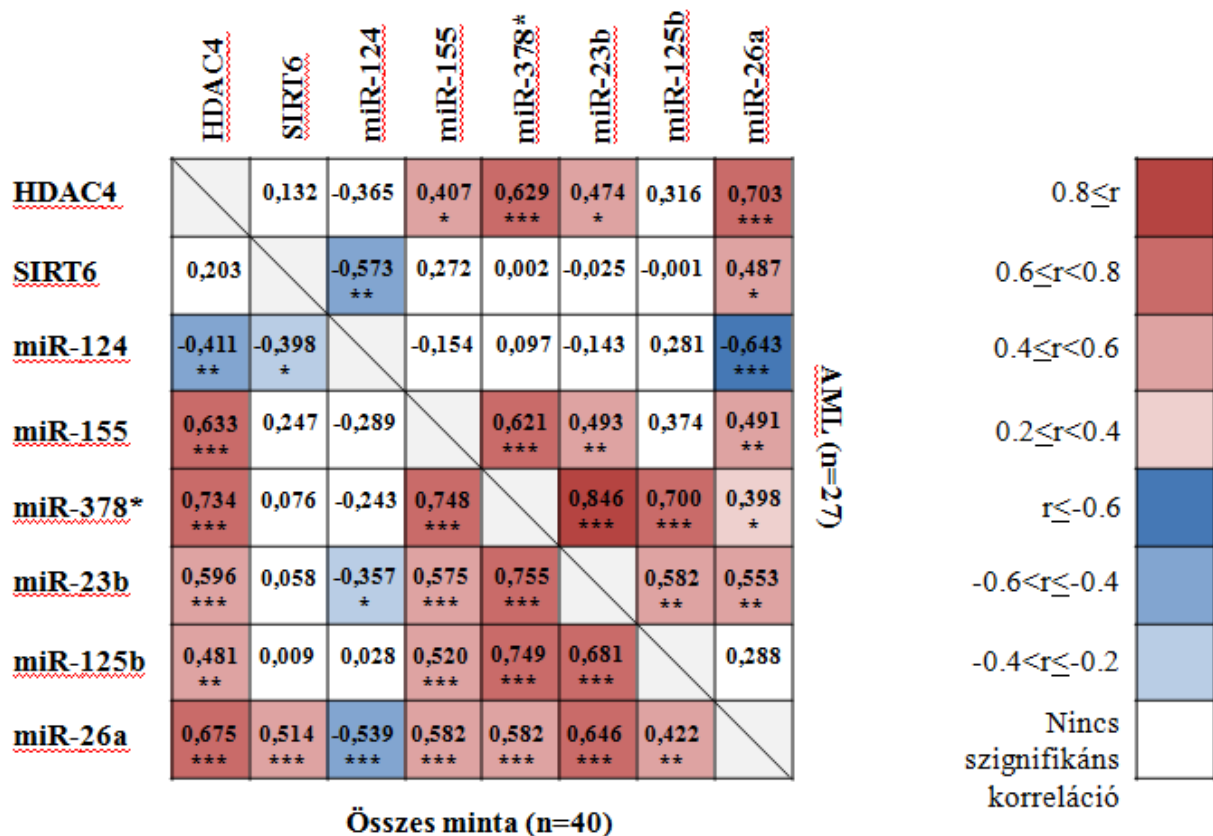
A miR-124, miR-155, miR-125b, miR-378\*, miR-23b, miR-26a, valamint a HDAC4 és SIRT6 mRNS-szintű relatív expressziós szintjének meghatározását RT-qPCR segítségével végeztük el. Referenciagénként az U6 spliceosomalis RNS-t alkalmaztuk. A vizsgálatok összesen 40 csontvelő mintán történtek, melyek közül 38 újonnan diagnosztizált hematológiai malignus betegségben szenvedő felnőtt betegtől származott, ebből 27 újonnan diagnosztizált AML-es betegtől. 2 további minta levétele a diagnózis megállapítását követően 4 héttel történt. Az 8. táblázatban feltüntetett csontvelő minták közül RT-qPCR vizsgálat a BM072, BM077, BM074, BM075 és BM076-os kódú mintákon nem történt.

Az egyes mintákban meghatározott relatív expressziós szintek alapján a klaszteranalízis a vizsgált géneket 5 különböző klaszterbe sorolta (10. ábra). Az expressziós szintek között számos statisztikailag szignifikáns pozitív, illetve negatív korreláció igazolódott (11. ábra). A következő alfejezetekben szereplő ábrákon a korrelációs koefficiens értéke szerint megállapított nagyon szoros, szoros, illetve közepes erősségű korrelációkat tüntettük fel. Ettől csak a diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszám és a vizsgált gének expressziós szintje

közötti gyenge korrelációk ábrázolásakor tértünk el. Lineáris regressziót  $0.6 \leq |r|$  esetén végeztünk, mely esetekben a regressziós egyenest az ábrákon feltüntettük.



10. ábra: A klaszteranalízis a vizsgált géneket 5 különböző klaszterbe sorolta

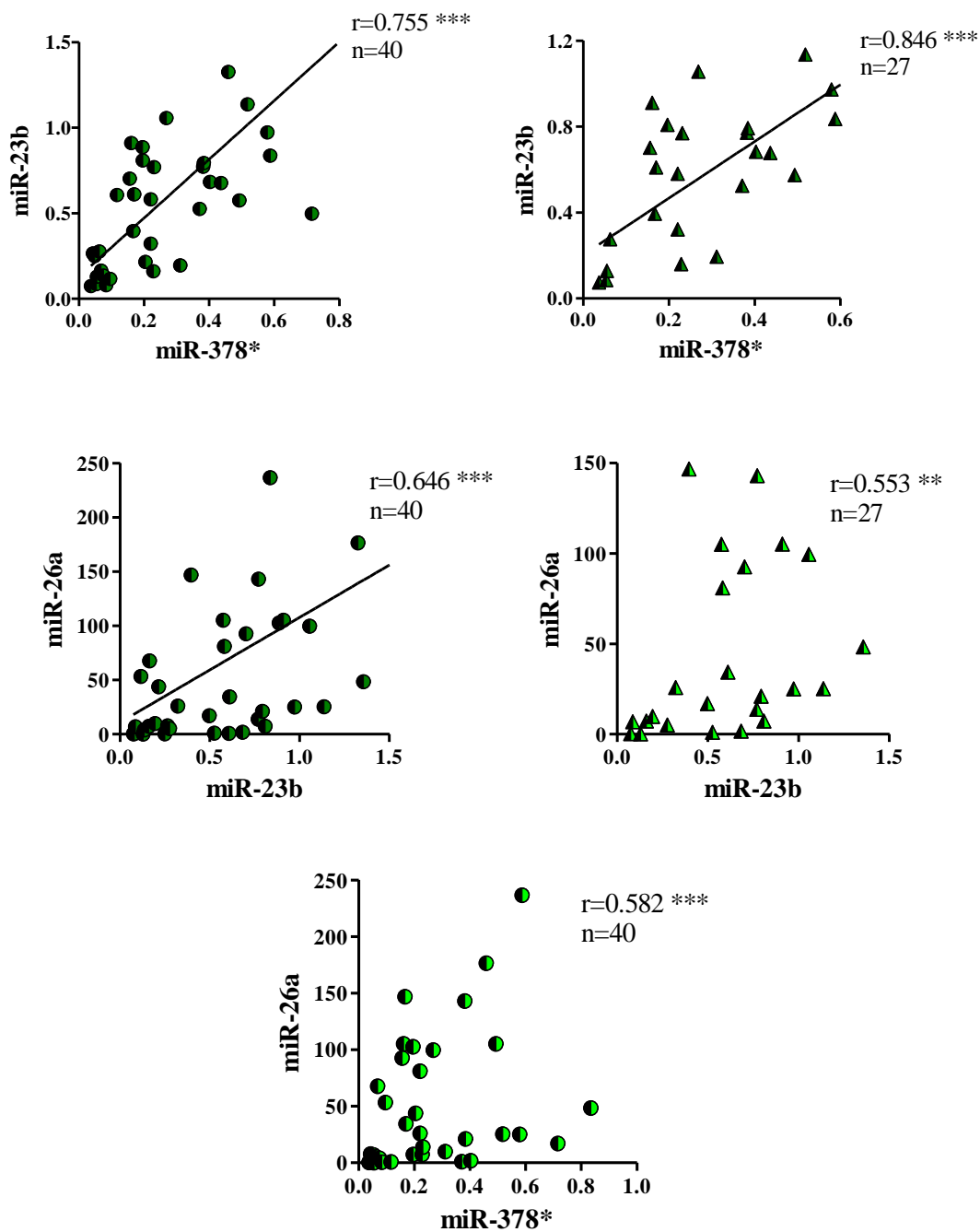


**11. ábra:** A vizsgált gének expressziós szintje között számos statisztikailag szignifikáns összefüggés igazolódott (minden esetben Spearman-féle rangkorreláció, kivéve a miR-378\* és miR-23b szintje közti korreláció esetén az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában, ahol Pearson korrelációt alkalmaztunk)

#### 8.4.1 Mikro-RNS-ek expressziós szintje közötti korrelációk

A vizsgált három, szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS (miR-378\*, miR-23b, miR-26a) relatív expressziós szintje között a teljes vizsgálati anyagban (n=40), illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában egyaránt statisztikailag szignifikáns pozitív korreláció igazolódott (12. ábra). Közülük a miR-378\* és miR-23b szintje közötti összefüggés bizonyult a legszorosabbnak (r=0.755 n=40 esetén, r=0.846 n=27 esetén). A második legerősebb összefüggést a miR-23b és miR-26a szintje között észleltük (r=0.646 n=40 esetén, r=0.553 n=27 esetén), melyet a miR-378\* és miR-26a expressziós szintje közötti korreláció erőssége követett (r=0.582 n=40 esetén, r=0.398 n=27 esetén).

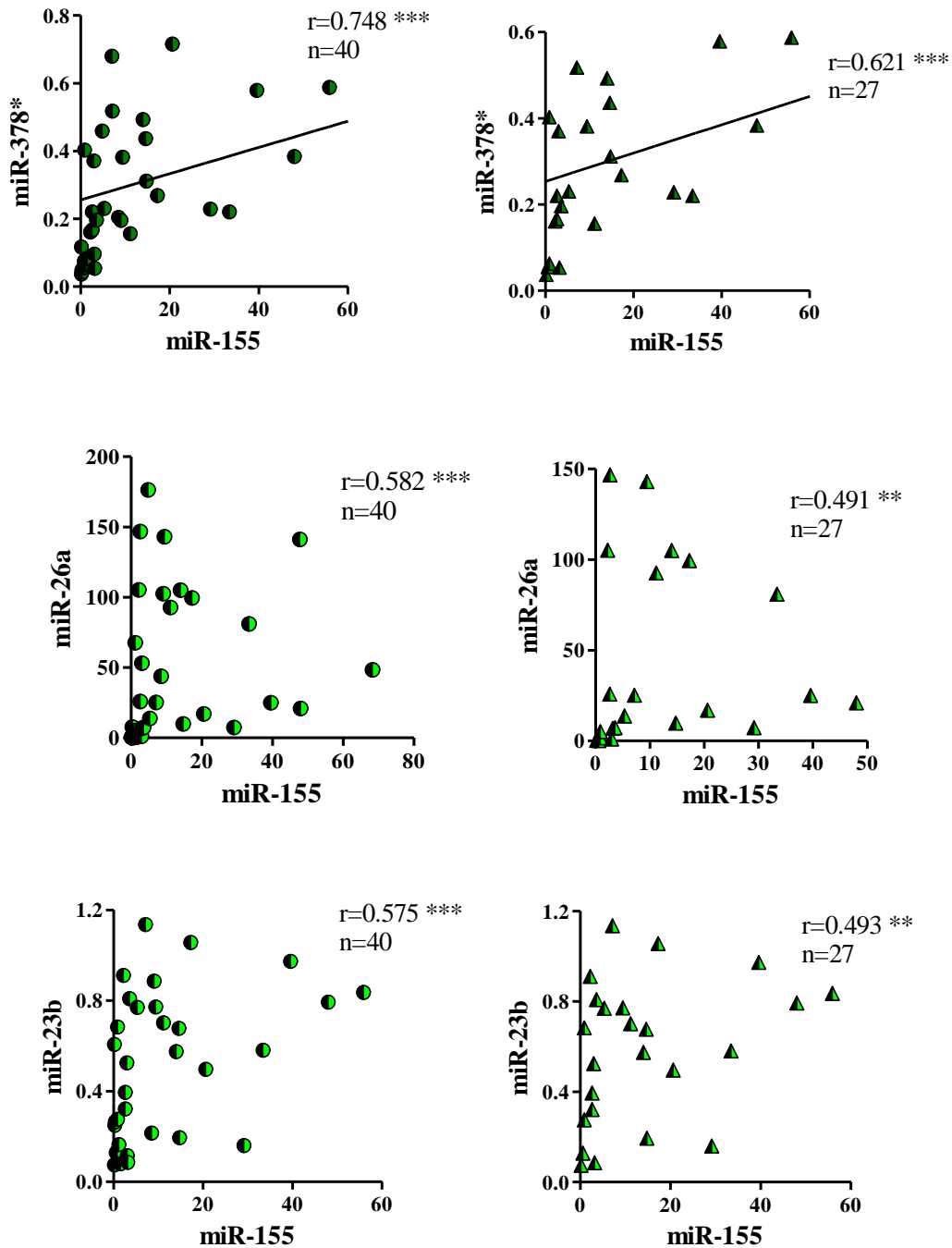
Az ismert onkogén miR-155 és tumorszuppresszor miR-124, valamint a fenti három mikro-RNS (miR-378\*, miR-23b, miR-26a) expressziós szintje között szintén igazoltunk szignifikáns pozitív és negatív korrelációkat.



**12. ábra:** A miR-378\*, miR-23b és miR-26a szintje között a teljes vizsgálati anyagban ( $n=40$ ) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ( $n=27$ ) egyaránt statisztikailag szignifikáns pozitív korrelációt észleltünk (Spearman-féle rangkorreláció, kivétel a miR-378\* és miR-23b szintje között  $n=27$  esetén (Pearson-féle korreláció) \*\*:  $p < 0.01$  \*\*\*:  $p < 0.001$ )

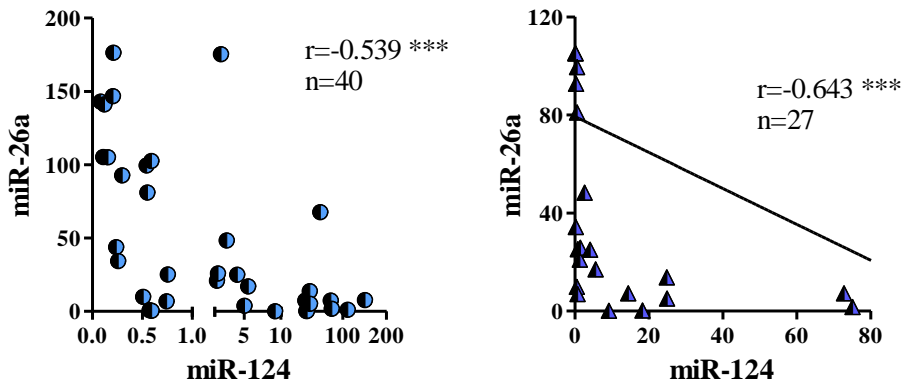
A miR-155 a vizsgált három, szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS közül legerősebb pozitív korrelációt a miR-378\* szintjével mutatott ( $r=0.748$   $n=40$  esetén,  $r=0.621$   $n=27$  esetén), melyet a teljes vizsgálati anyagban a miR-155 és miR-26a szintje közötti pozitív korreláció erőssége ( $r=0.582$   $n=40$  esetén), míg az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában a miR-155 miR-23b-vel mutatott

korrelációjának erőssége követett ( $r=0.493$   $n=27$  esetén) (13. ábra). Az észlelt pozitív korreláció a teljes vizsgálati anyagban a miR-155 és miR-23b expressziós szintje között ( $r=0.575$   $n=40$  esetén), míg az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában a miR-155 és miR-26a szintje között bizonyult a leggyengébbnek ( $r=0.491$   $n=27$  esetén).



**13. ábra:** Az onkogén tulajdonságú miR-155 expressziós szintje mind a teljes vizsgálati anyagban ( $n=40$ ), mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ( $n=27$ ) statisztikailag szignifikáns pozitív korrelációt mutatott mindhárom vizsgált, szolid tumorokban Warburg efféktussal összefüggésbe hozott mikro-RNS szintjével (Spearman-féle rangkorreláció, \*\*: $p<0.01$  \*\*\*: $p<0.001$ )

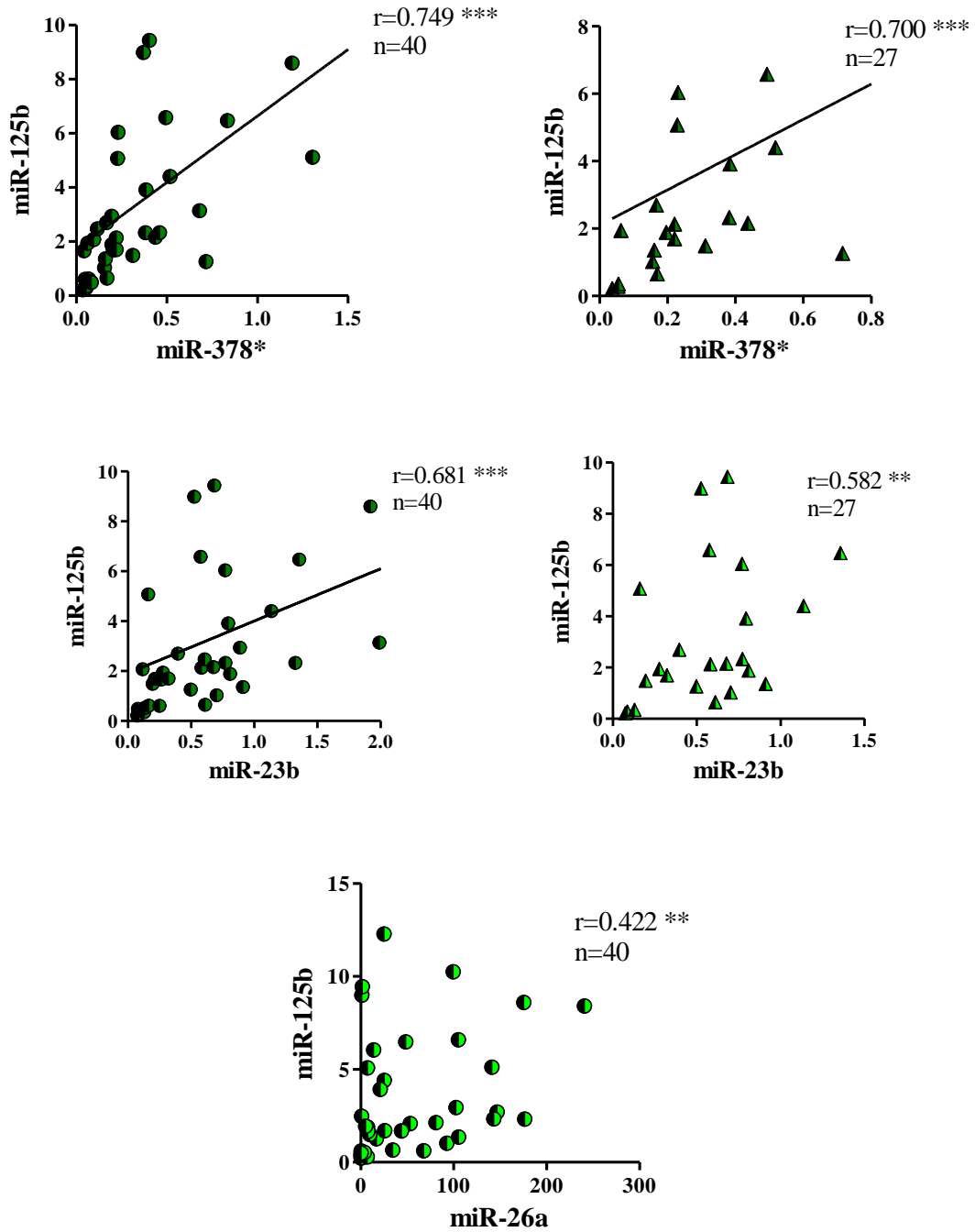
A tumorszuppresszor miR-124 expressziós szintje statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt mutatott a teljes vizsgálati anyagban a miR-26a ( $r=-0.539$   $n=40$  esetén), valamint a miR-23b ( $r=-0.357$   $n=40$  esetén), míg az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában a miR-26a expressziós szintjével ( $r=-0.643$   $n=27$  esetén) (14. ábra).



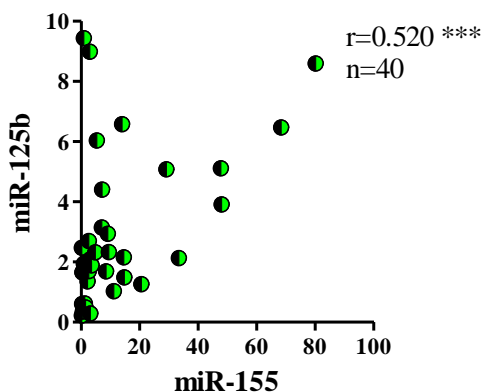
**14. ábra:** Statisztikailag szignifikáns negatív korreláció a tumorszuppresszor miR-124 és a szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott miR-26a szintje között a teljes vizsgálati anyagban ( $n=40$ ), illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ( $n=27$ ) (Spearman-féle rangkorreláció,  $***:p<0.001$ )

A mieloid sejtek differenciációjának szabályozásában fontos szerepet játszó miR-125b expressziós szintje a Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS-ek közül szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a teljes vizsgálati anyagban ( $n=40$ ) a miR-378\* ( $r=0.749$ ), a miR-23b ( $r=0.681$ ) és a miR-26a ( $r=0.422$ ) szintjével egyaránt, míg az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ( $n=27$ ) a miR-125b, valamint a miR-378\* ( $r=0.700$ ) és a miR-23b ( $r=0.582$ ) szintje között igazolódott hasonló összefüggés (15. ábra).

A teljes vizsgálati anyagban emellett kimutattuk, hogy a miR-125b és az onkogén miR-155 expressziós szintje között szintén szignifikáns pozitív korreláció áll fenn ( $r=0.520$   $n=40$  esetén) (16. ábra).



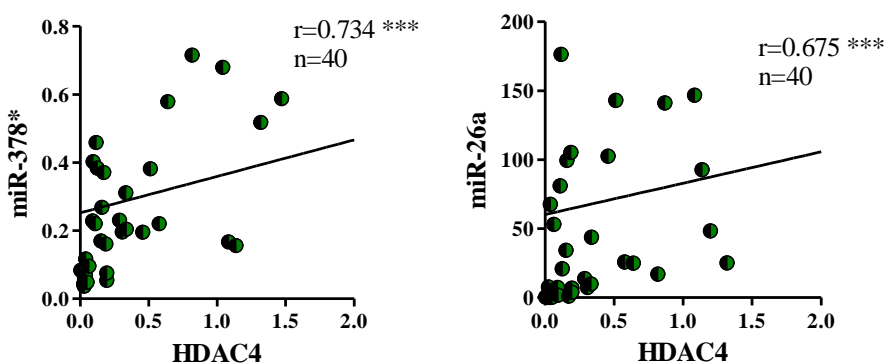
**15. ábra:** A mieloid irányú differenciáció szabályozásában fontos szerepet játszó miR-125b expressziós szintje a teljes vizsgálati anyagban (n=40) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) egyaránt statisztikailag szignifikáns pozitív korrelációt mutatott a vizsgált Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS-ek szintjével (Spearman-féle rangkorreláció, \*\*:p<0.01 \*\*\*:p<0.001)



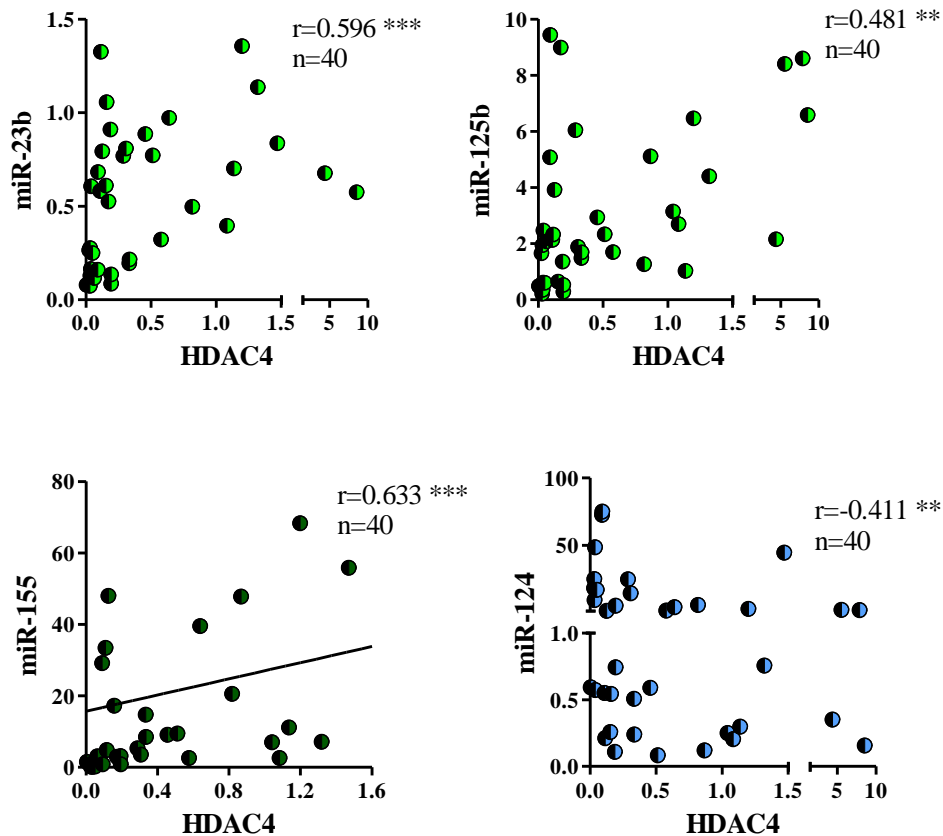
**16. ábra:** Statistkailag szignifikáns pozitív korreláció a miR-125b és az onkogén miR-155 expressziós szintje között a teljes vizsgálati anyagban (n=40) (Spearman-féle rangkorreláció, \*\*\*:p<0.001)

#### 8.4.2 A HDAC4 és mikro-RNS-ek expressziós szintje közötti korrelációk

A teljes vizsgálati anyagban (n=40) a HDAC4 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje a vizsgált mikro-RNS-ek mindegyikének szintjével statisztikailag szignifikáns korrelációt mutatott (17. ábra). A Warburg effektussal összefüggésbe hozott mindhárom vizsgált mikro-RNS szintje pozitívan korrelált a HDAC4 szintjével. Az összefüggés erősségének csökkenő sorrendje az alábbi volt: miR-378\* (r=0.734) > miR-26a (r=0.675) > miR-23b (r=0.596). Pozitív korreláció igazolódott továbbá a HDAC4 és a hemopoézis szabályozásában fontos szerepet betöltő miR-125b (r=0.481), valamint a HDAC4 és az onkogén miR-155 (r=0.633) szintje között, míg a HDAC4 szintje a tumorszuppresszor miR-124 expressziós szintjével negatívan korrelált (r=-0.411).

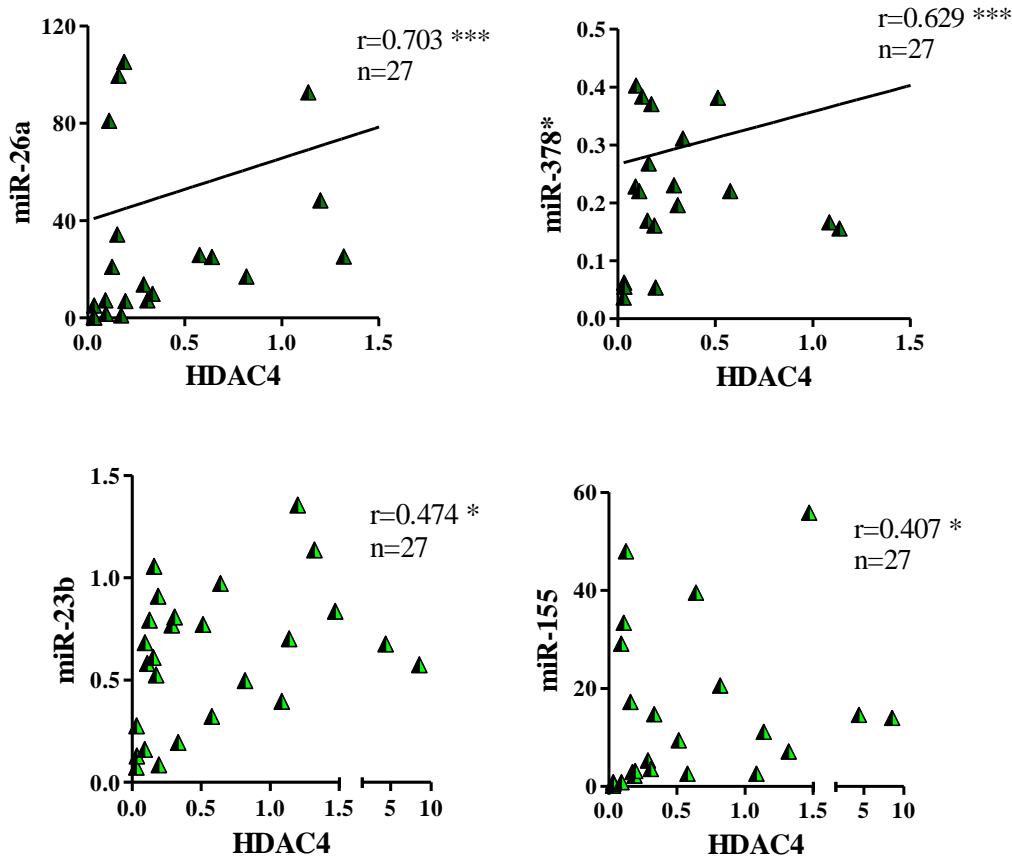


**17. ábra:** A HDAC4 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje a miR-378\*, miR-23b, miR-26a, miR-125b és miR-155 szintjével pozitívan, míg a miR-124 szintjével negatívan korrelált a teljes vizsgálati anyagban (n=40) (Spearman-féle rangkorreláció, \*\*:p<0.01 \*\*\*:p<0.001)



**17. ábra, folytatás:** A HDAC4 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje a miR-378\*, miR-23b, miR-26a, miR-125b és miR-155 szintjével pozitívan, míg a miR-124 szintjével negatívan korrelált a teljes vizsgálati anyagban (n=40) (Spearman-féle rangkorreláció, \*\*:p<0.01 \*\*\*:p<0.001)

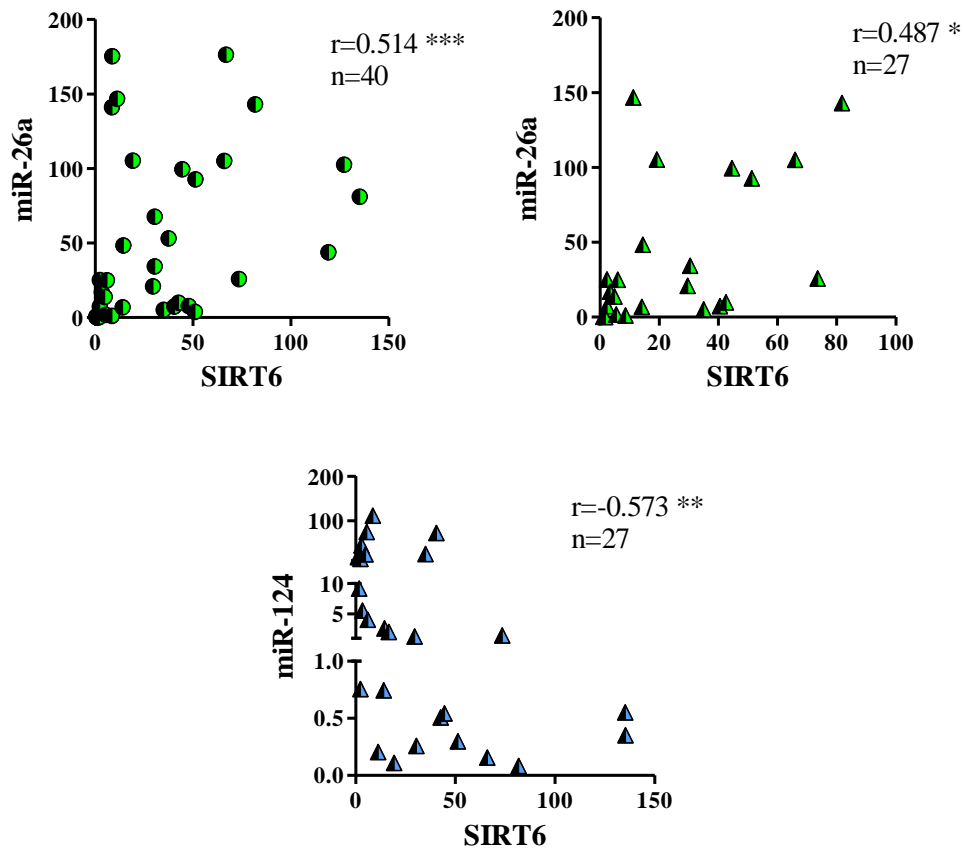
Az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) szintén pozitív korrelációt észleltünk a HDAC4, illetve mindhárom Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS expressziós szintje között (18. ábra). Az összefüggés erősségének csökkenő sorrendje a következő volt: miR-26a (r=0.703) > miR-378\* (r=0.629) > miR-23b (r=0.474). Szintén pozitív korreláció igazolódott a HDAC4 és az onkogén miR-155 expressziós szintje között (r=0.407).



**18. ábra:** A HDAC4 hiszton deacetiláz enzim mRNA-szintű expressziós szintje a miR-378\*, miR-23b, miR-26a, valamint a miR-155 szintjével pozitívan korrelált az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) (Spearman-féle rangkorreláció, \*:p<0.05 \*\*\*:p<0.001)

#### 8.4.3 A SIRT6 és mikro-RNS-ek expressziós szintje közötti korrelációk

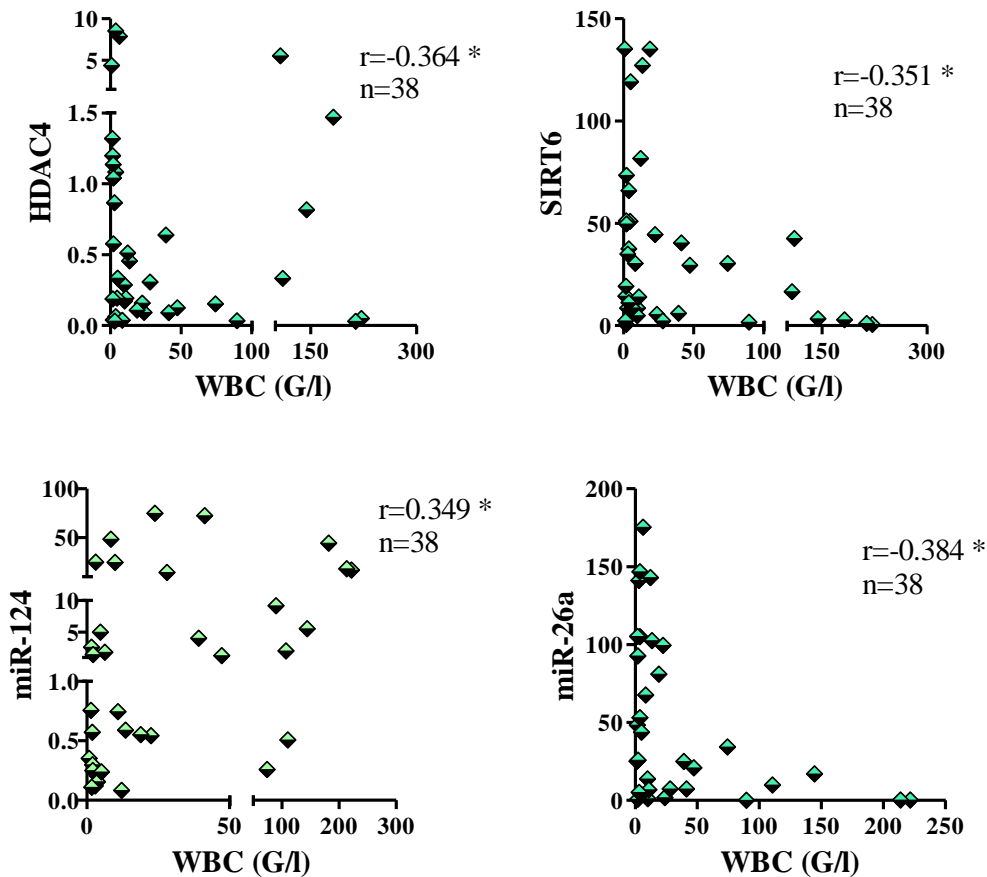
A SIRT6 hiszton deacetiláz enzim mRNA-szintű expressziós szintje mind a teljes vizsgálati anyagban (n=40), mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) pozitívan korrelált a Warburg effektussal összefüggésbe hozott miR-26a szintjével ( $r=0.514$  n=40 esetén,  $r=0.487$  n=27 esetén), míg a SIRT6 és a tumorszuppresszor miR-124 expressziós szintje között negatív korreláció igazolódott ( $r=-0.398$  n=40 esetén,  $r=-0.573$  n=27 esetén) (19. ábra).



**19. ábra:** A SIRT6 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje a miR-26a szintjével pozitívan, míg a miR-124 szintjével negatívan korrelált a teljes vizsgálati anyagban (n=40), illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) egyaránt (Spearman-féle rangkorreláció, \*:p<0.05 \*\*:p<0.01 \*\*\*:p<0.001)

## 8.5 Mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjének korrelációja a diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszámmal hematológiai malignus betegségekben

A 8. táblázatban szereplő, a hematológiai malignus betegségek diagnózisának időpontjában megállapított klinikai adatok közül a fehérvérsejtszám több általunk vizsgált gén expressziós szintjével is statisztikailag szignifikáns korrelációt mutatott (20. ábra). Mindkét hiszton deacetiláz enzim esetén negatív korreláció igazolódott (r=-0.364 a HDAC4 esetén, r=-0.351 a SIRT6 esetén), míg a vizsgált mikro-RNS-ek közül a fehérvérsejtszámmal a miR-124 szintje pozitívan (r=0.349), a miR-26a expressziós szintje pedig negatívan (r=-0.384) korrelált.



20. ábra: A hematológiai malignus betegségek diagnózisának időpontjában megállapított fehérvérsejtszám korrelációja hiszton deacetiláz enzimek, illetve mikro-RNS-ek expressziós szintjével ( $n=38$ , Spearman-féle rangkorreláció,  $*:p<0.05$ )

## 8.6 A vizsgált mikro-RNS-ek, valamint a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintjének összehasonlító elemzése hematológiai malignus betegségek esetén, és azon belül az akut mieloid leukémia egyes alcsoportjai között

A vizsgált mikro-RNS-ek, valamint a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintjét összevetettük egymással a teljes vizsgálati anyagban ( $n=40$ ) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában ( $n=27$ ) egyaránt, emellett összehasonlítottuk azokat mind a különböző hematológiai malignus betegségekben, mind az AML különböző alcsoportjaiban, melyeket FAB altípus, illetve molekuláris genetikai eltérések szerint különböztettünk meg. Az összehasonlító elemzés során számos statisztikailag szignifikáns különbség igazolódott (21. ábra).

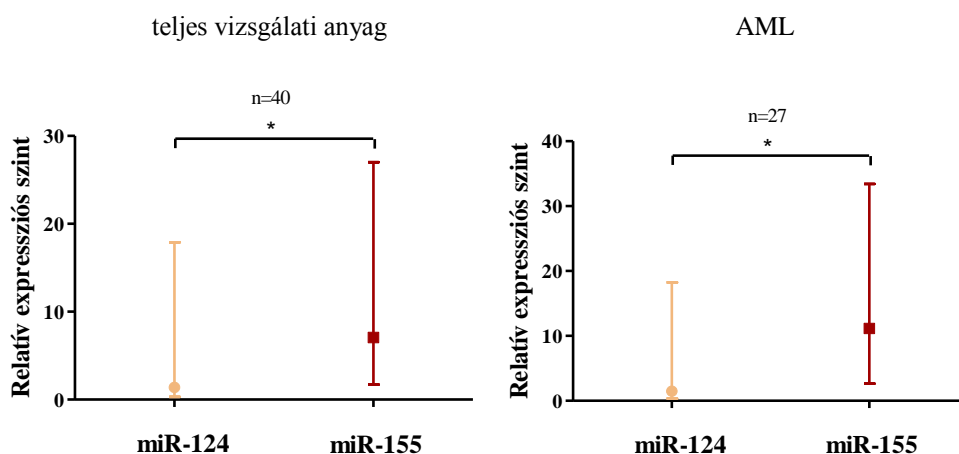
	HDAC4	SIRT6	miR-124	miR-155	miR-378*	miR-23b	miR-125b	miR-26a
HDAC4		***	***	***	-	-	***	***
SIRT6	***		***	*	***	***	***	-
miR-124	**	**		*	***	*	-	***
miR-155	***	-	*		***	***	**	**
miR-378*	-	***	***	***		**	***	***
miR-23b	-	***	*	***	**		***	***
miR-125b	***	***	-	**	***	***		***
miR-26a	***	-	***	-	***	***	***	

**AML (n=27)**

Összes minta (n=40)  
 - nincs szignifikáns különbség  
 \*: p<0.05  
 \*\*: p<0.01  
 \*\*\*: p<0.001

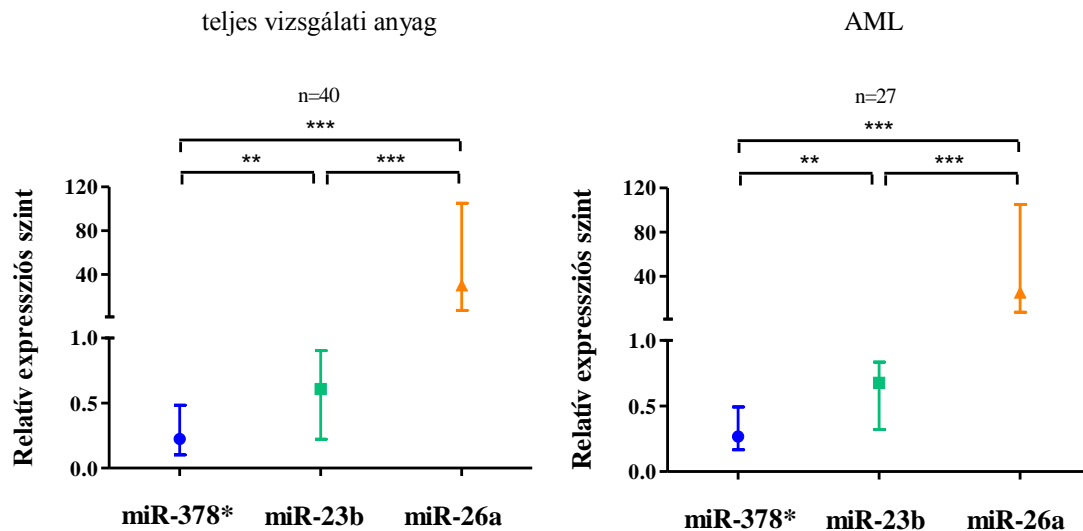
21. ábra: A vizsgált mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintjének összehasonlítása a teljes vizsgálati anyagban (n=40), illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) (Mann-Whitney teszt, \*:p<0.05 \*\*:p<0.01 \*\*\*:p<0.001)

Az onkogén miR-155 expressziós szintje a tumorszuppresszor miR-124 szintjénél szignifikánsan magasabbnak bizonyult a teljes vizsgálati anyagban (n=40), illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) egyaránt (22. ábra).



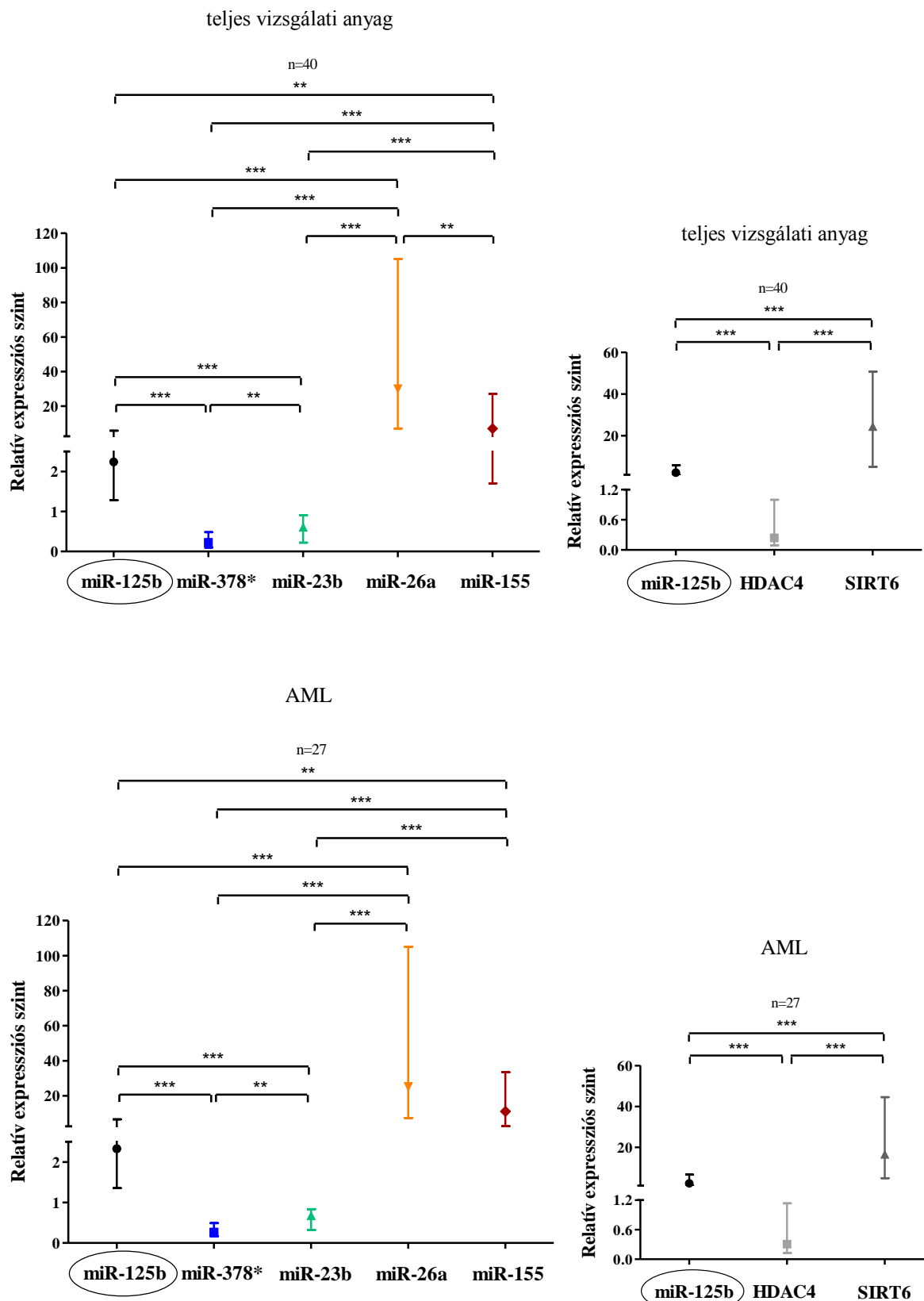
22. ábra: A miR-155 szintje a miR-124 expressziós szintjénél szignifikánsan magasabb volt a teljes vizsgálati anyagban (n=40) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) egyaránt (Mann-Whitney teszt, \*:p<0.05)

A vizsgált három, szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS (miR-378\*, miR-23b, miR-26a) közül mind a teljes vizsgálati anyagban (n=40), mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) a miR-26a expressziós szintje volt legmagasabb, melyet a miR-23b szintje követett (23. ábra).



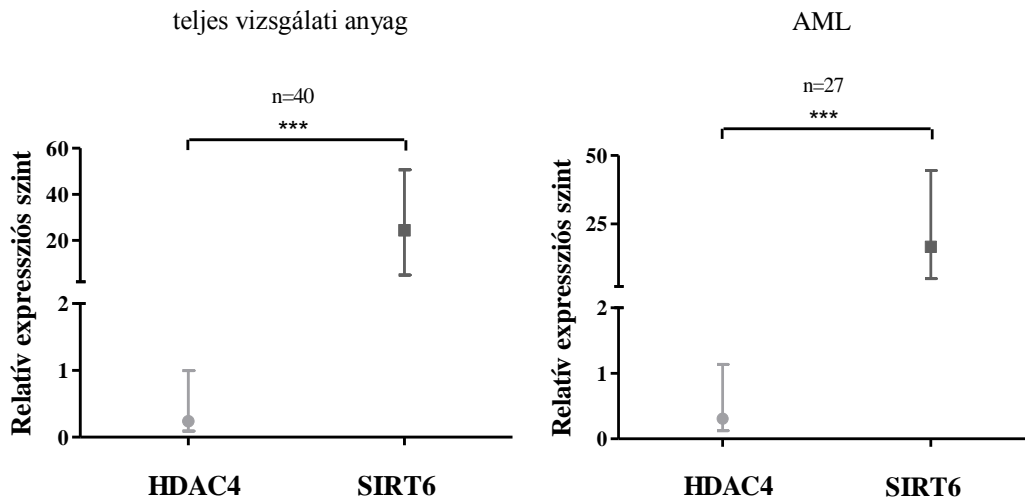
**23. ábra:** Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS-ek expressziós szintjének összehasonlítása a teljes vizsgálati anyagban (n=40) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) (Mann-Whitney teszt, \*\*:p<0.01 \*\*\*:p<0.001)

A hemopoetikus őssejtek mieloid irányú differenciációjának szabályozásában fontos szerepet betöltő miR-125b expressziós szintje a miR-378\* és miR-23b szintjénél magasabbnak, míg a miR-26a és a miR-155 szintjénél alacsonyabbnak bizonyult a teljes vizsgálati anyagban (n=40) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) egyaránt (24. ábra). A vizsgált két hiszton deacetiláz enzim közül a HDAC4 esetén a miR-125b-nél alacsonyabb, a SIRT6 esetén pedig a miR-125b-nél magasabb mRNS-szintű expressziós szintet észleltünk, mely megfigyelés szintén teljesült a teljes vizsgálati anyagban (n=40) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) egyaránt (24. ábra).



24. ábra: A miR-125b expressziós szintjének összehasonlítása a többi vizsgált mikro-RNS és hiszton deacetiláz enzim szintjével a teljes vizsgálati anyagban (n=40) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) (Mann-Whitney teszt, \*\*:p<0.01 \*\*\*:p<0.001)

A vizsgált két hiszton deacetiláz enzim közül a SIRT6 mRNS-szintű expressziós szintje mind a teljes vizsgálati anyagban (n=40), mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) a HDAC4 szintjénél szignifikánsan magasabbnak bizonyult (25. ábra).



25. ábra: A HDAC4 és a SIRT6 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintjének összehasonlítása a teljes vizsgálati anyagban (n=40) és az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában (n=27) (Mann-Whitney teszt, \*\*\*:p<0.001)

A vizsgált mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű medián expressziós szintjének csökkenő sorrendje a különböző AML FAB altípusokban a következőképpen alakult (26. ábra):

*miR-378\**: M0 > M4 > M5 > M3 > M2 > M6

*miR-23b*: M3 > M0 > M4 > M2 > M5 > M6

*miR-26a*: M0 > M3 > M2 > M4 > M5 > M6

*miR-124*: M6 > M5 > M4 > M0 > M2 > M3

*miR-155*: M0 > M4 > M3 > M2 > M5 > M6

*miR-125b*: M3 > M0 > M4 > M2 > M6 > M5

*HDAC4*: M0 > M2 > M5 > M4 > M3 > M6

*SIRT6*: M3 > M6 > M4 > M0 > M2 > M5.

Az AML-től különböző hematológiai malignus betegségek esetén az egyes betegcsoportokban észlelt medián expressziós szintek csökkenő sorrendje az alábbi volt (26. ábra):

*miR-378\**: MPAL > HCL > MDS > HL > ALL

*miR-23b*: HCL > MPAL > MDS > ALL > HL

*miR-26a*: HCL > MPAL > MDS > HL > ALL

*miR-124*: ALL > HL > MPAL > MDS > HCL

*miR-155*: MPAL > HCL > MDS > ALL > HL

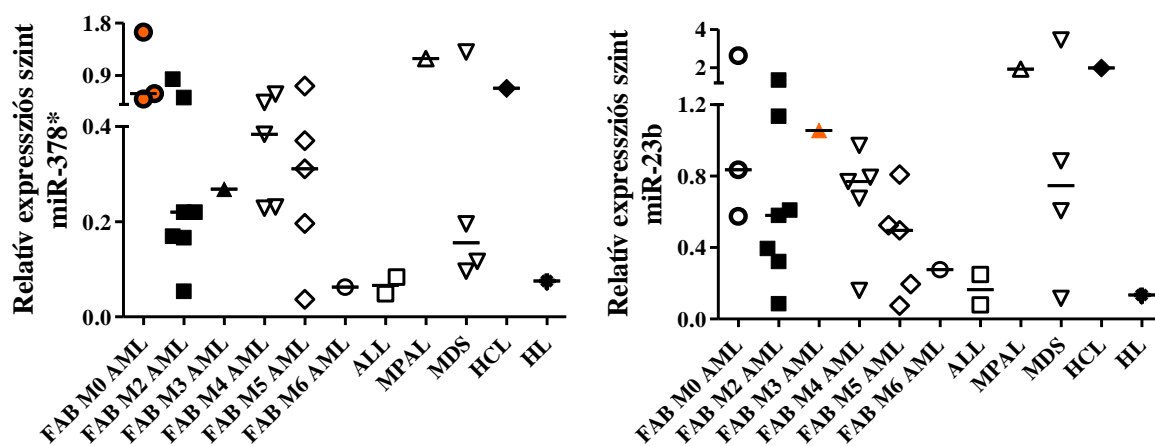
*miR-125b*: MPAL > HCL > MDS > ALL > HL

*HDAC4*: MPAL > HCL > MDS > HL > ALL

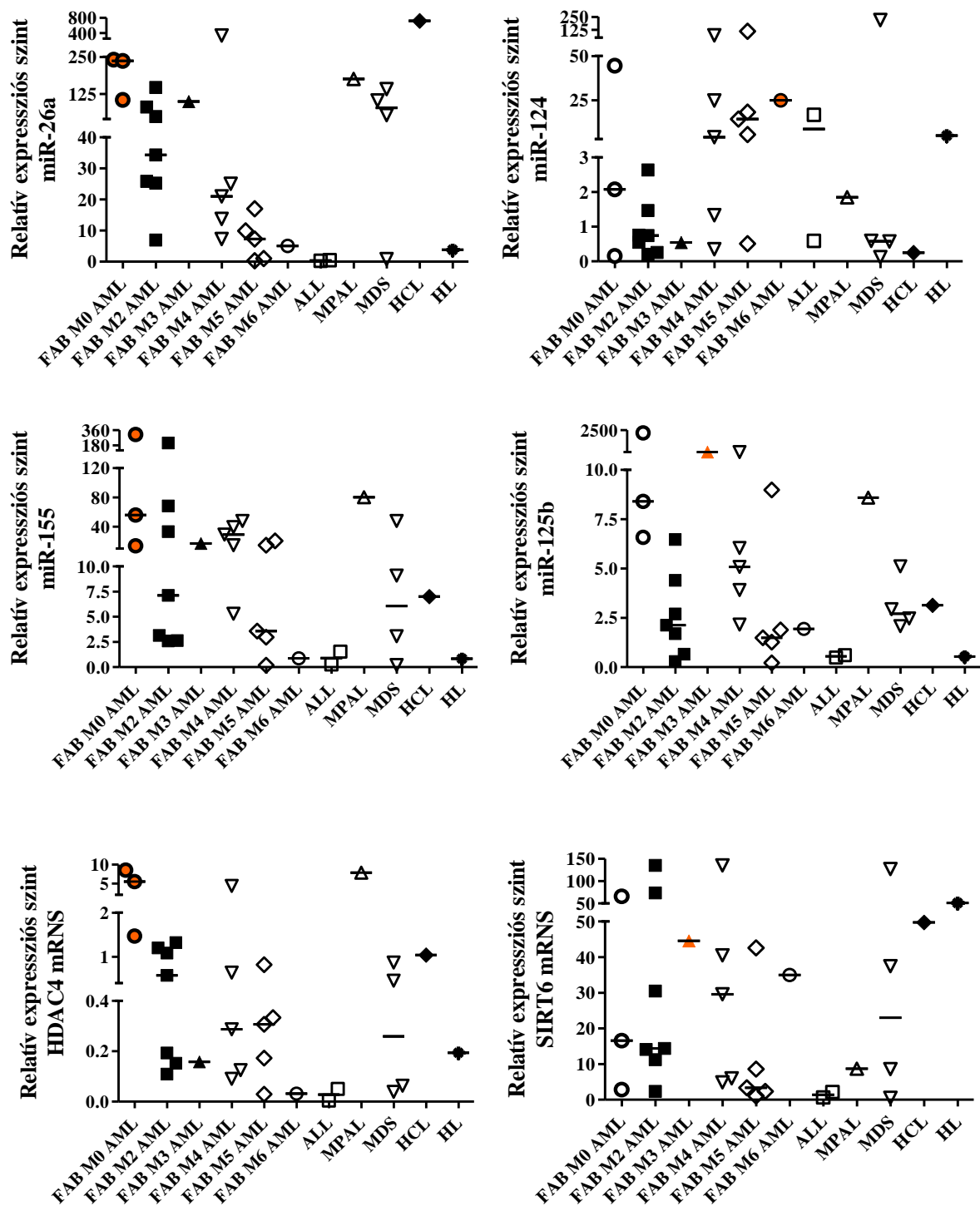
*SIRT6*: HL > HCL > MDS > MPAL > ALL.

A vizsgált három, Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS (miR-378\*, miR-23b, miR-26a) expressziós szintje az AML egyes FAB altípusai közül összességében az M0 (n=3) és M3 (n=1) csoportokban bizonyult legmagasabbnak, míg az M6 (n=1) altípusban a legalacsonyabbnak. A mieloid sejtek differenciációját overexpresszió esetén megzavaró miR-125b medián expressziós szintje az M3-as altípusban (n=1) volt legmagasabb. Az M6-os altípus (n=1) esetén észleltük a tumorszuppresszor miR-124 legmagasabb és az onkogén miR-155 legalacsonyabb medián expressziós szintjét.

Az AML-től különböző hematológiai malignus betegségeket tekintve a Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS-ek legmagasabb medián expressziós szintjét hajás sejt leukémia (n=1), illetve kevert fenotípusú akut leukémia (n=1) esetén észleltük, míg a legalacsonyabb szinteket ALL (n=2) és csontvelői infiltrációval társuló Hodgkin lymphoma (n=1) esetén láttuk. Mindkét vizsgált hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű medián expressziós szintje ALL (n=2) esetén bizonyult a legalacsonyabbnak.

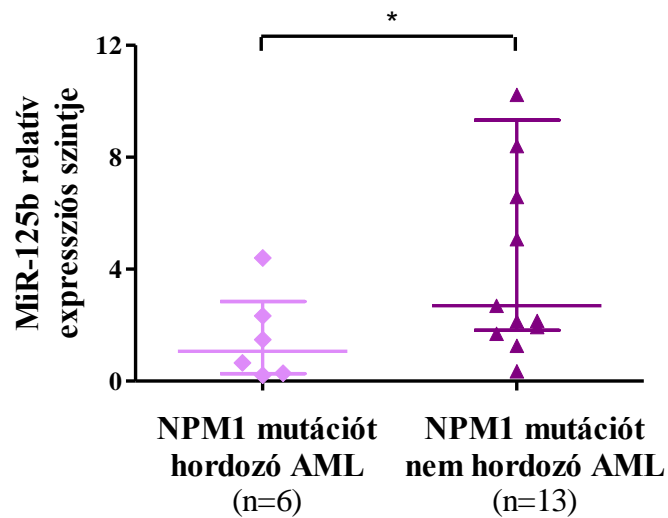


**26. ábra:** A vizsgált mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek medián expressziós szintje az AML egyes FAB altípusaiban, illetve az AML-től különböző hematológiai malignus betegségekből. Az ábrán narancssárga színnel tüntettük fel az AML azon FAB altípusának adatait, amelyiknél a legmagasabb medián expressziós szintet észleltük (FAB M0 AML n=3, FAB M2 AML n=7, FAB M3 AML n=1, FAB M4 AML n=5, FAB M5 AML n=5, FAB M6 AML n=1, ALL n=2, MPAL n=1, MDS n=4, HCL n=1, HL n=1)



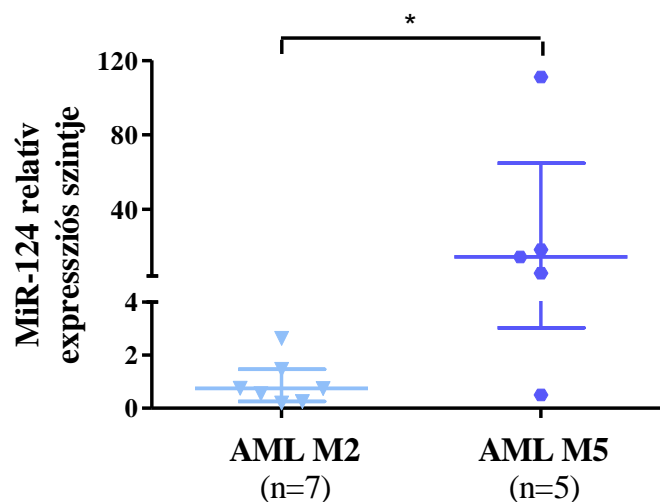
26. *ábra, folytatás:* A vizsgált mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek medián expressziós szintje az AML egyes FAB altípusaiban, illetve az AML-től különböző hematológiai malignus betegségekben. Az ábrán narancssárga színnel tüntettük fel az AML azon FAB altípusának adatait, amelyiknél a legmagasabb medián expressziós szintet észleltük (FAB M0 AML n=3, FAB M2 AML n=7, FAB M3 AML n=1, FAB M4 AML n=5, FAB M5 AML n=5, FAB M6 AML n=1, ALL n=2, MPAL n=1, MDS n=4, HCL n=1, HL n=1)

A mieloid irányú differenciáció szabályozásáért felelős miR-125b expressziós szintje az NPM1 mutációt nem hordozó AML-es betegek csoportjában (n=13) szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint az NPM1 mutációt hordozók körében (n=6) (Mann-Whitney teszt,  $p < 0.05$ ) (27. ábra).



27. ábra: A miR-125b szintje szignifikánsan magasabb volt az AML-es betegek NPM1 mutációt nem hordozó csoportjában (n=13), mint a mutációval rendelkezők esetén (n=6) (Mann-Whitney teszt,  $^* : p < 0.05$ )

A tumorszuppresszor tulajdonságú miR-124 esetén az újonnan diagnosztizált AML-es betegek FAB M5 altípusában (n=5) szignifikánsan magasabb expressziós szintet észleltünk, mint a FAB M2 csoportban (n=7) (Mann-Whitney teszt,  $p < 0.05$ ) (28. ábra).

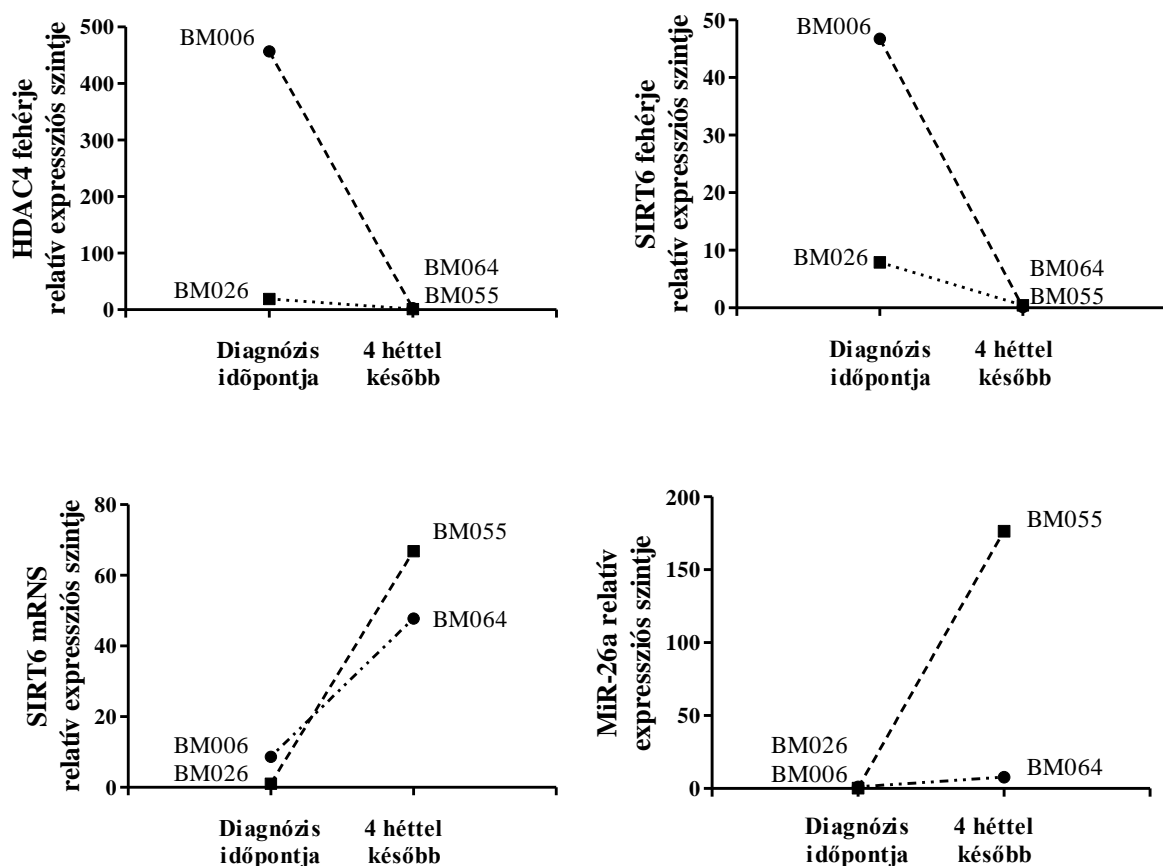


28. ábra: A miR-124 expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult az AML FAB M5 altípusa esetén (n=5), mint az M2-es csoportban (n=7) (Mann-Whitney teszt,  $^* : p < 0.05$ )

## 8.7 Mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjének változása FAB M5 altípusú AML kezelésének első négy hetében

Két, az AML FAB M5-ös csoportjába tartozó beteg esetén (BM006, BM026) a diagnózis idején levett minták mellett a fenti vizsgálatokat a kezelés megkezdésétől számított négy hét múlva ismételt levett csontvelő mintákon (BM064, BM055) is elvégeztük. Ebben az időszakban az egyik beteg (BM006) redukált, a másik (BM026) pedig teljes dózisú indukciós kezelésben részesült, melyet citarabinnal és daunorubicinnel végeztek. Mind a Western blot analízis, mind az RT-qPCR során változásokat észleltünk az expressziós szintekben, melyek négy esetben voltak a két mintapár esetén megegyező irányúak (29. ábra).

Mindkét vizsgált hiszton deacetiláz enzim fehérjeszintű expressziós szintjében csökkenést észleltünk a diagnózis idejéhez képest, míg a SIRT6 mRNA-szintű expressziója és a miR-26a szintje növekedést mutatott.



29. ábra: A diagnózist követően négy héttel az AML FAB M5 csoportjába tartozó két betegtől ismételt levett csontvelő mintákon végzett vizsgálatok során az expressziós szintek változását észleltük

## 9. Megbeszélés

A hematológiai malignus betegségek kialakulásának hátterében a génexpressziós mintázatot meghatározó, genetikai és epigenetikai tényezőket egyaránt magába foglaló, komplex szabályozó hálózat megváltozott működése áll. A sikeres kezelés esélyének növelése érdekében nélkülözhetelen ezen szabályozó hálózat minél több elemének megismerése, azaz a betegség patogenezisének lehető legpontosabb ismerete. Az epigenetikai szabályozás kisiklása és a metabolizmus jellegzetes megváltozása olyan, egymástól el nem választható etiológiai tényezők a malignus betegségek, köztük a leukémiák kialakulásának, melyek reverzibilitásuk révén ígéretes terápiás célpontokat jelentenek.

Munkánk során a 7. táblázatban feltüntetett vizsgálati panelben szereplő hiszton deacetiláz enzimek és mikro-RNS-ek expressziós szintjét vizsgáltuk hematológiai malignus betegségekben, elsősorban akut mieloid leukémiában szenvedő felnőtt betegek csontvelő mintáiban, Western blot analízis és RT-qPCR segítségével.

In vitro vizsgálatok eredményei szerint a  $\text{NAD}^+$ -függő és  $\text{NAD}^+$ -független hiszton deacetiláz enzimek egyidejű gátlása szinergisztikus antileukémiás hatást eredményez, ugyanakkor betegmintákban a hiszton deacetilázok ezen két, eltérő kofaktor szerint megkülönböztetett csoportjába tartozó enzimek szintjét még nem vetették össze [144]. A  $\text{NAD}^+$ -függő, sirtuin típusú hiszton deacetilázok közül a SIRT6, míg a  $\text{NAD}^+$ -független HDAC enzimek közül a HDAC4 fehérje- és mRNS-szintű expressziós szintjét határoztuk meg az onkohematológiai felnőtt betegek diagnózis idején levett csontvelő mintáiban.

Jelen ismereteink szerint a hiszton deacetiláz enzimek közül a Warburg effektus ellensúlyozásában a szolid tumorokban tumorszuppresszor tulajdonságúnak tartott SIRT6 tölti be a legjelentősebb szerepet [119, 126]. Gátolja a sejtek fokozott glükózfelvételét és a glikolitikus enzimek overexpresszióját. Utóbbi hatás az enzim deacetiláz aktivitásához kötött, mivel a glikolitikus gének H3K9 és H3K56 deacetilációja révén meggátolódik azok HIF1 $\alpha$  és c-Myc általi transzkripciója [36]. A teljesség kedvéért megemlítjük, hogy egyéb sirtuinok esetén is ismertek a Warburg effektust elősegítő, illetve azt gátló hatások. A SIRT3 a PDH enzimkomplex és az intracelluláris ROS szintek szabályozása révén egyaránt ellensúlyozza a Warburg-típusú metabolizmust, azonban míg a SIRT4 gátolja, addig a SIRT3 elősegíti a tumorsejtekre jellemző fokozott glutaminolízist [36]. A  $\text{NAD}^+$ -független HDAC enzimek közül akut leukémiákban a HDAC4-ről áll legtöbb adat rendelkezésre. AML-ben igazolódott a HDAC4 kölcsönhatása az FLT3 jelátviteli útvonalához tartozó PRL3 fehérjével, míg gyermekkori ALL-ben a magas HDAC4 expressziós szint prednisonra adott kedvezőtlen

terápiás válasszal és kedvezőtlen prognózissal társul [54, 58]. A többi HDAC enzimhez hasonlóan mind a SIRT6, mind a HDAC4 potenciális onkogén, illetve tumorszuppresszor szerepéről ellentmondásos adatokat közöltek a szolid tumorok különböző típusaiban [126, 162-169]. Akut mieloid leukémiában expressziós szintjüket tudomásunk szerint ezidáig nem tanulmányozták.

A HDAC4 és a SIRT6 Western blot analízissel meghatározott fehérjeszintű expressziós szintje egyaránt rendkívül heterogénnek bizonyult (5. ábra), melyeket összevetettünk egymással, továbbá a társuló citogenetikai és molekuláris genetikai eltérésekkel is. A HDAC4 és SIRT6 enzim fehérjeszintű expressziós szintje között erős pozitív korrelációt igazoltunk mind a teljes vizsgálati anyagban ( $n=45$ ,  $r=0.722$ ), mind az újonnan diagnosztizált AML-es felnőtt betegek csoportjában ( $n=32$ ,  $r=0.794$ ) (6. ábra). Az erős pozitív korrelációnak megfelelően az egyes betegcsoportokban meghatározott medián expressziós szintek sok esetben mindkét enzimnél vagy a relatíve magas, vagy a relatíve alacsony kategóriába estek. A legmagasabb medián HDAC4 és SIRT6 expressziós szintet egyaránt az AML FAB M5 altípusában, valamint az AML-től különböző betegcsoportok közül ALL-ben tapasztaltuk (7. ábra).

A HDAC4 és SIRT6 fehérjeszintű expressziós szintje között a diagnózis idején levett csontvelő mintákban kimutatott szoros korreláció igazolja a két enzim szinergisztikus szerepét a felnőttkori hematológiai malignus betegségek, és azon belül az akut mieloid leukémia patogenezise során, valamint az irodalomból ismert *in vitro* vizsgálatok eredményeivel összhangban utal a  $NAD^+$ -függő és  $NAD^+$ -független HDAC enzimek egyidejű gátlásának szükségességére leukémiában. Az észlelt heterogén expressziós szintek alapján vélhetően a kombinált gátlás antileukémiás hatásának erőssége eltérő lenne a hematológiai malignus betegségek különböző típusai esetén. A két enzim patogenezisben betöltött szinergisztikus szerepe eredményeink szerint különösen fontos az AML FAB M5 altípusában.

A HDAC4 és SIRT6 enzimek fehérjeszintű expressziós szintjét összehasonlítottuk az újonnan diagnosztizált AML-es betegeknek a molekuláris genetikai eltérések jelenléte, illetve a kórelőzményben szereplő MDS szerint megkülönböztetett alcsoportjaiban is. MDS-ből transzformálódott AML esetén a HDAC4 fehérjeszintű expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult, mint megelőző MDS hiányában (8. ábra). Ezzel szemben a SIRT6 fehérje szintje éppen az MDS-ből transzformálódott AML-es betegek csoportjában volt magasabb, ugyanakkor ez utóbbi különbség statisztikailag nem volt szignifikáns. FLT3-ITD mutáció esetén mindkét fehérje expressziós szintje magasabbnak bizonyult, mint az AML-es betegek FLT3-ITD eltérést nem hordozó alcsoportjában, mely különbség szintén a HDAC4

esetén volt szignifikáns (9. ábra). Ez utóbbi megfigyelés alátámasztja a HDAC4 FLT3-ITD mutációval társuló AML-ben betöltött patogenetikai szerepét [54]. A HDAC4 és SIRT6 fehérjék expressziós szintje magasabb volt FLT3-TKD mutáció hiányában, mint az eltérést hordozó AML-es betegek csoportjában, továbbá mindkét fehérje szintje magasabbnak bizonyult az NPM1 mutációt hordozó AML-es betegekben, mint a mutáció hiányában, azonban ezek a különbségek statisztikailag nem voltak szignifikánsak.

Fehérjeszintű vizsgálataink eredményei prognosztikai következtetések levonására nem alkalmasak, azonban a HDAC4 és SIRT6 enzimek expressziós szintjének heterogenitása felhívja a figyelmet a citogenetikai, molekuláris genetikai, illetve epigenetikai eltérések együttes értékelésének jelentőségére. Hasonlóan a molekuláris genetikai eltérések különböző kombinációinak ismerten eltérő prognózissal való társulásához, egy-egy hiszton deacetiláz enzim expressziós szintje a társuló eltérések függvényében kedvező vagy kedvezőtlen kimenetelt egyaránt jelezhet. A különböző hiszton deacetiláz enzimek valószínűleg a leukémia patogenezisének más-más szakaszán töltenek be jelentősebb szerepet, attól is függően, hogy milyen kölcsönhatásban állnak a genetikai eltérések nyomán képződő fúziós onkoproteinnal, illetve a mutációk által érintett fehérjékkel.

RNS-vizsgálataink során a hematológiai malignus betegségekből szenvedő felnőtt betegek diagnózis idején nyert csontvelő mintákban a HDAC4 és SIRT6 hiszton deacetiláz enzimek mRNS-szintű expressziós szintje mellett meghatároztuk a tumorszuppresszor miR-124, az onkogén miR-155, a hemopoézis szabályozásáért felelős miR-125b, illetve a szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott miR-378\*, miR-23b és miR-26a relatív expressziós szintjét.

Az elmúlt években több mikro-RNS szerepe is igazolódott egyes metabolikus enzimek tumorspecifikus izoformáinak szabályozásában. Az onkogén miR-155 indirekt módon fokozza a hexokináz HK II izoformájának expresszióját [122]. Ezzel szemben a tumorszuppresszor miR-124 a PKM gén alternatív splicing-ját szabályozza, meggátolva a tumorspecifikus PKM2 izoforma kifejeződését [122]. A sejtek glükózfelvételéért felelős GLUT fehérjék expressziós szintjének tumorsejtekre jellemző megnövekedését számos mikro-RNS down-regulációja elősegíti. A sejtekből laktátot kipumpáló MCT1 transzportert egyéb mikro-RNS-ek mellett a miR-124 is szabályozza, melynek tumorokban jellemző down-regulációja az MCT1 expressziós szintjének megemelkedéséhez, és a sejtekben termelődő excesszív mennyiségű laktát exportjának fokozódásához vezet [122]. A citrátkör enzimeinek szabályozásáért szintén felelősek a mikro-RNS-ek. A PGC1 $\beta$  első intronjában kódolt miR-

378\* a PGC1 $\beta$ -val kölcsönható ERR $\gamma$  és GABPA fehérjék gátlása révén a citrátköri enzimek expressziós szintjének csökkenését okozza [123]. AML-ben szenvedő betegektől származó granulocitákban igazolták, hogy a miR-23b és a miR-26a a ROS scavenger peroxiredoxin III molekula up-regulációjával járul hozzá a Warburg effektushoz [129]. A piruvát dehidrogenáz komplex X nevű komponensének (PDHX) szabályozása által a miR-26a hozzájárul az acetyl-CoA mennyiségének daganatsejtekre jellemző csökkenéséhez, valamint a piruvát és laktát akkumulációjához [160].

A malignus betegségek etiológiai faktorai közötti kölcsönhatások sokszínűségét jelzi, hogy a fehérjekódoló onkogének és tumorszuppresszor gének metabolizmusra kifejtett hatása sok esetben mikro-RNS-ek szabályozásán keresztül, indirekt módon valósul meg [123]. A c-Myc a glutamináz enzimet represszáló miR-23a és miR-23b gátlása révén segíti elő a malignusan transzformálódott sejtekben a fokozott glutaminolízist, míg az intenzív glikolízishez az onkogén miR-17-92 klaszter aktivációjával járul hozzá [101, 122, 123]. Ezen hatásokat a tumorszuppresszor p53 által aktivált, szintén tumorszuppresszor sajátosságú miR-34 család a c-Myc gátlásával ellensúlyozza [123]. A Warburg effektus kialakulásában szerepet játszó mikro-RNS-ek egy jelentős hányada a HIF1 $\alpha$  transzkripciós faktor által szabályozott [101].

Vizsgáltuk, hogy a miR-378\*, miR-23b és miR-26a expressziós szintje hogyan korrelál egymással, illetve a leukémia patogenezisében igazoltan fontos szerepet betöltő miR-124, miR-155 és miR-125b szintjével, a hematológiai malignus betegségek diagnózisának idején megállapított klinikai adatokkal és a vizsgált két hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintjével.

A szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott miR-378\*, miR-23b és miR-26a expressziós szintje pozitívan korrelált egymással, az onkogén miR-155 és a hemopoézist szabályozó miR-125b szintjével, míg negatív korrelációt igazoltunk a tumorszuppresszor miR-124 expressziós szintjével (12-15. ábra). Mindez a leukémia patogenezisében betöltött szerepüket támasztja alá. Eredményeink alapján a miR-23b szolid tumorokban észlelt metabolikus hatásai közül hematológiai malignus betegségekben vélhetően a Warburg effektust elősegítő, nem pedig az azt gátló hatása a jelentősebb. A miR-155 és miR-125b szintjével észlelt pozitív, valamint a miR-124 szintjével kimutatott negatív korreláció alapján a miR-378\*, miR-23b és miR-26a overexpressziója feltehetően kedvezőtlen prognózist jelez, ennek megerősítésére azonban további vizsgálatok szükségesek.

Tisztázni szükséges továbbá, hogy a leukémia patogenezisében betöltött szerepükhöz a szolid tumorokban megállapított metabolikus hatásaik milyen mértékben járulnak hozzá.

A SIRT6 mRNS-szintű expressziós szintje negatívan korrelált a tumorszuppresszor miR-124 szintjével, míg pozitív korreláció igazolódott a miR-26a expressziójával (19. ábra). Utóbbi nagy valószínűséggel nem metabolikus hatások következménye, hiszen a SIRT6 a fokozott glikolízis gátlása által anti-Warburg hatást fejt ki, míg a miR-26a ezzel ellentétben a PDHX, illetve peroxiredoxin III szabályozása révén elősegíti azt. A pozitív korrelációra magyarázatul szolgáló közös vonás a hemopoézis során kiemelt jelentőségű TET2 enzim szabályozása, mivel a SIRT6 és a miR-26a up-regulációja egyaránt a TET2 enzim gátlását, és a hemopoézis következményes megzavarását eredményezi [86]. Eredményeink alapján hematológiai malignus betegségekből, és azon belül akut mieloid leukémiában a SIRT6 metabolikus hatásánál jelentősebb a hemopoézisre a TET2 enzim szabályozása által kifejtett hatása. A tumorszuppresszor miR-124 szintjével észlelt negatív korreláció felveti a SIRT6 onkogén tulajdonságát leukémiában, valamint a SIRT6 up-regulációjának a betegség kedvezőtlen kimenetelével való társulását, amit a jövőben utánkövetéses vizsgálatok során tanulmányozni szükséges. Mindez ellentétes a SIRT6 szolid tumorok számos típusában feltételezett tumorszuppresszor tulajdonságával, felveti azonban annak lehetőségét, hogy bizonyos hiszton deacetiláz enzimek egyes mikro-RNS-ekhez, például a miR-29 családhoz hasonlóan hematológiai malignus betegségekből a szolid tumorokkal összehasonlítva ellentétes tumorszuppresszor vagy onkogén tulajdonsággal rendelkezhetnek.

A HDAC4 mRNS-szintű expressziós szintje pozitívan korrelált a vizsgált három, Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS, az onkogén miR-155 és a mieloid sejtek differenciációját szabályozó miR-125b expressziójával, míg negatív korrelációt észleltünk a tumorszuppresszor miR-124 szintjével (17-18. ábra). Ez alapján felvetődik a HDAC4 felnőttkori AML-ben betöltött onkogén szerepe, és a magas HDAC4 szint társulása a betegség kedvezőtlen kimenetelével, ami összhangban áll a gyermekkori ALL-ben észlelt megfigyelésekkel. Mindennek megerősítésére a SIRT6-hoz hasonlóan utánkövetéses tanulmányok szükségesek. Tisztázni szükséges továbbá, hogy a HDAC4 hematológiai malignus betegségekből patogenezisében betöltött szerepéhez hozzájárulnak-e, és ha igen milyen mértékben, a Warburg effektust elősegítő metabolikus hatások.

Annak ellenére, hogy az irodalomban rendelkezésre álló adatok alapján az általunk vizsgált két hiszton deacetiláz enzim közül a SIRT6 tölt be fontos szerepet a tumorsejtek metabolizmusának szabályozásában, a hematológiai malignus betegségekből nyert eredményeink arra utalnak, hogy éppen a HDAC4 patogenezisben betöltött szerepéhez

valószínűbb a Warburg effektussal összefüggő metabolikus hatások hozzájárulása, míg a SIRT6 esetén a hemopoézisre kifejtett hatás tűnik jelentősebbnek.

A vizsgált gének expressziós szintjét összehasonlítva az onkogén miR-155 szintje mind a teljes vizsgálati anyagban, mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában szignifikánsan magasabbnak bizonyult a tumorsuppresszor miR-124 expressziós szintjénél, ami a méréseink pontosságát támasztja alá (22. ábra).

A szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS-ek közül a miR-26a szintje szignifikánsan magasabb volt a miR-378\* és a miR-23b szintjénél a teljes anyagban és az új AML-es felnőtt betegek körében egyaránt (23. ábra). A miR-26a expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult a teljes vizsgálati anyagban az onkogén miR-155 szintjénél, továbbá mind a teljes vizsgálati körben, mind az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában a mieloid sejtek differenciációját szabályozó miR-125b expressziós szintjénél (24. ábra). A miR-26a magas medián expressziós szintjét magyarázhatja, hogy míg a miR-125b a hemopoézis megzavarásával, a miR-378\* és miR-23b pedig a szolid tumorokban nyert adatok alapján feltehetően a Warburg effektus elősegítésével járul hozzá a patogenezishez, addig a miR-26a a Warburg effektus elősegítése mellett a TET2 enzim szabályozásán keresztül a hemopoézis megzavarása révén is hozzájárul a betegség kialakulásához [86, 129, 160].

A két vizsgált hiszton deacetiláz enzim közül a SIRT6 mRNS-szintű expressziós szintje a HDAC4 szintjénél szignifikánsan magasabbnak adódott a teljes vizsgálati körben, illetve az újonnan diagnosztizált AML-es betegek csoportjában egyaránt (25. ábra), a SIRT6 up-regulációját CLL-ben pedig már korábban igazolták [55]. Mindezek alapján a hematológiai malignus betegségek patogenezisében a SIRT6 overexpressziója vélhetően nagyobb jelentőséggel bír, mint a HDAC4 up-regulációja, melynek hátterében nem a metabolikus, hanem a TET2 enzim szabályozása által a hemopoézisre kifejtett hatása állhat.

Az újonnan diagnosztizált AML-es felnőtt betegek csoportján belül a különböző molekuláris genetikai eltérések, illetve FAB típusok alapján megkülönböztetett alcsoportokat összehasonlítva több vizsgált gén esetén is statisztikailag szignifikáns különbséget észleltünk az expressziós szintekben.

A miR-125b expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult az NPM1 mutáció hiányában, mint NPM1 mutációval társuló AML esetén (27. ábra), amely megfigyelés arra utal, hogy a miR-125b overexpressziójának a mieloid sejtek differenciációját megzavaró hatása hozzájárulhat az NPM1 mutációt nem hordozó AML-es betegek ismerten kedvezőtlen prognózisához. Bár tudomásunk szerint epigenetikai támadáspontú szert jelenleg

profilaktikus célból nem alkalmaznak, a mieloid sejtek differenciációjára kifejtett gátló hatásánál fogva, mielodiszplázias szindrómában logikusnak tűnik a miR-125b expressziós szintjének profilaktikus csökkentése, az AML-be történő transzformáció megelőzése érdekében.

Az AML egyes FAB altípusait összehasonlítva a miR-125b medián expressziós szintje az M3 alcsoportban volt legmagasabb, míg a második legmagasabb értéket a differenciálatlan M0 csoportban észleltük, amely eredményeink alapján a miR-125b-nek a hemopoetikus sejtek differenciációjára kifejtett hatása az M3 és M0 FAB altípusok patogenezise során a legjelentősebb. A miR-124 esetén szignifikánsan magasabb expressziós szintet mértünk FAB M5 típusú AML-ben, mint a FAB M2 alcsoportban (28. ábra). Erre magyarázatul szolgálhat, ha a miR-124 tumorszuppresszor hatása a magasabb expressziós szint ellenére is csak kevésbé érvényesül a FAB M5 csoportban, az AML M2 altípusával összehasonlítva. A vizsgált három, Warburg effektussal összefüggésbe hozott mikro-RNS közül a miR-378\* és miR-26a esetében a legmagasabb, míg a miR-23b esetén a második legmagasabb medián expressziós szintet láttuk az AML FAB M0 alcsoportjában, továbbá mindhárom mikro-RNS medián expressziós szintje FAB M6 altípusú AML esetén bizonyult legalacsonyabbnak. Mindezek alapján vélhetően az AML különböző FAB típusai közül a szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott miR-378\*, miR-23b és miR-26a összességében az AML M0-s FAB altípusának patogenezise során tölt be legfontosabb, míg az M6-os csoportban a legkevésbé jelentős szerepet. Ellentétben ezen FAB altípus kedvezőtlen prognózisával, az M6-os alcsoportban volt legalacsonyabb az onkogén miR-155, míg a legmagasabb a tumorszuppresszor miR-124 medián expressziós szintje. Összhangban az AML FAB M2 és M5 altípusának összehasonlítása során nyert, fentebb részletezett eredményekkel, a miR-124 medián expressziós szintje a kedvezőbb prognózisú FAB altípusokban jellemzően alacsonyabb volt, míg a kedvezőtlen kimenetellel társuló FAB csoportokban magasabbnak bizonyult, ezért azt tartjuk valószínűnek, hogy a miR-124 tumorszuppresszor tulajdonsága részben a társuló citogenetikai eltérések függvényében érvényesül nagyobb vagy kisebb mértékben.

Az AML-től különböző hematológiai malignus betegségekben szenvedő felnőtt betegeknel észlelt expressziós szinteket egymással összevetve a szolid tumorokban Warburg effektussal összefüggésbe hozott, mindhárom vizsgált mikro-RNS első és második legmagasabb medián expressziós szintjét is kivétel nélkül MPAL vagy HCL esetén kaptuk, ami alapján a miR-378\*, miR-23b és miR-26a az MPAL és a HCL patogenezise során

feltehetően fontosabb szerepet tölt be, mint az MDS, az ALL, illetve a csontvelői infiltrációval társuló HL kialakulása során.

A miR-378\*, miR-23b és miR-26a hematológiai malignus betegségekben észlelt heterogén expressziós szintje összhangban áll azon irodalmi adatokkal, melyek szerint a leukémia különböző típusaiban a jelentős részben epigenetikai tényezők által szabályozott Warburg effektus más-más eleme lehet hangsúlyosabb [132, 136].

Tanulmányoztuk, hogy milyen összefüggés áll fenn a hematológiai malignus betegségek diagnózisának idején megállapított klinikai adatok, valamint a vizsgált gének expressziós szintje között. Vizsgálataink során a diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszám negatívan korrelált a HDAC4 mRNS, SIRT6 mRNS és miR-26a szintjével, míg pozitív korreláció igazolódott a tumorszuppresszor miR-124 expressziós szintjével (20. ábra). Nem észleltük azonban az irodalomban korábban közölt, a miR-155 és a diagnózis idején megállapított fehérvérsejtszám között fennálló pozitív korrelációt [94]. Ennek oka lehet a rendelkezésünkre álló alacsony mintaszám mellett a kísérletek során alkalmazott eltérő metodika is. A laboratóriumi módszerek standardizációja a jövőben szükséges lenne, hiszen ezáltal a kutatási eredmények jobban összevethetőek lennének, és kevesebb ellentmondásos eredmény születne például a megváltozott mikro-RNS expressziós szintek prognosztikai vonatkozásait tekintve. A standardizációhoz tartozna az egységes referenciagén alkalmazása, az RNS-izolálás módszerének, a primerek szekvenciájának és az RT-qPCR reakciók hőmérsékleti profiljának egységesítése, illetve a kísérleti adatok ugyanazon módszer szerint történő kiértékelése.

Jelenleg nem ismert, hogy a betegség patogenezise során a mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjének módosulása vagy a fehérvérsejtszám változása következik be hamarabb. Az epigenetikai változások az eddigi irodalmi adatok szerint sokszor a hematológiai malignus betegségek korai stádiumában alakulnak ki, így a megváltozott expressziós szintek potenciálisan a leukémia fokozott kockázatának biomarkereiként lehetnek alkalmazhatóak.

Ismert, hogy egyes konvencionális kemoterápiás szerek is indukálhatnak epigenetikai változásokat. Például a CML-ben alkalmazott imatinib terápia következtében számos mikro-RNS expressziós szintje, továbbá a DNS-metilációs mintázat és a hisztonkód is igazoltan módosul [81, 99, 170, 171]. Tudomásunk szerint az AML kezelése során bekövetkező epigenetikai változások ezidáig nem voltak ismertek. Vizsgálataink során két FAB M5 altípusú AML-es betegnél a diagnózis idején levett csontvelő minták mellett a vizsgálati panelben szereplő mikro-RNS-ek és hiszton deacetiláz enzimek expressziós szintjét a kezelés

megkezdését négy héttel követően ismételt levett mintákban is tanulmányoztuk, és négy esetben a két mintapárban megegyező tendenciát tapasztaltunk. A kezelés első négy hetében a HDAC4 és a SIRT6 enzimek fehérjeszintű expressziós szintje egyaránt csökkent, míg a SIRT6 mRNS és a miR-26a szintje növekedett (29. ábra). Az expressziós szintekben a kezelés során bekövetkező változások kimutatásának talán legfontosabb potenciális klinikai alkalmazását jelenti, hogy ezek által előrejelezhetővé válhat a kezelés folytatására adott terápiás válasz, hasonlóan az AML-ben nyert azon eredményekhez, melyek szerint a miR-29c diagnózis idején megállapított expressziós szintje igazoltan összefügg az azacitidin kezelés várható eredményességével [102].

Az epigenetikai támadáspontú szerek várhatóan a meglévő protokollok kiegészítéseként fognak megjelenni, a betegek meghatározott alcsoportjaiban, ezért a konvencionális kemoterápiás szerekkel történő kombinációjuk gyakorlatilag elkerülhetetlen. Mivel az epigenetikai szabályozást célzó szerek túlnyomó többsége a kromatinállomány szerkezetének módosulásához vezet, ezért alkalmazásuk megváltoztathatja a konvencionális kemoterápiás szerekkel, köztük alkiláló ágensekkel és topoizomeráz gátlókkal szembeni érzékenységet, ez pedig előre nem látható mellékhatásokat eredményezhet. A terápiás hatékonyság növelése érdekében az új kombinációk bevezetésére törekednünk kell, ugyanakkor ezek alkalmazása fokozott óvatosságot igényel.

Az elvégzett vizsgálatok korlátai között megemlíjtjük, hogy az etikai engedély nem tette lehetővé egészséges donoroktól származó csontvelő minták levételét. A mintagyűjtés időszaka alatt két betegről tudtunk elegendő mennyiségű, nem infiltrált csontvelő mintát nyerni, akiknél myeloid sarcoma, illetve tüdő adenocarcinoma igazolódott. Szerencsésebb lett volna malignus alapbetegségben nem szenvedő, például idiopathiás trombocytopeniás purpurás (ITP) betegektől mintát nyernünk kontroll vizsgálatok céljára, azonban a mintagyűjtési időszakban erre nem volt technikai lehetőség. Néhány beteg esetén a citogenetikai és molekuláris genetikai eltérések, az AML FAB altípusa vagy a csontvelőben jelenlévő blasztok százalékos aránya ismeretlen volt. Az AML egyes FAB altípusaiba külön-külön kevés (n=1-9) beteg tartozott, ami feltehetően hozzájárult ahhoz, hogy az egyes FAB csoportok között csak kisszámú szignifikáns eltérés igazolódott az expressziós szintekben. Tekintettel a blasztsejtek nagyarányú előfordulására a csontvelőben (medián: 79.5% AML-ben), a mintákból a blasztokat nem izoláltuk, hanem minden esetben a frakcionálatlan mintákat készítettük elő Western blot analízishez és RNS-izoláláshoz. A blaszt populáció elkülönítése a kezelés során bekövetkező génextpressziós változások pontos elemzéséhez szükséges lett volna, azonban itt nem a változások pontos meghatározására törekedtünk,

hanem arra, hogy felhívjuk a figyelmet ezek klinikai jelentőségére. A Western blot analízis során nem minden minta vizsgálata esetén alkalmaztuk ugyanazt a belső kontrollt, azonban egy adott minta esetén a vizsgált fehérjék expressziós szintjét mindig egyazon kontrollra normalizáltuk, így az eredmények összevethetőek voltak. Mivel munkánk célja elsősorban nem prognosztikai következtetések levonása volt, így prospektív vizsgálatot nem végeztünk, és túlélési görbét nem készítettünk.

Munkánk során nem prognosztikai, hanem elsősorban a patogenezist érintő következtetések levonására törekedtünk. Elsőként vizsgáltunk és igazoltunk  $\text{NAD}^+$ -függő és  $\text{NAD}^+$ -független hiszton deacetiláz enzimek fehérjeszintű expressziós szintje közötti korrelációt hematológiai malignus betegségekben. Eredményeink alátámasztják a Warburg effektussal szolid tumorokban összefüggésbe hozott mikro-RNS-ek patogenetikai szerepét ezen betegségcsoportban. Vizsgálataink felvetik mind a SIRT6, mind a HDAC4 onkogén szerepét felnőttkori akut mieloid leukémiában. Az AML egyes alcsoportjai között több esetben is szignifikáns különbségeket igazoltunk a vizsgált gének expressziós szintjében. Új megfigyeléseket tettünk az epigenetikai eltérések és klinikai adatok közötti összefüggések vizsgálata, valamint a konvencionális kemoterápiás kezelés következtében kialakuló epigenetikai változások tanulmányozása során.

A jövőben nélkülözhetetlen az epigenetikai eltérések és a hematológiai malignus betegségek kimenetele közötti összefüggések megállapítására irányuló prospektív vizsgálatok végzése mellett a különböző citogenetikai, molekuláris genetikai, epigenetikai és metabolikus eltérések együttes értékelése, amely által lehetővé válhat egy a jelenleginél árnyaltabb prognosztikai rendszer kidolgozása. Tekintettel arra, hogy az eddigi adatok alapján a reverzibilis epigenetikai és metabolikus változások a betegség patogenezise során jellemzően hamar kialakulnak, ezek mielőbbi felismerésének jelentősége kulcsfontosságú. Az egyénre szabott, epigenetikai és metabolikus támadáspontú szereket egyaránt magában foglaló terápia lehető legkorábbi stádiumban történő megkezdése elősegíti mind a túlélési aránynak, mind a túlélők életminőségének a javulását.

## 10. Főbb új tudományos eredmények

(1) Erős pozitív korrelációt igazoltunk a SIRT6 és a HDAC4 hiszton deacetiláz enzim fehérjeszintű expressziós szintje között, mellyel elsőként bizonyítottunk pozitív összefüggést NAD<sup>+</sup>-függő és NAD<sup>+</sup>-független hiszton deacetiláz enzimek expressziója között hematológiai malignus betegségekben.

(2) Erős pozitív korrelációt mutattunk ki a miR-378\*, miR-23b és miR-26a szintje között, mely mikro-RNS-eket szolid tumorokban a Warburg-típusú metabolizmussal hozták összefüggésbe. Expressziós szintjük emellett korrelált az irodalomból jól ismert tumorszuppresszor, onkogén, illetve a hemopoézis szabályozásáért felelős mikro-RNS-ek szintjével.

(3) A hemopoézis epigenetikai szabályozásáért felelős TET2 enzimet szabályozó SIRT6 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje pozitívan korrelált a TET2 enzim szabályozásában szintén részt vevő miR-26a szintjével.

(4) A HDAC4 hiszton deacetiláz enzim mRNS-szintű expressziós szintje szoros korrelációt mutatott a leukémia patogenezisében igazoltan szerepet játszó, tumorszuppresszor, onkogén, illetve a hemopoézis szabályozásáért felelős mikro-RNS-ek expressziós szintjével.

(5) Az akut mieloid leukémia egyes alcsoportjai között több esetben is szignifikáns különbségeket észleltünk a vizsgált hiszton deacetiláz enzimek és mikro-RNS-ek expressziós szintjében.

(5/1) A HDAC4 fehérjeszintű expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult a nem mielodiszpláziás szindrómából transzformálódott akut mieloid leukémiában szenvedő betegek csoportjában, mint mielodiszpláziás szindrómából történt transzformáció esetén.

(5/2) A HDAC4 fehérjeszintű expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt az FLT3-ITD mutációt hordozó akut mieloid leukémiás betegek csoportjában, mint ezen mutáció hiányában.

(5/3) Az akut mieloid leukémiás betegek NPM1 mutációt nem hordozó csoportjában a miR-125b szignifikánsan magasabb expressziós szintjét észleltük, mint az NPM1 mutációt hordozók körében.

(5/4) A tumorszuppresszor miR-124 expressziós szintje szignifikánsan magasabbnak bizonyult FAB M5, mint FAB M2 típusú akut mieloid leukémiában.

**(6) A hematológiai malignus betegségek diagnózisának idején megállapított fehérvérsejtszám negatívan korrelált a HDAC4 mRNS, a SIRT6 mRNS, illetve a miR-26a expressziós szintjével, míg a miR-124 szintjével pozitív korreláció igazolódott.**

## 11. Irodalomjegyzék

1. Gao X, Reid MA, Kong M, Locasale JW: Metabolic interactions with cancer epigenetics. *Mol Aspects Med* (2016) 54:50-57.
2. Brait M, Sidransky D: Cancer epigenetics: above and beyond. *Toxicol Mech Methods* (2011) 21(4):275-88.
3. Bollati V, Baccarelli A: Environmental Epigenetics. *Heredity (Edinb)* (2010) 105(1): 105–112.
4. Paluch BE, Naqash AR, Brumberger Z, Nemeth MJ, Griffiths EA: Epigenetics: A primer for clinicians. *Blood Rev* (2016) 30(4):285-95.
5. Meier K, Brehm A: Chromatin regulation: how complex does it get? *Epigenetics* (2014) 9(11):1485-95.
6. Paralkar VR, Weiss MJ: Long noncoding RNAs in biology and hematopoiesis. *Blood* (2013) 121(24):4842-6.
7. Yu Z, Pestell RG: Small Non-coding RNAs Govern Mammary Gland Tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* (2012) 17:59–64.
8. Varga-Weisz P: ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene* (2001) 20(24):3076-85.
9. Johnstone SE, Baylin SB: Stress and the epigenetic landscape: a link to the pathobiology of human diseases? *Nat Rev Genet* (2010) 11(11):806-12.
10. Li XQ, Guo YY, De W: DNA methylation and microRNAs in cancer. *World J Gastroenterol* (2012) 18(9):882-888.
11. Florean C, Schnekenburger M, Grandjette C, Dicato M, Diederich M: Epigenomics of leukemia: from mechanisms to therapeutic applications. *Epigenomics* (2011) 3(5):581-609.
12. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H: Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* (2001) 97:1172-1179.
13. Villa R, De Santis F, Gutierrez A, Minucci S, Pelicci PG, Di Croce L: Epigenetic gene silencing in acute promyelocytic leukemia. *Biochem Pharmacol* (2004) 68(6):1247-54.
14. Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH: Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* (2006) 311(5759):395-8.
15. Delatte B, Fuks F: TET proteins: on the frenetic hunt for new cytosine modifications. *Brief Funct Genomics* (2013) 12(3):191-204.
16. Hill PW, Amouroux R, Hajkova P: DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: an emerging complex story. *Genomics* (2014) 104(5):324-33.
17. Nakajima H, Kunimoto H: TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci* (2014) 105(9):1093-9.
18. Ko M, An J, Pastor WA, Koralov SB, Rajewsky K, Rao A: TET proteins and 5-methylcytosine oxidation in hematological cancers. *Immunol Rev* (2015) 263(1):6-21.
19. Fathi AT, Abdel-Wahab O: Mutations in Epigenetic Modifiers in Myeloid Malignancies and the Prospect of Novel Epigenetic-Targeted Therapy. *Adv in Hematol* (2012) 2012:469592. doi: 10.1155/2012/469592.

20. Wouters BJ, Delwel R: Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia. *Blood* (2016) 127(1):42-52.
21. Esteller M: Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clin Immunol* (2003) 109(1):80-8.
22. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ: Concurrent DNA Hypermethylation of Multiple Genes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res* (1999) 59(15):3730-3740.
23. Ting AH, McGarvey KM, Baylin SB: The cancer epigenome-components and functional correlates. *Genes Dev* (2006) 20(23):3215-3231.
24. Melki JR, Clark SJ: DNA methylation changes in leukemia. *Semin Cancer Biol* (2002) 12(5):347-357.
25. Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, van Putten W, Skrabanek L, Campagne F, Mazumdar M, Grealley JM, Valk PJ, Löwenberg B, Delwel R, Melnick A: DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell* (2010) 17(1):13-27.
26. Harikrishnan KN, Sahar Bassal, Chris Tikellis, Assam El-Osta: Expression analysis of the epigenetic methyltransferases and methyl-CpG binding protein families in the normal B-cell and B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Cancer Biol Ther* (2004) 3(10):989-994.
27. Guryanova OA, Shank K, Spitzer B, Luciani L, Koche RP, Garrett-Bakelman FE, Ganzel C, Durham BH, Mohanty A, Hoermann G, Rivera SA, Chramiec AG, Pronier E, Bastian L, Keller MD, Tovbin D, Loizou E, Weinstein AR, Gonzalez AR, Lieu YK, Rowe JM, Pastore F, McKenney AS, Krivtsov AV, Sperr WR, Cross JR, Mason CE, Tallman MS, Arcila ME, Abdel-Wahab O, Armstrong SA, Kubicek S, Staber PB, Gönen M, Paietta EM, Melnick AM, Nimer SD, Mukherjee S, Levine RL: DNMT3A mutations promote anthracycline resistance in acute myeloid leukemia via impaired nucleosome remodeling. *Nat Med* (2016) 22(12):1488-1495.
28. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, Späth D, Kayser S, Zucknick M, Götze K, Horst HA, Germing U, Döhner H, Döhner K: IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol* (2010) 28(22):3636-43.
29. Conway O'Brien E, Prideaux S, Chevassut T: The epigenetic landscape of acute myeloid leukemia. *Adv Hematol* (2014) 2014:103175. doi: 10.1155/2014/103175.
30. Aumann S, Abdel-Wahab O: Somatic alterations and dysregulation of epigenetic modifiers in cancers. *Biochem Biophys Res Commun* (2014) 455(1-2):24-34.
31. Munshi A, Shafi G, Aliya N, Jyothy A: Histone modifications dictate specific biological readouts. *J Genet Genomics* (2008) 36(2):75-88.
32. Herceg Z, Murr R: Mechanisms of histone modifications. *Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics* (2011) doi: 10.1016/B978-0-12-375709-8.00003-4.
33. Barneda-Zahonero B, Parra M: Histone deacetylases and cancer. *Mol Oncol* (2012) 6:579-589.
34. Taby R: Cancer Epigenetics. *CA Cancer J Clin* (2010) 60(6):376-392.
35. Delcuve GP, Khan DH, Davie JR: Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clin Epigenetics* (2012) 4(1):5.

36. Zwaans BM, Lombard DB: Interplay between sirtuins, MYC and hypoxia-inducible factor in cancer-associated metabolic reprogramming. *Dis Model Mech* (2014) 7(9):1023-32.
37. Osborne B, Bentley NL, Montgomery MK, Turner N: The role of mitochondrial sirtuins in health and disease. *Free Radic Biol Med* (2016) 100:164-174.
38. Hirschev MD, Zhao Y: Metabolic Regulation by Lysine Malonylation, Succinylation, and Glutarylation. *Mol Cell Proteomics* (2015) 14(9):2308-15.
39. Correia M, Perestrelo T, Rodrigues AS, Ribeiro MF, Pereira SL, Sousa MI, Ramalho-Santos J: Sirtuins in metabolism, stemness and differentiation. *Biochim Biophys Acta* (2017) 1861(1 Pt A):3444-3455.
40. Banerjee J, Bruckbauer A, Zemel MB: Activation of the AMPK/Sirt1 pathway by a leucine-metformin combination increases insulin sensitivity in skeletal muscle, and stimulates glucose and lipid metabolism and increases life span in *Caenorhabditis elegans*. *Metabolism* (2016) 65(11):1679-1691.
41. Chalkiadaki A, Guarente L: Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nat Rev Endocrinol* (2012) 8(5):287-96.
42. Luthi-Carter R, Taylor DM, Pallos J, Lambert E, Amore A, Parker A, Moffitt H, Smith DL, Runne H, Gokce O, Kuhn A, Xiang Z, Maxwell MM, Reeves SA, Bates GP, Neri C, Thompson LM, Marsh JL, Kazantsev AG: SIRT2 inhibition achieves neuroprotection by decreasing sterol biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107(17):7927-32.
43. Arora A, Dey CS: SIRT2 negatively regulates insulin resistance in C2C12 skeletal muscle cells. *Biochim Biophys Acta* (2014) 1842(9):1372-8.
44. Roth M, Wang Z, Chen WY: Sirtuins in hematological aging and malignancy. *Crit Rev Oncog* (2013) 18(6):531-47.
45. He W, Newman JC, Wang MZ, Ho L, Verdin E: Mitochondrial sirtuins: regulators of protein acylation and metabolism. *Trends Endocrinol Metab* (2012) 23(9):467-76.
46. Parihar P, Solanki I, Mansuri ML, Parihar MS: Mitochondrial sirtuins: emerging roles in metabolic regulations, energy homeostasis and diseases. *Exp Gerontol* (2015) 61:130-41.
47. Van Meter M, Simon M, Tomblin G, May A, Morello TD, Hubbard BP, Bredbenner K, Park R, Sinclair DA, Bohr VA, Gorbunova V, Seluanov A: JNK Phosphorylates SIRT6 to Stimulate DNA Double-Strand Break Repair in Response to Oxidative Stress by Recruiting PARP1 to DNA Breaks. *Cell Rep* (2016) 16(10):2641-50.
48. Van Meter M, Kashyap M, Rezazadeh S, Geneva AJ, Morello TD, Seluanov A, Gorbunova V: SIRT6 represses LINE1 retrotransposons by ribosylating KAP1 but this repression fails with stress and age. *Nat Commun* (2014) 5:5011.
49. Etchegaray JP, Mostoslavsky R: Interplay between Metabolism and Epigenetics: A Nuclear Adaptation to Environmental Changes. *Mol Cell* (2016) 62(5):695-711.
50. Di Croce L: Chromatin modifying activity of leukaemia associated fusion proteins. *Hum Mol Genet* (2005) 14 Spec No 1:R77-84.
51. Chopra M, Bohlander SK: Disturbing the histone code in leukemia: translocations and mutations affecting histone methyl transferases. *Cancer Genet* (2016) 208(5):192-205.
52. Etchegaray JP, Chavez L, Huang Y, Ross KN, Choi J, Martinez-Pastor B, Walsh RM, Sommer CA, Lienhard M, Gladden A, Kugel S, Silberman DM, Ramaswamy S, Mostoslavsky G, Hochedlinger K, Goren A, Rao A, Mostoslavsky R: The Histone

Deacetylase Sirt6 Controls Embryonic Stem Cell Fate Via Tet-Mediated Production of 5-Hydroxymethylcytosine. *Nat Cell Biol* (2015) 17(5): 545–557.

**53.** Dransfeld CL, Schaich M, Ho AD, Thiede C, Ehninger G, Mahlknecht U: Class I HDAC SNP analysis in healthy donors compared to AML patients. *Leukemia* (2007) 21(7):1587-90.

**54.** Zhou J, Bi C, Chng WJ, Cheong LL, Liu SC, Mahara S, Tay KG, Zeng Q, Li J, Guo K, Tan CP, Yu H, Albert DH, Chen CS: PRL-3, a Metastasis Associated Tyrosine Phosphatase, Is Involved in FLT3-ITD Signaling and Implicated in Anti-AML Therapy. *PLoS One* (2011) 6(5):e19798.

**55.** Wang JC, Kafeel MI, Avezbakiyev B, Chen C, Sun Y, Rathnasabapathy C, Kalavar M, He Z, Burton J, Lichter S: Histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia. *Oncology* (2011) 81(5-6):325-9.

**56.** Jordaan G, Liao W, Sharma S: E-cadherin gene re-expression in chronic lymphocytic leukemia cells by HDAC inhibitors. *BMC Cancer* (2013) 13:88. doi: 10.1186/1471-2407-13-88.

**57.** Popovic R, Shah MY, Licht JD: Epigenetic therapy of hematological malignancies: where are we now? *Ther Adv Hematol* (2013) 4(2):81-91.

**58.** Gruhn B, Naumann T, Gruner D, Walther M, Wittig S, Becker S, Beck JF, Sonnemann J: The expression of histone deacetylase 4 is associated with prednisone poor-response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Rest* (2013) 37(10):1200-7.

**59.** Van Damme M, Crompton E, Meuleman N, Mineur P, Bron D, Lagneaux L, Stamatopoulos B: HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance. *Epigenetics* (2012) 7(12):1403-1412.

**60.** Xu B, On DM, Ma A, Parton T, Konze KD, Pattenden SG, Allison DF, Cai L, Rockowitz S, Liu S, Liu Y, Li F, Vedadi M, Frye SV, Garcia BA, Zheng D, Jin J, Wang GG: Selective inhibition of EZH2 and EZH1 enzymatic activity by a small molecule suppresses MLL-rearranged leukemia. *Blood* (2015) 125(2):346-57.

**61.** Cheung N, Fung TK, Zeisig BB, Holmes K, Rane JK, Mowen KA, Finn MG, Lenhard B, Chan LC, So CW: Targeting Aberrant Epigenetic Networks Mediated by PRMT1 and KDM4C in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell* (2016) 29(1):32-48.

**62.** Feng Z, Yao Y, Zhou C, Chen F, Wu F, Wei L, Liu W, Dong S, Redell M, Mo Q, Song Y: Pharmacological inhibition of LSD1 for the treatment of MLL-rearranged leukemia. *J Hematol Oncol* (2016) 9:24.

**63.** Bartel DP: MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* (2004) 116(2):281-97.

**64.** Starczynowski DT, Morin R, McPherson A, Lam J, Chari R, Wegrzyn J, Kuchenbauer F, Hirst M, Tohyama K, Humphries RK, Lam WL, Marra M, Karsan A: Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations. *Blood* (2011) 117(2):595-607.

**65.** Geiger J, Dalgaard LT: Interplay of mitochondrial metabolism and microRNAs. *Cell Mol Life Sci* (2017) 74(4):631-646.

**66.** Agirre X, Martinez-Climent JA, Otero MD, Prosper F: Epigenetic regulation of miRNA genes in acute leukemia. *Leukemia* (2012) 26(3):395-403.

67. Saito Y, Jones PA: Epigenetic Activation of Tumor Suppressor MicroRNAs in Human Cancer Cells. *Cell Cycle* (2006) 5(19):2220-2.
68. Bernardo BC, Charchar FJ, Lin RCY, McMullen JR: A MicroRNA Guide for Clinicians and Basic Scientists: Background and Experimental Techniques. *Heart Lung Circ* (2011) 21(3):131-42.
69. Manikanda J, Aarthi JJ, Kumar SD, Pushparaj PN: Oncomirs: The potential role of non-coding microRNAs in understanding cancer. *Bioinformatics* (2008) 2(8):330-4.
70. Wiemer EAC: The role of microRNAs in cancer: No small matter. *Eur J Cancer* (2007) 43(10):1529-44.
71. Undi RB, Kandi R, Gutti RK: MicroRNAs as Haematopoiesis Regulators. *Adv Hematol* (2013) 2013:695754. doi: 10.1155/2013/695754.
72. Malumbres M: miRNAs and cancer: An epigenetics view. *Molecular Aspects of Medicine* (2013) 34(4):863-74.
73. Zhu YD, Wang L, Sun C, Fan L, Zhu DX, Fang C, Wang YH, Zou ZJ, Zhang SJ, Li JY, Xu W: Distinctive microRNA signature is associated with the diagnosis and prognosis of acute leukemia. *Med Oncol* (2011) 29(4):2323-31.
74. Dzikiewicz-Krawczyk A, Macieja A, Mały E, Januszkiewicz-Lewandowska D, Mosor M, Fichna M, Strauss E, Nowak J: Polymorphisms in microRNA target sites modulate risk of lymphoblastic and myeloid leukemias and affect microRNA binding. *J Hematol Oncol* (2014) 7:43. doi: 10.1186/1756-8722-7-43.
75. Satoh J, Tabunoki H: Comprehensive analysis of human microRNA target networks. *BioData Min* (2011) 4:17. doi: 10.1186/1756-0381-4-17.
76. Labbaye C, Testa U: The emerging role of MIR-146A in the control of hematopoiesis, immune function and cancer. *J Hematol Oncol* (2012) 5:13. doi: 10.1186/1756-8722-5-13.
77. Iwakiri Y: A role of miR-33 for cell cycle progression and cell proliferation. *Cell Cycle* (2012) 11(6):1057-8.
78. Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, Cha KY, Chung HM, Yoon HS, Moon SY, Kim VN, Kim KS: Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* (2004) 270(2):488-98.
79. Palmero EI, de Campos SG, Campos M, de Souza NC, Guerreiro ID, Carvalho AL, Marques MM: Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression. *Genet Mol Biol* (2011) 34(3):363-70.
80. Havelange V, Garzon R: MicroRNAs: Emerging Key Regulators of Hematopoiesis. *Am J Hematol* (2010) 85(12):935-42.
81. Bhagavathi S, Czader M: MicroRNAs in Benign and Malignant Hematopoiesis. *Arch Pathol Lab Med* (2010) 134(9):1276-81.
82. Marcucci G, Mrózek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD: The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood* (2011) 117(4):1121–1129.
83. Bissels U, Bosio A, Wagner W: MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica* (2012) 97(2):160-7.
84. Khalaj M, Tavakkoli M, Stranahan AW, Park CY: Pathogenic microRNA's in myeloid malignancies. *Front Genet* (2014) 5:361. doi: 10.3389/fgene.2014.00361.

- 85.** Zheng YS, Zhang H, Zhang XJ, Feng DD, Luo XQ, Zeng CW, Lin KY, Zhou H, Qu LH, Zhang P, Chen YQ: MiR-100 regulates cell differentiation and survival by targeting RBSP3, a phosphatase-like tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene* (2012) 31(1):80-92.
- 86.** Cheng J, Guo S, Chen S, Mastriano SJ, Liu C, D'Alessio AC, Hysolli E, Guo Y, Yao H, Megyola CM, Li D, Liu J, Pan W, Roden CA, Zhou XL, Heydari K, Chen J, Park IH, Ding Y, Zhang Y, Lu J: An extensive network of TET2-targeting MicroRNAs regulates malignant hematopoiesis. *Cell Rep* (2013) 5(2):471-81.
- 87.** 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: Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) 99(24):15524-9.
- 88.** Volinia S, Galasso M, Costinean S, Tagliavini L, Gamberoni G, Drusco A, Marchesini J, Mascellani N, Sana ME, Abu Jarour R, Despouts C, Teitell M, Baffa R, Aqeilan R, Iorio MV, Taccioli C, Garzon R, Di Leva G, Fabbri M, Catozzi M, Previati M, Ambis S, Palumbo T, Garofalo M, Veronese A, Bottoni A, Gasparini P, Harris CC, Visone R, Pekarsky Y, de la Chapelle A, Bloomston M, Dillhoff M, Rassenti LZ, Kipps TJ, Huebner K, Pichiorri F, Lenze D, Cairo S, Buendia MA, Pineau P, Dejean A, Zanesi N, Rossi S, Calin GA, Liu CG, Palatini J, Negrini M, Vecchione A, Rosenberg A, Croce CM: Reprogramming of miRNA networks in cancer and leukemia. *Genome Res* (2010) 20(5):589-599.
- 89.** Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR: *Nature* (2005) 435(7043):834-8.
- 90.** Slaby O, Bienertova-Vasku J, Svoboda M, Vyzula R: Genetic polymorphisms and microRNAs: new direction in molecular epidemiology of solid cancer. *J Cell Mol Med* (2012) 16(1):8-21.
- 91.** Mishra PJ, Mishra PJ, Banerjee D, Bertino JR: MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell Cycle* (2008) 7(7):853-8.
- 92.** Wang D, Qiu C, Zhang H, Wang J, Cui Q, Yin Y: Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets. *PLoS One* (2010) 5(9). doi: 10.1371/journal.pone.0013067.
- 93.** Agirre X, Vilas-Zornoza A, Jiménez-Velasco A, Martín-Subero JI, Cordeu L, Gárate L, San José-Eneriz E, Abizanda G, Rodríguez-Otero P, Fortes P, Rifón J, Bandrés E, Calasanz MJ, Martín V, Heiniger A, Torres A, Siebert R, Román-Gomez J, Prósper F: Epigenetic Silencing of the Tumor Suppressor MicroRNA Hsa-miR-124a Regulates CDK6 Expression and Confers a Poor Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res* (2009) 69(10):4443-53.
- 94.** Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T, Flomenberg N, Marcucci G, Calin GA, Kornblau SM, Kantarjian H, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM: MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* (2008) 111(6):3183-9.
- 95.** Bousquet M, Lodish HF: MicroRNAs: the primary cause or a determinant of progression in leukemia? *Expert Rev Hematol* (2011) 4(2):121-123.

- 96.** Marcucci G, Mrózek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD: The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood* (2011) 117(4):1121-9.
- 97.** Zhang H, Luo XQ, Zhang P, Huang LB, Zheng YS, Wu J, Zhou H, Qu LH, Xu L, Chen YQ: MicroRNA Patterns Associated with Clinical Prognostic Parameters and CNS Relapse Prediction in Pediatric Acute Leukemia. *PLoS One* (2009) 4(11):e7826. doi: 10.1371/journal.pone.0007826.
- 98.** Jongen-Lavrencic M, Sun SM, Dijkstra MK, Valk PJM, Löwenberg B: MicroRNA expression profiling in relation to the genetic heterogeneity of acute myeloid leukemia. *Blood* (2012) 111(10):5078-85.
- 99.** Babashah S, Sadeghizadeh M, Tavirani MR, Farivar S, Soleimani M: Aberrant microRNA expression and its implications in the pathogenesis of leukemias. *Cell Onkol* (2012) 35(5): 317-334.
- 100.** Lopez-Serra P, Esteller M: DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene* (2011) 31(13):1609-22.
- 101.** Cottrill KA, Chan SY, Loscalzo J: Hypoxamirs and mitochondrial metabolism. *Antioxid Redox Signal* (2014) 21(8):1189-201.
- 102.** Butrym A, Rybka J, Baczyńska D, Poręba R, Kuliczkowski K, Mazur G: Clinical response to azacitidine therapy depends on microRNA-29c (miR-29c) expression in older acute myeloid leukemia (AML) patients. *Oncotarget* (2016) 7(21):30250-7.
- 103.** Shivarov V, Stoimenov A, Spassov B, Angelova S, Niagolov M, Ivanova M: Patient-specific microRNA expression profiles as a marker for minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Hematology* (2014) 19(1):18-21.
- 104.** Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, Wang Y, Qian Z, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Le Beau MM, Larson RA, Golub TR, Rowley JD, Chen J: MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007) 104(50):19971-6.
- 105.** de Leeuw DC, van den Ancker W, Denkers F, de Menezes RX, Westers TM, Ossenkoppele GJ, van de Loosdrecht AA, Smit L: MicroRNA profiling can classify acute leukemias of ambiguous lineage as either acute myeloid leukemia or acute lymphoid leukemia. *Clin Cancer Res* (2013) 19(8):2187-96.
- 106.** Schwind S, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Holland KB, Margeson D, Whitman SP, Hickey C, Becker H, Metzeler KH, Paschka P, Baldus CD, Liu S, Garzon R, Powell BL, Kolitz JE, Carroll AJ, Caligiuri MA, Larson RA, Marcucci G, Bloomfield CD: Prognostic Significance of Expression of a Single MicroRNA, miR-181a, in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol* (2010) 28(36):5257-64.
- 107.** Zhang H, Chen Y: New insight into the role of miRNAs in leukemia. *Sci China C Life Sci* (2009) 52(3):224-31.
- 108.** Mian YA, Zeleznik-Le NJ: MicroRNAs in leukemias: emerging diagnostic tools and therapeutic targets. *Curr Drug Targets* (2010) 11(7):801-11.
- 109.** Li H, Yang BB: Friend or foe: the role of microRNA in chemotherapy resistance. *Acta Pharmacol Sin* (2013) 34(7):870-9.

- 110.** Schotte D, De Menezes RX, Akbari Moqadam F, Khankahdani LM, Lange-Turenhout E, Chen C, Pieters R, Den Boer ML: MicroRNA characterize genetic diversity and drug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* (2011) 96(5):703-11.
- 111.** Han BW, Feng DD, Li ZG, Luo XQ, Zhang H, Li XJ, Zhang XJ, Zheng LL, Zeng CW, Lin KY, Zhang P, Xu L, Chen YQ: A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Hum Mol Genet* (2011) 20(24):4903-15.
- 112.** Burke MJ, Bhatla T: Epigenetic modifications in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Front Pediatr* (2014) 2:42. doi: 10.3389/fped.2014.00042.
- 113.** Nikitina EG, Urazova LN, Stegny VN: MicroRNAs and human cancer. *Exp Oncol* (2012) 34(1):2-8.
- 114.** de Planell-Saguer M, Rodicio MC: Analytical aspects of microRNA in diagnostics: A review. *Anal Chim Acta* (2011) 699(2):134-52.
- 115.** Esau CC, Monia BP: Therapeutic potential for microRNAs. *Adv Drug Deliv Rev* (2007) 59(2-3):101-14.
- 116.** Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H, Li Y, Shi J, An W, Hancock SM, He F, Qin L, Chin J, Yang P, Chen X, Lei Q, Xiong Y, Guan KL: Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* (2010) 327(5968):1000-4.
- 117.** Yun J, Johnson JL, Hanigan CL, Locasale JW: Interactions between epigenetics and metabolism in cancers. *Front Oncol* (2012) 2:163. doi: 10.3389/fonc.2012.00163.
- 118.** Boukouris AE, Zervopoulos SD, Michelakis ED: Metabolic Enzymes Moonlighting in the Nucleus: Metabolic Regulation of Gene Transcription. *Trends Biochem Sci* (2016) 41(8):712-30.
- 119.** Sebastián C, Zwaans BM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, Ram O, Truelove J, Guimaraes AR, Toiber D, Cosentino C, Greenson JK, MacDonald AI, McGlynn L, Maxwell F, Edwards J, Giacosa S, Guccione E, Weissleder R, Bernstein BE, Regev A, Shiels PG, Lombard DB, Mostoslavsky R: The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell* (2012) 151(6):1185-99.
- 120.** Chen L, Shi Y, Liu S, Cao Y, Wang X, Tao Y: PKM2: the thread linking energy metabolism reprogramming with epigenetics in cancer. *Int J Mol Sci* (2014) 15(7):11435-45.
- 121.** Hanahan D, Weinberg RA: The Hallmarks of Cancer. *Cell* (2000) 100(1):57-70.
- 122.** Jin LH, Wei C: Role of microRNAs in the Warburg effect and mitochondrial metabolism in cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* (2014) 15(17):7015-9.
- 123.** Gao P, Sun L, He X, Cao Y, Zhang H: MicroRNAs and the Warburg Effect: new players in an old arena. *Curr Gene Ther* (2012) 12(4):285-91.
- 124.** Koppenol WH, Bounds PL, Dang CV: Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* (2011) 11(5):325-37.
- 125.** Mushtaq M, Darekar S, Klein G, Kashuba E: Different Mechanisms of Regulation of the Warburg Effect in Lymphoblastoid and Burkitt Lymphoma Cells. *PLoS One* (2015) 10(8):e0136142.
- 126.** Zhong L, Mostoslavsky R: SIRT6: a master epigenetic gatekeeper of glucose metabolism. *Transcription* (2010) 1(1):17-21.

- 127.** Lee M, Yoon JH: Metabolic interplay between glycolysis and mitochondrial oxidation: The reverse Warburg effect and its therapeutic implication. *World J Biol Chem* (2015) 6(3):148-61.
- 128.** Claudino WM, Dias A, Tse W, Sharma VR: Type B lactic acidosis: a rare but life threatening hematologic emergency. A case illustration and brief review. *Am J Blood Res* (2015) 5(1):25-9.
- 129.** Jiang W, Min J, Sui X, Qian Y, Liu Y, Liu Z, Zhou H, Li X, Gong Y: MicroRNA-26a-5p and microRNA-23b-3p up-regulate peroxiredoxin III in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. (2015) 56(2):460-71.
- 130.** Mastrangelo D, Massai L, Lo Coco F, Noguera NI, Borgia L, Fioritoni G, Berardi A, Iacone A, Muscettola M, Pelosi E, Castelli G, Testa U, Di Pisa F, Grasso G: Cytotoxic effects of high concentrations of sodium ascorbate on human myeloid cell lines. *Ann Hematol* (2015) 94(11):1807-16.
- 131.** Vander Heiden MG, Lunt SY, Dayton TL, Fiske BP, Israelsen WJ, Mattaini KR, Vokes NI, Stephanopoulos G, Cantley LC, Metallo CM, Locasale JW: Metabolic pathway alterations that support cell proliferation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* (2011) 76:325-34.
- 132.** Goto M, Miwa H, Shikami M, Tsunekawa-Imai N, Suganuma K, Mizuno S, Takahashi M, Mizutani M, Hanamura I, Nitta M: Importance of glutamine metabolism in leukemia cells by energy production through TCA cycle and by redox homeostasis. *Cancer Invest* (2014) 32(6):241-7.
- 133.** Yang W, Xia Y, Hawke D, Li X, Liang J, Xing D, Aldape K, Hunter T, Alfred Yung WK, Lu Z: PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell* (2012) 150(4):685-96.
- 134.** Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E: Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase. *Cancer Cell* (2005) 7(1):77-85.
- 135.** Garcia-Heredia JM, Carnero A: Decoding Warburg's hypothesis: tumor-related mutations in the mitochondrial respiratory chain. *Oncotarget* (2015) 6(39):41582-99.
- 136.** Suganuma K, Miwa H, Imai N, Shikami M, Gotou M, Goto M, Mizuno S, Takahashi M, Yamamoto H, Hiramatsu A, Wakabayashi M, Watarai M, Hanamura I, Imamura A, Mihara H, Nitta M: Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leuk Lymphoma* (2010) 51(11):2112-9.
- 137.** Wong KY, So CC, Loong F, Chung LP, Lam WW, Liang R, Li GK, Jin DY, Chim CS: Epigenetic Inactivation of the miR-124-1 in Haematological Malignancies. *PLoS One* (2010) 6(4):e19027.
- 138.** Sampath D, Liu C, Vasan K, Sulda M, Puduvali VK, Wierda WG, Keating MJ: Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16a, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* (2012) 119(5):1162-1172.
- 139.** Tian X, Xu Y, Yin J, Tian H, Chen S, Wu D, Sun A: TET2 gene mutation is unfavorable prognostic factor in cytogenetically normal acute myeloid leukemia patients with NPM1+ and FLT3-ITD - mutations. *Int J Hematol* (2014) 100(1):96-104.
- 140.** Chan SM, Majeti R: Role of DNMT3A, TET2, and IDH1/2 mutations in pre-leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* (2013) 98(6):648-57.

- 141.** Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, Chen W: IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol* (2012) 43(10):1541-51.
- 142.** Nguyen AT, Taranova O, He J, Zhang Y: DOT1L, the H3K79 methyltransferase, is required for MLL-AF9-mediated leukemogenesis. *Blood* (2011) 117(25):6912-22.
- 143.** Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, Starnes LM, Mancini M, Travaglini L, Diverio D, Ammatuna E, Cimino G, Lo-Coco F, Grignani F, Nervi C: Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell* (2007) 12(5):457-66.
- 144.** Cea M, Soncini D, Fruscione F, Raffaghello L, Garuti A, Emionite L, Moran E, Magnone M, Zoppoli G, Reverberi D, Caffa I, Salis A, Cagnetta A, Bergamaschi M, Casciaro S, Pierri I, Damonte G, Ansaldo F, Gobbi M, Pistoia V, Ballestrero A, Patrone F, Bruzzone S, Nencioni A: Synergistic interactions between HDAC and sirtuin inhibitors in human leukemia cells. *PLoS One* (2011) 6(7):e22739.
- 145.** Tran HT, Kim HN, Lee IK, Nguyen-Pham TN, Ahn JS, Kim YK, Lee JJ, Park KS, Kook H, Kim HJ: Improved therapeutic effect against leukemia by a combination of the histone methyltransferase inhibitor chaetocin and the histone deacetylase inhibitor trichostatin A. *J Korean Med Sci* (2013) 28(2):237-246.
- 146.** Novotny-Diermayr V, Hart S, Goh KC, Cheong A, Ong LC, Hentze H, Pasha MK, Jayaraman R, Ethirajulu K, Wood JM: The oral HDAC inhibitor pracinostat (SB939) is efficacious and synergistic with the JAK2 inhibitor pacritinib (SB1518) in preclinical models of AML. *Blood Cancer J* (2012) 2(5):e69. doi: 10.1038/bcj.2012.14.
- 147.** Bhaskara S, Knutson SK, Jiang G, Chandrasekharan MB, Wilson AJ, Zheng S, Yenamandra A, Locke K, Yuan JL, Bonine-Summers AR, Wells CE, Kaiser JF, Washington MK, Zhao Z, Wagner FF, Sun ZW, Xia F, Holson EB, Khabele D, Hiebert SW: Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability. *Cancer Cell* (2011) 18(5): 436–447.
- 148.** Oike T, Ogiwara H, Amornwichee N, Nakano T, Kohno T: Chromatin-regulating proteins as targets for cancer therapy. *J Radiat Res* (2014) 55(4):613-28.
- 149.** Brase JC, Wuttig D, Kuner R, Sultmann H: Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* (2010) 9:306. doi: 10.1186/1476-4598-9-306.
- 150.** Tran Q, Lee H, Park J, Kim SH, Park J: Targeting Cancer Metabolism - Revisiting the Warburg Effects. *Toxicol Res* (2016) 32(3):177-93.
- 151.** Akers LJ, Fang W, Levy AG, Franklin AR, Huang P, Zweidler-McKay PA: Targeting glycolysis in leukemia: a novel inhibitor 3-BrOP in combination with rapamycin. *Leuk Res* (2011) 35(6):814-20.
- 152.** Allegra A, Innao V, Gerace D, Bianco O, Musolino C: The metabolomic signature of hematologic malignancies. *Leuk Res* (2016) 49:22-35.
- 153.** Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA: MicroRNAs in body fluids-the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* (2011) 8(8):467-77.
- 154.** Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW: The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* (2016) 127(20):2391-405.

- 155.** Akao Y, Iio A, Itoh T, Noguchi S, Itoh Y, Ohtsuki Y, Naoe T: Microvesicle-mediated RNA Molecule Delivery System Using Monocytes/Macrophages. *Mol Ther* (2011) 19(2):395-9.
- 156.** Mosakhani N, Sarhadi VK, Usvasalo A, Karjalainen-Lindsberg ML, Lahti L, Tuononen, Saarinen-Pihkala UM, Knuutila S: MicroRNA profiling in pediatric acute lymphoblastic leukemia: novel prognostic tools. *Leuk Lymphoma* (2012) 53(12):2517-20.
- 157.** Kang K, Peng X, Luo J, Gou D: Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. *J Anim Sci Biotechnol* (2012) 3(1):4.
- 158.** Gao SM, Xing CY, Chen CQ, Lin SS, Dong PH, Yu FJ: MiR-15a and miR-16-1 inhibit the proliferation of leukemic cells by down-regulating WT1 protein level. *J Exp Clin Cancer Res* (2011) 30:110. doi: 10.1186/1756-9966-30-110.
- 159.** Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, Nicoloso MS, Dimitri F, Sampath D, Fabbri M, Lerner S, Barron LL, Rassenti LZ, Jiang L, Xiao L, Hu J, Secchiero P, Zauli G, Volinia S, Negrini M, Wierda W, Kipps TJ, Plunkett W, Coombes KR, Abruzzo LV, Keating MJ, Calin GA: MicroRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood* (2010) 116(6):945-52.
- 160.** Chen B, Liu Y, Jin X, Lu W, Liu J, Xia Z, Yuan Q, Zhao X, Xu N, Liang S: MicroRNA-26a regulates glucose metabolism by direct targeting PDHX in colorectal cancer cells. *BMC Cancer* (2014) 14:443. doi: 10.1186/1471-2407-14-443.
- 161.** Czimmerer Z, Hulvely J, Simandi Z, Varallyay E, Havelda Z, Szabo E, Varga A, Dezso B, Balogh M, Horvath A, Domokos B, Torok Z, Nagy L, Balint BL: A versatile method to design stem-loop primer-based quantitative PCR assays for detecting small regulatory RNA molecules. *PLoS One* (2013) 8(1):e55168.
- 162.** Niegisch G, Knievel J, Koch A, Hader C, Fischer U, Albers P, Schulz WA: Changes in histone deacetylase (HDAC) expression patterns and activity of HDAC inhibitors in urothelial cancers. *Urol Oncol* (2013) 31(8):1770-9.
- 163.** Shen YF, Wei AM, Kou Q, Zhu QY, Zhang L: Histone deacetylase 4 increases progressive epithelial ovarian cancer cells via repression of p21 on fibrillar collagen matrices. *Oncol Rep* (2016) 35(2):948-54.
- 164.** Kang ZH, Wang CY, Zhang WL, Zhang JT, Yuan CH, Zhao PW, Lin YY, Hong S, Li CY, Wang L: Histone deacetylase HDAC4 promotes gastric cancer SGC-7901 cells progression via p21 repression. *PLoS One* (2014) 9(6):e98894.
- 165.** Wilson AJ, Byun DS, Nasser S, Murray LB, Ayyanar K, Arango D, Figueroa M, Melnick A, Kao GD, Augenlicht LH, Mariadason JM: HDAC4 promotes growth of colon cancer cells via repression of p21. *Mol Biol Cell* (2008) 19(10):4062-75.
- 166.** Jens U, Marquardt, Kerstin Fischer, Katharina Baus, Anubha Kashyap, Shengyun Ma, Markus Krupp, Matthias Linke, Andreas Teufel, Ulrich Zechner, Dennis Strand, Snorri S. Thorgeirsson, Peter R. Galle, Susanne Strand: SIRT6 dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in HCC patients. *Hepatology* (2013) 58(3): 1054–1064.
- 167.** Sociali G, Galeno L, Parenti MD, Grozio A, Bauer I, Passalacqua M, Boero S, Donadini A, Millo E, Bellotti M, Sturla L, Damonte P, Puddu A, Ferroni C, Varchi G, Franceschi C, Ballestrero A, Poggi A, Bruzzone S, Nencioni A, Del Rio A: Quinazolinone SIRT6 inhibitors sensitize cancer cells to chemotherapeutics. *Eur J Med Chem* (2015) 102:530-9.

- 168.** Yu SL, Lee DC, Son JW, Park CG, Lee HY, Kang J: Histone deacetylase 4 mediates SMAD family member 4 deacetylation and induces 5-fluorouracil resistance in breast cancer cells. *Oncol Rep* (2013) 30(3):1293-300.
- 169.** Azuma Y, Yokobori T, Mogi A, Altan B, Yajima T, Kosaka T, Onozato R, Yamaki E, Asao T, Nishiyama M, Kuwano H: SIRT6 expression is associated with poor prognosis and chemosensitivity in patients with non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* (2015) 112(2):231-7.
- 170.** Zhang YJ, Lu CR, Cao Y, Luo Y, Bao RF, Yan S, Xue M, Zhu F, Wang Z, Duan LN: Imatinib induces H2AX phosphorylation and apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells in vitro via caspase-3/Mst1 pathway. *Acta Pharmacol Sin* (2012) 33(4):551-557.
- 171.** Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Udaka K, Yokoyama A: Imatinib causes epigenetic alterations of PTEN gene via upregulation of DNA methyltransferases and polycomb group proteins. *Blood Cancer J* (2011) 1(12):e48.

## 12. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI EGYETEM**  
**EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**



Nyilvántartási szám: DEENK/93/2017.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Gaál Zsuzsanna  
Neptun kód: JHJSK8  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

### A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Gaál, Z.**, Oláh, É., Rejtő, L., Bálint, B. L., Csernoch, L.: Expression Levels of Warburg-Effect Related microRNAs Correlate with each Other and that of Histone Deacetylase Enzymes in Adult Hematological Malignancies with Emphasis on Acute Myeloid Leukemia.  
*Pathol. Oncol. Res.* 23 (1), 207-216, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-016-0151-9>  
IF: 1.94 (2015)
2. **Gaál, Z.**, Oláh, É., Rejtő, L., Erdődi, F., Csernoch, L.: Strong Correlation between the Expression Levels of HDAC4 and SIRT6 in Hematological Malignancies of the Adults.  
*Pathol. Oncol. Res.* [Epub ahead of print], 2016.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12253-016-0139-5>  
IF: 1.94 (2015)



Cím: 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. ☎ Postacím: 4010 Debrecen, Pf. 39. ☎ Tel.: (52) 410-443  
E-mail: [publikaciok@lib.unideb.hu](mailto:publikaciok@lib.unideb.hu) ☎ Honlap: [www.lib.unideb.hu](http://www.lib.unideb.hu)



### További közlemények

3. Raskó, I., Oláh, É., **Gaál, Z.**: A karcinogenezis genetikája.  
In: Klinikai genetika. Szerk.: Oláh Éva, Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 353-382, 2015.
4. Vincze, J., Jenés, Á., Fűzi, M., Almássy, J., Németh, R., Szigeti, G., Dienes, B., **Gaál, Z.**, Szentesi, P., Jóna, I., Kertai, P., Paragh, G., Csernoch, L.: Effects of fluvastatin and coenzyme Q10 on skeletal muscle in normo- and hypercholesterolaemic rats.  
*J. Muscle Res. Cell Motil.* 36 (3), 263-274, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10974-015-9413-5>  
IF: 2.071
5. **Gaál, Z.**, Oláh, É.: Epigenetikai szabályozó mechanizmusok és zavarai leukémiában.  
*Magyar Onkol.* 58 (2), 99-107, 2014.
6. **Gaál, Z.**, Oláh, É.: Mikro-RNS-ek és szerepük hematológiai malignus betegségekben.  
*Orvosi Hetilap.* 153 (52), 2051-2059, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/OH.2012.29511>

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora: 5,951**

**A közlő folyóiratok összesített impact faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 3,88**

A DEENK a Jelölt által az IDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2017.04.11.



## **Előadások**

- (1) HMAA Füred 2012 (Balatonfüred, 2012. augusztus 18-19.) Zsuzsanna Gaál, Andrea Kiss, Dóra Dedinszki, Ferenc Erdődi: Influence of Protein phosphatase-1 inhibitory proteins on the dephosphorylation of retinoblastoma protein
- (2) European Medical Students' Conference (Debrecen, 2012. október 19-22.) Zsuzsanna Gaál, Andrea Kiss, Dóra Dedinszki, Ferenc Erdődi: Influence of Protein phosphatase-1 inhibitory proteins on the dephosphorylation of retinoblastoma protein
- (3) HMAA Füred 2013 (Balatonfüred, 2013. augusztus 16-17.) Zsuzsanna Gaál: Expression and phosphorylation of LIM-kinase in cancer cells
- (4) HMAA Füred 2013 (Balatonfüred, 2013. augusztus 16-17.) Zsuzsanna Gaál: MicroRNAs: regulation of gene expression in carcinogenesis, clinical applications in haematological malignant diseases
- (5) XIX. Korányi Frigyes Tudományos Fórum (Budapest, 2014. március 6-7.) Gaál Zsuzsanna: Mikro-RNS profil vizsgálata akut leukémiában szenvedő betegekben és kontroll sejtvonalakon
- (6) Magyar Humán genetikai Társaság X. jubileumi Kongresszusa (Budapest, 2014. szeptember 4-6.) Gaál Zsuzsanna, Bálint Bálint László, Rejtő László, Oláh Éva: Mikro-RNS profil vizsgálata akut leukémiában szenvedő felnőtt betegekben és kontroll sejtvonalakon
- (7) Astellas Ifjú Kutató Szimpózium (Pécs, 2014. szeptember 24.) Gaál Zsuzsanna: Epigenetikai és genetikai tényezők szerepe hematológiai malignus betegségekben
- (8) Mikro-RNS interdiszciplináris fórum (Debrecen, 2015. január 20-21.): Gaál Zsuzsanna: Mikro-RNS-ek leukémiában és anyagcsere-útvonalak szabályozásában
- (9) 45. Mozsásbiológiai Konferencia (Debrecen, 2015. április 16-17.): Mokánszki Attila, Gaál Zsuzsanna, Fodor János, Balatoni Ildikó, Bálint Bálint László, Csernoch László: Epigenetikai szabályozó mechanizmusok sportélettani szerepe
- (10) Magyar Hematológiai és Transzfuziológiai Társaság XXV. Kongresszusa (Budapest, 2015. május 14-16.): Gaál Zsuzsanna, Oláh Éva, Csernoch László, Rejtő László, Erdődi Ferenc, Bálint Bálint László: Mikro-RNS-ek expressziós szintjének vizsgálata felnőttkori akut mieloid leukémiában
- (11) DOSZ Tavaszi Szél Konferencia (Budapest, 2016. április 15-16.): Gaál Zsuzsanna: Mikro-RNS profil vizsgálata akut leukémiában szenvedő betegekben és kontroll sejtvonalakon

(12) 40 éves a Gyermekegészségügyi Központ Miskolcon (2016. október 14-15.): Gaál Zsuzsanna, Berkes Andrea, Bene Zsolt: A CF korai felismerésének jelentősége egy esetünk kapcsán

(13) Magyar Hematológiai és Transzfuziológiai Társaság XXV. Kongresszusa (Szeged, 2017. május 18-20.): Gaál Zsuzsanna, Oláh Éva, Rejtő László, Bálint Bálint László, Erdődi Ferenc, Csernoch László: Hiszton deacetiláz enzimek és mikro-RNS-ek expressziós szintjének vizsgálata felnőttkori hematológiai malignus betegségekben

## **Poszterek**

- (1) FAME 2011 (Pécs, 2011. június 8-11.) Antal Zs., Pinho O. R., Gaál Zs., Safronov B., Antal M., Szűcs P.: Projection neurons with distinct axon trajectories in the lateral spinal nucleus and lamina I of the lumbar spinal dorsal horn of rats
- (2) Europhosphatases 2011 (Baden, 2011. július 18-23.) Andrea Kiss, Dóra Dedinszki, Zsuzsanna Gaál, Ferenc Erdődi: Identification of LIM-kinase as a novel PP1 inhibitor
- (3) Bridges in Life Sciences 7th Annual Conference (Budapest, 2012. március 30. - április 1.) Gaál Zs., Kiss A., Dedinszki D., Erdődi F.: PP1 dephosphorylates the retinoblastoma protein
- (4) 1st Hungarian Epigenetic Meeting (Budapest, 2012. szeptember 20-21.) Zsuzsanna Gaál, Éva Oláh: MicroRNAs: biogenesis, regulation of gene expression in carcinogenesis, clinical applications
- (5) Magyar Hematológiai és Transzfuziológiai Társaság XXIV. Kongresszusa (Debrecen, 2013. május 23-25.) Gaál Zsuzsanna, Oláh Éva: Mikro-RNS profil vizsgálatának diagnosztikai és prognosztikai értéke akut leukémiában
- (6) 44. Membrán-Transzport Konferencia (Sümege, 2014. május 20-23.) Gaál Zsuzsanna, Vincze János, Cseri Karolina, Almássy János, Csernoch László: Különböző statinok vázizomsejtek kalciumhomeosztázisára kifejtett hatásai
- (7) Danube Scientific Conferences on Epigenetics (Budapest, 2014. november 19-21.) Zsuzsanna Gaál, Attila Mokánszki, János Fodor, Ildikó Balatoni, László Csernoch: Role of epigenetic regulatory mechanisms in sport physiology
- (8) II. Sürgősségi Orvostani Fórum (Debrecen, 2016. május 13-14.) Gaál Zsuzsanna, Berkes Andrea, Bene Zsolt, Juhász Éva: Súlyos bronchiolitises epizódot követően manifesztálódó cisztikus fibrózis
- (9) 2nd Danube Conference on Epigenetics (Budapest, 2016. október 5-8.): Zsuzsanna Gaál, Éva Oláh, László Rejtő, Bálint László Bálint, László Csernoch: Expression levels of Warburg-effect related microRNAs in hematological malignancies of the adults

### **13. Tárgyszavak**

hematológiai malignus betegségek, akut mieloid leukémia, hemopoézis, epigenetika, DNS-metiláció, DNS-hidroximetiláció, hisztonkód, hiszton deacetiláz enzimek, sirtuinok, mikro-RNS-ek, metabolizmus, Warburg effektus, célzott terápia

### **Keywords**

hematological malignant diseases, acute myeloid leukemia, hemopoiesis, epigenetics, DNA-methylation, DNA-hydroxymethylation, histone code, histone deacetylase enzymes, sirtuins, microRNAs, metabolism, Warburg effect, targeted therapy

#### 14. **Önálló munka jegyzéke**

Munkám során minden vizsgálati lépést önállóan végeztem el, valamennyi betegminta esetén.

Az egyes munkafolyamatok az alábbiak voltak:

- a vizsgálati panel és a kutatási terv összeállítása
- az etikai engedély tervezetének elkészítése
- a betegek klinikai adatainak összegyűjtése
- a csontvelő minták előkészítése Western blot analízishez és RNS-izoláláshoz
- az alkalmazott primerek szekvenciájának megtervezése
- Western blot analízis
- denzitometria
- RNS-izolálás
- az izolált RNS koncentrációjának meghatározása
- reverz transzkripció és kvantitatív polimeráz láncreakció
- a qPCR adatok kiértékelése
- statisztikai analízis
- a disszertáció alapjául szolgáló közlemények teljes terjedelmének megírása

## 15. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Csernoch László Intézetigazgató, Rektorhelyettes Úrnak, hogy a kutatómunkához szükséges feltételeket számomra biztosította.

Köszönöm Prof. Dr. Balla György Intézetigazgató, Akadémikus Úrnak a disszertáció megírásához nyújtott hasznos tanácsokat, továbbá hogy a PhD képzést levelező tagozaton, a Gyermekklinika közösségéhez tartozva, csecsemő- és gyermekgyógyász központi gyakornokként fejezhettem be.

Köszönöm Dr. Rejtő László Tanár úrnak, hogy a kísérletek elvégzéséhez nélkülözhetetlen betegmintákat a kutatómunka kezdetétől fogva rendelkezésemre bocsátotta.

Köszönöm Prof. Dr. Oláh Éva és Prof. Dr. Erdődi Ferenc professzoroknak, valamint Dr. Bálint Bálint László Adjunktus Úrnak, hogy volt tudományos diákköri témavezetőimként támogattak a hallgatóként megkezdett kutatómunka során, és a kísérletek elvégzéséhez szükséges laboratóriumi háttérrel az Orvosi Vegytani Intézetben és a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Klinikai Genomikai és Személyre Szabott Orvoslási Központjában számomra biztosították.

Köszönöm az Orvosi Vegytani Intézet Jelátviteli Laboratórium, valamint a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet Klinikai Genomikai és Személyre Szabott Orvoslási Központ jelenlegi és volt munkatársainak, legfőképpen Dedinszki Dórának és Kerekes Tamásnak, hogy a kutatómunkám során alkalmazott molekuláris biológiai módszerek elsajátításában önzetlenül a segítségemre voltak.