Ocena metylacji wybranych genów w nieczynnych hormonalnie gruczolakach przysadki – weryfikacja doniesień literaturowych

Evaluation of selected genes' methylation in nonfunctioning pituitary adenomas – verification of literature report

Paulina Kober[1]
Mateusz Bujko[1]
Krzysztof Goryca[2]
Maria Maksymowicz[3]
Jacek Kunicki[4]
Wiesław Bonicki[4]
Janusz A. Siedlecki[1]

[1]Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
[2]Zakład Genetyki, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
[3]Zakład Patologii i Diagnostyki Laboratoryjnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie
[4]Klinika Nowotworów Układu Nerwowego, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie

Naukowa Fundacja Polpharmy przyznała w 2014 roku zespołowi pracującemu pod kierunkiem dr n. med. Pauliny Kober grant na realizację projektu badawczego pt. „Identyfikacja zaburzeń metylacji DNA u chorych na nieczynne funkcjonalnie gruczolaki przysadki i ocena ich wartości prognostycznej".

Streszczenie

Gruczolaki przysadki są jednymi z najczęstszych nowotworów śródczaszkowych. We wcześniejszych badaniach wykazano, że zaburzenia epigenetyczne, tj. nieprawidłowy wzór metylacji DNA w obrębie regionów regulatorowych określonych genów, odgrywają istotną rolę w patogenezie nieczynnych hormonalnie gruczolaków przysadki (NFPA).

W niniejszej pracy, wykorzystując dane z profilowania wzoru metylacji DNA w technologii mikromacierzy Infinium Human Methylation450 (Illumina), poddano analizie występowanie metylacji DNA w regionach regulatorowych wybranych 16 genów, w których zgodnie z opublikowanymi wcześniej wynikami często dochodzi do nieprawidłowej metylacji DNA w gruczolakach.

Oceniano różnice w poziomie metylacji DNA pomiędzy utkaniem gruczolaka i prawidłową przysadką oraz częstość występowania podwyższonej metylacji DNA poszczególnych regionów na podstawie danych eksperymentalnych dla 41 chorych oraz 6 wycinków prawidłowej tkanki.

Spośród 16 analizowanych genów w przypadku 7 potwierdzono znamiennie wyższy poziom metylacji DNA w NFPA: *LGALS3*, *MMP14*, *NDRG2*, *RASSF1A*, *THBS1*, *TIMP3* i *TP73*. Wyniki naszych oznaczeń potwierdzają jednocześnie częste występowanie hipermetylacji DNA w tych genach u chorych. Największe rozbieżności między naszymi wynikami a danymi publikowanymi wcześniej dotyczą statusu metylacji genów *CDH1*, *GADD45G*, *GSTP1* oraz *P16*. Uzyskane przez nas wyniki wskazują, inaczej niż dostępne dane literaturowe, że metylacja promotorów tych genów występuje jedynie w niewielkim odsetku chorych na NFPA. W opracowaniu poddano dyskusji możliwe przyczyny tych rozbieżności ze szczególnym uwzględnieniem różnic w stosowanych technikach laboratoryjnych, które w istotny sposób mogą determinować jakość i wiarygodność wyników oznaczeń metylacji DNA.

Wpłynęło: 10-03-2017
Zaakceptowano: 20-03-2017
Opublikowano: 09-06-2017

Adres do korespondencji
dr n. med. Paulina Kober
Zakład Onkologii Molekularnej i Translacyjnej, Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Skłodowskiej-Curie
ul. Wawelska 15B, 02-034 Warszawa
tel.: +48 22 546 28 98
e-mail: paulina.kober@gmail.com

Słowa kluczowe: nieczynne hormonalnie gruczolaki przysadki • metylacja DNA • reakcja PCR specyficzna względem metylowanej sekwencji • mikromacierz

Abstract

Pituitary adenomas are among the most common intracranial tumors. Previous studies have shown that epigenetic disorders, i.e. abnormal DNA methylation pattern within regulatory regions of specific genes play an important role in the pathogenesis of nonfunctioning pituitary adenomas (NFPA).

In this article, using data from DNA methylation profiling with Infinium HumanMethylation450 (Illumina) microarray technology, we analyzed the DNA methylation pattern in the regulatory regions of selected 16 genes, in which, according to previously published results, abnormal methylation of DNA is present in adenomas.

The differences in DNA methylation between pituitary adenoma and normal pituitary and the frequency of increased DNA methylation in individual regions were assessed based on experimental data for 41 patients and 6 normal tissue sections.

In case of 7 out of 16 analyzed genes, significantly higher levels of DNA methylation were detected in NFPA: *LGALS3*, *MMP14*, *NDRG2*, *RASSF1A*, *THBS1*, *TIMP3* and *TP73*. Our results confirm also the frequent occurrence of DNA hypermethylation in these genes in patients. The greatest discrepancies between our results and previously published data concern the methylation status of *CDH1*, *GADD45G*, *GSTP1* and *P16* genes. The obtained results show, unlike in the available literature, that the promoter methylation of these genes occurs only in a small proportion of the NFPA patients. The possible causes of these discrepancies were discussed, with particular emphasis on the differences in laboratory techniques that can determine the quality and reliability of DNA methylation assays.

Key words: nonfunctioning pituitary adenomas • DNA methylation • methylation-specific PCR • microarray

WSTĘP

Pod względem klinicznym gruczolaki przysadki dzieli się na dwie główne grupy: guzy czynne hormonalnie, wydzielające w nadmiarze hormony i powodujące zespoły endokrynologiczne, oraz nieczynne hormonalnie gruczolaki przysadki (ang. nonfunctioning pituitary adenoma, NFPA). Są to łagodne nowotwory, które występują w populacji dość często [1, 2]. Nie wydzielając nadmiaru hormonów, NFPA przez pewien czas pozostają bezobjawowe. Dopiero po osiągnięciu znacznych rozmiarów zaczynają powodować wystąpienie objawów neurologicznych, których przyczyną jest zwykle ucisk guza na sąsiadujące z nim struktury mózgu, np. skrzyżowanie nerwów wzrokowych [3, 4]. Dlatego nowotwory te są rozpoznawane dość późno, często gdy osiągają rozmiary makrogruczolaka, tj. powyżej 10 mm średnicy [3].

NFPA nadal pozostają słabo zdefiniowane pod względem molekularnym. Mimo wielu prób udało się zidentyfikować tylko nieliczne somatyczne mutacje punktowe występujące w tych nowotworach. Co więcej, okazało się, że wzór tych mutacji nie jest powtarzalny w poszczególnych przypad-

kach NFPA [5]. Poszukiwanie innych zmian molekularnych, które mogłyby mieć znaczący wpływ na patogenezę nieczynnych hormonalnie gruczolaków przysadki, przyniosło odkrycie zaburzeń epigenetycznych często obecnych w tych guzach [6, 7].

Jednym z podstawowych mechanizmów epigenetycznych jest metylacja DNA. Polega ona na przyłączeniu grupy metylowej do cytozyny w obrębie dwunukleotydu CpG. Modyfikacja ta zachodzi zwykle w miejscach genomu wyjątkowo bogatych w dwunukleotydy CpG, tzw. wyspach CpG. W klasycznym modelu metylacja DNA w obrębie promotora genu, często pokrywającego się z wyspą CpG, powoduje jego wyciszenie, natomiast brak tej modyfikacji sprzyja ekspresji genu [8].

Zaburzenia tego mechanizmu są powszechne w nowotworach. Obecność nieprawidłowej metylacji opisano na przykład w nowotworach urologicznych [9], w raku jelita grubego [10] oraz piersi [11]. Zmiany mogą polegać zarówno na obniżeniu, jak i podwyższeniu poziomu metylacji. W pierwszym przypadku może dochodzić do ogólnej hipometylacji genomu, skutkującej jego zwiększoną niestabilnością lub aktywacją ruchomych elementów genomu, a także do aktywacji genów ułatwiających rozwój nowotworu. Z kolei hipermetylacja genów, np. supresorowych, może powodować ich dezaktywację i utratę funkcji mimo braku mutacji w sekwencji DNA [12, 13].

Do tej pory opublikowano stosunkowo niewiele prac na temat zaburzeń metylacji DNA w nieczynnych hormonalnie gruczolakach przysadki. Większość dostępnych publikacji opisuje wyniki analizy metylacji DNA promotorów pojedynczych genów lub niewielkich paneli genowych. Badaniami obejmowano głównie promotory genów, których zaburzenia często są obserwowane w nowotworach i w przypadku których udokumentowany był również związek zaburzeń epigenetycznych ze zmianą ekspresji genu. Z dotychczasowych doniesień wynika, że w gruczolakach przysadki do nieprawidłowej, zwiększonej metylacji DNA dochodzi w promotorach genów, których białkowe produkty odpowiadają za procesy takie jak naprawa DNA (*MGMT*) [14], *TP73* [15], *p14(ARF*), regulacja cyklu komórkowego (*CDKN2A* [16]), apoptoza (*DAPK)* [17], *CASP8* [15] *p14(ARF*) i inne.

W dotychczas opublikowanych pracach analiza metylacji DNA była prowadzona najczęściej przy wykorzystaniu metody łańcuchowej reakcji polimerazy specyficznej względem metylowanych sekwencji (ang. methylation-specific polymerase chain reaction, MSP). Jest to dość archaiczna jakościowa metoda opracowana w połowie lat 90. XX w. [18]. Podobnie jak większość metod stosowanych do oceny profilu metylacji MSP wykorzystuje modyfikację genomowego DNA kwaśnym siarczynem sodu, pod którego wpływem niemetylowana cytozyna jest deaminowana do uracylu. Metylowana cytozyna nie ulega deaminacji, w związku z czym w wyniku modyfikacji mogą powstać dwie odmienne sekwencje w zależności od tego, jaki był wyjściowy status metylacji DNA. Modyfikowany DNA jest następnie amplifikowany przy użyciu starterów PCR zaprojektowanych tak, by umożliwiały wybiórczą amplifikację wariantu sekwencji, w której obecna była metylowana cytozyna, lub sekwencji oryginalnie niemetylowanej. Wynikiem oznaczenia jest obecność lub brak prążka na żelu agarozowym, który interpretowany jest jako obecność lub brak metylacji DNA w badanym regionie.

Wyniki z użyciem bardziej zaawansowanych technik wykorzystujących sekwencjonowanie DNA wskazują, że wzór i poziom metylacji poszczególnych miejsc CpG w preparacie genomowego DNA izolowanym z guza nowotworowego jest bardziej skomplikowany. Poszczególne miejsca CpG w danym regionie mogą w pewnym stopniu się różnić poziomem metylacji, który z kolei może generalnie przyjmować wartości od 0 do 100 proc. Wynik procentowy interpretowany jest jako frakcja alleli, w których pozycja jest metylowana. Metoda MSP zakłada więc znaczące uproszczenie. Zaznaczyć należy również, że metylacja DNA większości z opisanych genów była oceniana jedynie w pojedynczych badaniach na próbkach od chorych na NFPA. Wyniki tych badań jak dotąd nie były weryfikowane. W dużej części prac dotyczących roli zaburzeń metylacji DNA nie uwzględniono analizy wycinków przysadki prawidłowej. Publikowano jedynie wyniki dotyczące NFPA, przyjmując *a priori*, że prawidłowa tkanka charakteryzuje się brakiem metylacji danego regionu regulatorowego.

CEL PRACY

W ramach projektu pt. „Identyfikacja zaburzeń metylacji DNA u chorych na nieczynne hormonalnie gruczolaki przysadki i ocena ich wartości prognostycznej" finansowanego przez Naukową Fundację Polpharmy mieliśmy możliwość przeprowadzenia wielkoskalowej analizy metylacji DNA w nieczynnych hormonalnie gruczolakach przysadki z wykorzystaniem mikromacierzy Infinium HumanMethylation450 firmy Illumina (HM450). Technologia ta pozwala na ilościową ocenę pozio-

mu metylacji DNA w wybranych miejscach CpG w genomie, w znacznej mierze w cytozynach zlokalizowanych w regionach promotorowych genów. Celem niniejszej pracy była weryfikacja danych literaturowych, a więc statusu metylacji DNA wybranych genów badanych wcześniej metodą MSP przy wykorzystaniu danych ilościowych z eksperymentu wielkoskalowego.

Dane literaturowe oraz wyniki własne dotyczące genów analizowanych w niniejszym opracowaniu zebrano w tabeli 1.

MATERIAŁY I METODY

Do badania wykorzystano wycinki pochodzące z guzów od 35 chorych na nieczynne hormonalnie gruczolaki przysadki, operowanych w Centrum Onkologii – Instytucie im. Marii Skłodowskiej-Curie w Warszawie (COI). Materiał był gromadzony we współpracy z Kliniką Nowotworów Układu Nerwowego COI w latach 2008-2014. Fragmenty guzów mrożono niezwłocznie po pobraniu w ciekłym azocie, a następnie przechowywano w temp. -80°C do czasu izolacji DNA. Dodatkowo wykorzystano materiał archiwalny w postaci bloczków parafinowych, który stanowiły wycinki guzów pochodzących od 6 chorych operowanych w COI w latach 2007-2011. Charakterystykę chorych przedstawiono w tabeli 2. Jako materiał referencyjny wykorzystano 6 wycinków przysadek pobranych pośmiertnie w trakcie autopsji od osób zmarłych z powodów niezwiązanych z nowotworem przysadki.

DNA izolowano przy wykorzystaniu zestawu Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen) zgodnie z protokołem dołączonym do zestawu. Genomowe DNA zostało poddane konwersji siarczynem sodu przy wykorzystaniu zestawu DNA EZ-96 (Zymo Research, Orange, CA, USA). Część laboratoryjna eksperymentu mikromacierzowego została wykonana przez firmę AROS Applied Biotechnology w Danii. Sondy podzielono na klasy wzorcowe i przypisano lokalizację genomową zgodnie z opisem udostępnionym prze firmę Illumina dla macierzy HumanMethylation450k. Intensywność sygnału dla sond normalizowano za pomocą pakietu BMIQ (wersja 1.3) przy użyciu domyślnych parametrów [29]. Dla każdej pozycji CpG wyznaczano wartość Beta będącą

Tabela 1. Zestawienie genów analizowanych w badaniu.

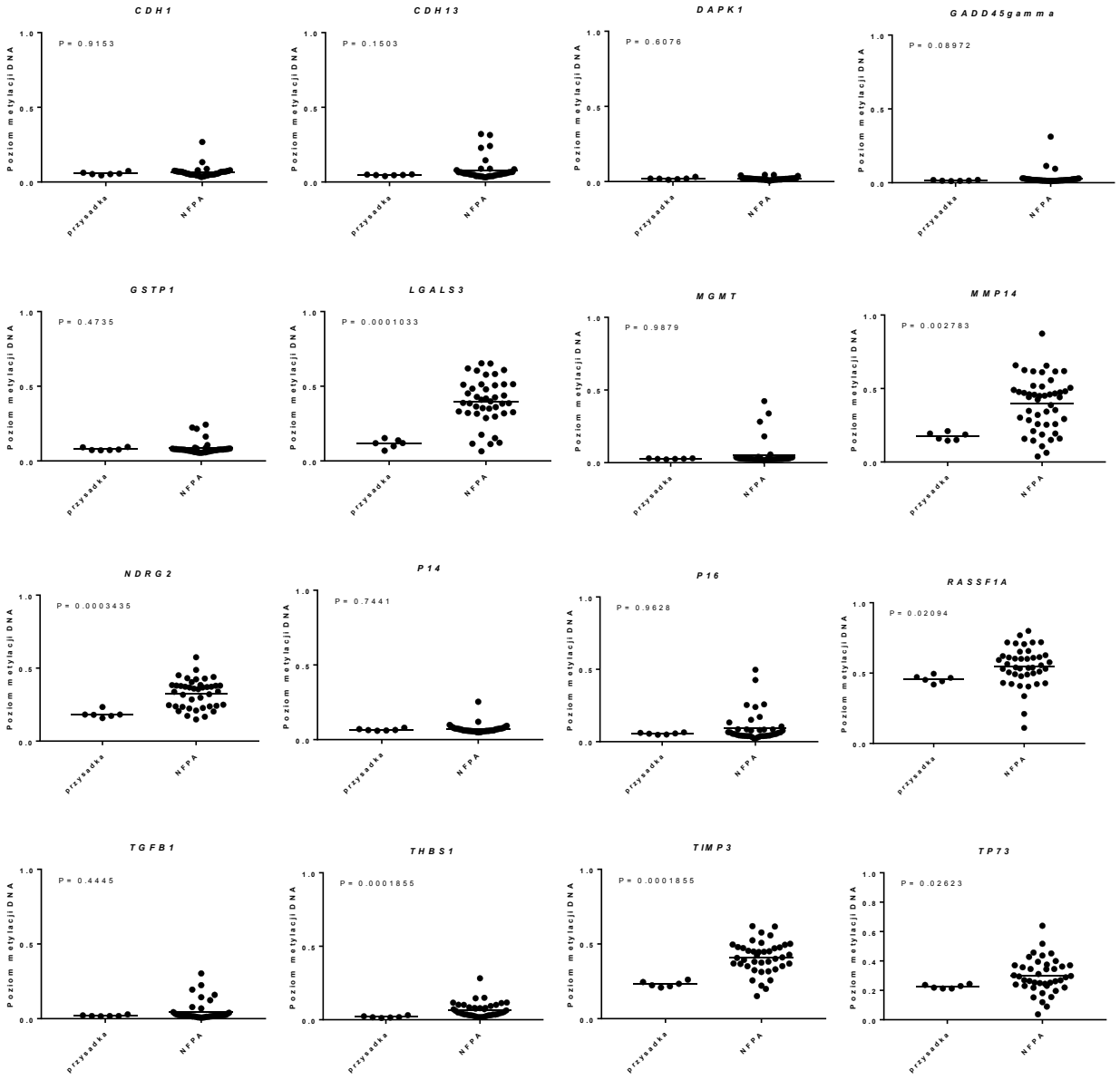
	Dane literaturowe		Wyniki własne (macierze HM450)	
Gen	Częstość hipermetylacji DNA w NFPA	Liczba badanych próbek (NFPA/prawidłowa tkanka)	Uśredniony poziom metylacji DNA w NFPA *versus* prawidłowa tkanka	Częstość hipermetylacji DNA w NFPA
CDH1	46% [19]	24/5	6,5% vs 5,7%; p=0,91	5%
CDH13	29% [19]	24/5	7,8% vs 4,6%; p=0,15	12%
CDKN2A	43% [15]	23/2		
P16	79% [20] 80% [16] 75% [21] 58% [22]	19/0 10/0 24/0 19/0	9,6% vs 5,6%; p=0,96	*P16* – 17%
P14	13% [15]	23/2	7,2% vs 6,6%; p=0,74	*P14* – 4,8%
DAPK1	4% [15] 14% [17]	23/2 14/5	1,9% vs 2%; p=0,61	2,4%
GADD45G	53% [23]	17/3	3% vs 1,5%; p=0,09	2,4%
GSTP1	63,2% [24]	19/3	8,5% vs 8%; p=0,47	10%
LGALS3	57% [25]	7/3	39,7% vs 11,6%; p=0,0001	85%
MGMT	35% [14] 22% [15]	20/0 23/2	5,4% vs 2,7%; p=0,99	12%
MMP14	30% [26]	64/0	39,6% vs 17,4%; p=0,0028	83%
NDRG2	20,7% [27]	68/0	32,7% vs 18,5%; p=0,0003	66%
RASSF1	29% [28]	21/4	54,7% vs 45,8%; p=0,0209	49%
TGFB1	11% [26]	64/0	4,8% vs 2%; p=0,4445	17%
THBS1	39% [15]	23/2	6,6% vs 1,9%; p=0,0002	7,3%
TIMP3	13% [15]	23/2	41% vs 23,2%; p=0,0002	78%
TP73	26% [15]	23/2	29,8% vs 22,6%; p=0,0262	39%

stosunkiem intensywności świecenia sondy dla wariantu metylowanego do całkowitej intensywności świecenia sond dla danej pozycji CpG (suma intensywności świecenia sond dla metylowanego i niemetylowanego wariantu). Tak wyznaczona wartość Beta zawiera się w przedziale 0-1 i świadczy o procentowej zawartości metylocytozyny w danej pozycji, tj. o poziomie jej metylacji.

Wyboru genów, których promotory poddano analizie w niniejszej pracy, dokonano na podstawie przeglądu piśmiennictwa. Wybrano promotory genów, które były wcześniej analizowane w grupach chorych na nieczynne gruczolaki przysadki przy wykorzystaniu metody MSP (wybrane geny wraz z odnośnikami literaturowymi przedstawiono w tabeli 1).

W ramach przeglądu literatury, wykorzystując opublikowane sekwencje starterów MSP, identyfikowano regiony genomowe, których status metylacji DNA był analizowany przez poszczególnych badaczy. W analizie wykorzystano dane z sond HM450 zlokalizowanych w tych regionach genomowych dla próbek DNA z wycinków NFPA oraz wycinków prawidłowej przysadki.

Na potrzeby analizy statystycznej dla każdej próbki wyznaczano uśredniony poziom metylacji DNA w danym regionie regulatorowym określonego genu, wykorzystując wyniki dla wszystkich dostępnych sond zlokalizowanych w danym regionie. Porównywano grupę wycinków kontrolnych prawidłowej przysadki z grupą nieczynnych hormonalnie gruczolaków przysadki, wykorzystując test Manna-Whitneya. Przyjęto



Ryc. 1. Poziom metylacji DNA regionów regulatorowych analizowanych genów w prawidłowej przysadce i NFPA.

poziom istotności α=0,05. Wykorzystano program GraphPad Prism (GraphPad Software).

Na potrzeby odniesienia pozyskanych wyników do danych literaturowych, w których raportowano odsetek próbek z nieprawidłową metylacją DNA danego regionu, próbki o podwyższonym poziomie metylacji klasyfikowano na podstawie arbitralnie przyjętego kryterium. Jako hipermetylowane klasyfikowano próbki, które w danym regionie miały poziom metylacji wyższy niż średnia wartość dla próbek kontrolnych powiększona o 10 punktów procentowych.

WYNIKI I OMÓWIENIE

Analizę porównawczą przeprowadzono dla 16 wybranych regionów regulatorowych genów, które miały pokrycie w sondach macierzy HM450. W analizie danych z mikromacierzy przypadało średnio 3,8 sondy na 1 badany region (od 2 do 9 sond). W przypadku 7 genów: *LGALS3*, *MMP14*, *NDRG2*, *RASSF1A*, *THBS1*, *TIMP3* i *TP73,* stwierdzono istotny statystycznie wzrost poziomu metylacji DNA w gruczolakach przysadki w porównaniu z wycinkami kontrolnymi. Największą różnicę obserwowano dla genów *MMP14* (średnia 39,6% w próbkach NFPA względem 17,4% w wycinkach prawidłowej przysadki), *LGAL* (średnia 39,7% względem 11,6%), *NDRG2* (średnia 32,7% względem 18,5%) i *TIMP3* (średnia 41% względem 23,2%). W przypadku tych genów stwierdzono największy odsetek próbek o podwyższonym poziomie metylacji DNA na podstawie przyjętego kryterium. Częstość występowania hipermetylacji DNA w tych regionach była wyższa niż opisana w piśmiennictwie najprawdopodobniej ze względu na różnice metodyczne. W naszym opracowaniu próbki klasyfikowano jako hipermetylowane na podstawie wybranego arbitralnie progu odcięcia, podczas gdy w opublikowanych badaniach wynikał on z czułości stosowanej techniki laboratoryjnej. Generalnie w przypadku tych regionów nasza analiza potwierdzała występowanie zaburzeń epigenetycznych w znacznym odsetku gruczolaków i ich związek z patogenezą guzów przysadki.

W przypadku pozostałych genów nie stwierdziliśmy znacząco wyższego poziomu metylacji w wycinkach gruczolaków w porównaniu z wycinkami kontrolnymi. Mimo to w pewnym odsetku próbek NFPA obserwowaliśmy podwyższoną metylację DNA poszczególnych regionów. Częstości występowania hipermetylacji DNA promotorów *DAPK* i *TGFB1* były zbliżone do danych prezentowanych we wcześniejszych doniesieniach. Poziom metylacji DNA regionów regulatorowych analizowanych przez nas genów w prawidłowej przysadce i NFPA przedstawiono na rycinie 1.

Dla pozostałych genów nasze wyniki nie są zgodne z dotychczasowymi danymi literaturowymi. Największe rozbieżności dotyczą statusu metylacji genów *CDH1, GADD45G*, *GSTP1* oraz *P16*. Według danych literaturowych zaburzenia epigenetyczne tych genów występują przynajmniej u ok. połowy chorych, podczas gdy według naszych danych były one hipermetylowane u mniej niż 10% chorych (za wyjątkiem promotora *P16*, który był metylowany w 16% NFPA). Podejrzewamy, że różnice te wynikają przede wszystkim z niedoskonałości stosowanej we wcześniejszych badaniach metody analitycznej, tj. MSP.

Niektóre opublikowane prace wskazują, że MSP jest metodą podatną na wyniki fałszywie dodatnie. Mogą one wynikać z niedoskonałości sekwencji starterów [30], niepełnej konwersji DNA w reakcji z siarczynem sodu lub innych czynników, takich jak np. obecność jednonukleotydowych wariantów polimorficznych w sekwencji DNA, do której projektowany jest starter PCR [31].

Jednym z najlepiej opisanych biomarkerów epigenetycznych jest hipermetylacja promotora *MGMT*, gdyż jest ona czynnikiem rokowniczym u chorych na glejaka wielopostaciowego. Hipermetylacja *MGMT* opisywana jest jako marker odpowiedzi na leczenie temozolomidem w tej grupie chorych.

W większości opublikowanych prac dotyczących glejaków status metylacji *MGMT* był oceniany przy wykorzystaniu MSP. Najczęściej obserwowano tę zmianę u ok. 40% chorych na glejaka, przy czym można zauważyć istotne rozbieżności pomiędzy publikacjami, tj. wyniki, według których zaburzenia metylacji *MGMT* występują u 25% [32], jak również u 68% [33] chorych na glejaki. W publikowanym niedawno opracowaniu doświadczeń kilkuletniej praktyki w oznaczaniu *MGMT* do celów diagnostycznych przedstawiono dane na temat rozbieżności wyników testu MSP dla próbek, które były analizowane rutynowo w dwóch powtórzeniach. Niepowtarzalne wyniki MSP obserwowano w przypadku 12% badanych próbek [34]. W dyskusji tej pracy przyczyn niepowtarzalności wyników doszukiwano się głównie w szczegółach technicznych, co obrazuje niedoskonałości metody MSP.

W badaniach dotyczących gruczolaków przysadki częstość występowania hipermetylacji promotora *MGMT* obserwowano u 22% i nawet 35% [14, 15]. Doniesienia te sugerowały, że analogicznie jak u chorych na glejaka status *MGMT* mógłby być czynnikiem predykcyjnym przy leczeniu temozolomidem, zwłaszcza że we wstępnym badaniu dotyczącym leczenia gruczolaków przysadki

Tab. 2. Charakterystyka chorych.

	Liczba
Pacjenci ogółem	**41**
Płeć	
kobiety	15
mężczyźni	26
Wiek (lata)	
zakres	36-85
mediana	59
Rozpoznanie patomorfologiczne	
gonadotropowy	36
null cell adenoma	2
wielohormonalny	2
niemy kortykotropowy	1
Inwazyjność	
tak	19
nie	15
brak danych	7

z wykorzystaniem temozolomidu powiązano lepszą odpowiedź na chemioterapię z niższym poziomem białka MGMT [35]. W naszej analizie hipermetylację *MGMT*, wbrew wcześniejszym doniesieniom, stwierdziliśmy jedynie u 5 chorych na NFPA.

Należy zaznaczyć, że wykorzystana w niniejszej pracy technologia mikromacierzy ma swoje ograniczenia. Podstawowym z nich jest fakt, że metoda ta pozwala na ocenę jedynie wybranych, poszczególnych pozycji CpG – tych, dla których zaprojektowano sondy na macierzy. Nie jest zatem możliwa ocena metylacji DNA wszystkich miejsc, w których może dochodzić do metylacji cytozyny w badanym regionie. Dla niektórych wybranych przez nas regionów macierze HM450 (Illumina) mają dość gęste pokrycie, 7 lub 9 sond w wybranym regionie długości ok. 200 pz. (geny *RASSF1A*, *NDRG1* i *CDH13*). Dla niektórych analizowanych regionów mieliśmy dane dla mniejszej liczby sond. Najmniej, tylko 2 sondy, znajdowały się w analizowanych regionach *P14* i *P16* (gen *CDK-N2A*). W niniejszym opracowaniu konsekwentnie wykorzystywaliśmy dane mikromacierzowe jedynie dla sekwencji CpG w regionach, w których metylacja DNA była wcześniej oceniana przez innych badaczy.

Porównując nasze wyniki z wcześniej opublikowanymi wynikami innych autorów, należy zaznaczyć, że większość poprzednich badań obejmowała mniej liczne grupy chorych niż badana przez nas grupa pacjentów (tab. 1). Większość publikacji, na które się powołujemy w niniejszym opracowaniu, opierała się na analizie ok. 20 chorych na NFPA. Wydaje się, że obok różnic w stosowanych technikach badawczych mała liczba chorych uwzględnionych w poprzednich badaniach może również częściowo tłumaczyć rozbieżności pomiędzy naszymi wynikami i danymi literaturowymi, co obserwowaliśmy w przypadku części badanych regionów.

WNIOSKI

1. W grupie 41 chorych z NFPA występowało częste podwyższenie poziomu metylacji DNA w regionach regulatorowych genów *LGALS3, MMP14, NDRG2, RASSF1A, THBS1, TIMP3* i *TP73.* Stwierdzono rzadkie występowanie hipermetylacji DNA w pozostałych badanych genach.

2. Występowanie zaburzeń epigenetycznych w znacznym odsetku NFPA może wskazywać na ich związek z patogenezą gruczolaków przysadki.

3. Zastosowane metody badawcze mogą mieć istotny wpływ na uzyskiwane wyniki badań molekularnych i wymagają ich właściwego doboru.

PIŚMIENNICTWO

1. Greenman Y., Stern N. A., Non-functioning pituitary adenomas, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.,* 2009; 23: 625-638.
2. Ezzat S. *et al.,* The prevalence of pituitary adenomas: A systematic review, *Cancer,* 2004; 101: 613-619.
3. Cury M.L.C.D.A.R. *et al.,* Non-functioning pituitary adenomas: clinical feature, laboratorial and imaging assessment, therapeutic management and outcome, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.,* 2009; 53: 31-9.
4. Arafah B.M., Prunty D., Ybarra J., Hlavin M.L., Selman,W.R., The dominant role of increased intrasellar pressure in the pathogenesis of hypopituitarism, hyperprolactinemia, and headaches in patients with pituitary adenomas, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2000; 85: 1789-1793.
5. Newey P.J. *et al.,* Whole-exome sequencing studies of nonfunctioning pituitary adenomas, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2013; 98: E796-800.
6. Farrell, W.E., Clayton R.N., Epigenetic change in pituitary tumorigenesis, *Endocr. Relat. Cancer*, 2003; 10: 323-330.
7. Ling C. *et al.,* A pilot genome-scale profiling of DNA methylation in sporadic pituitary macroadenomas: association with tumor invasion and histopathological subtype, *PLoS One*, 2014; 9: e96178.
8. Bird A.P., CpG-rich islands and the function of DNA methylation, *Nature,* 1986.

9. Wu P., Cao Z., Wu S., New Progress of Epigenetic Biomarkers in Urological Cancer, *Dis. Markers,* 2016.
10. Sameer A.S., Nissar S., Epigenetics in diagnosis of colorectal cancer, *Mol. Biol. Res. Commun,* 2016; 5: 49-57.
11. Gyorffy B. *et al.,* Aberrant DNA methylation impacts gene expression and prognosis in breast cancer subtypes, *Int. J. Cancer,* 2016; 138: 87-97.
12. Esteller M., Epigenetics in Cancer, *N. Engl. J. Med.,* 2008; 1-12.
13. Sandoval J., Esteller M., Cancer epigenomics: Beyond genomics, *Curr. Opin. Genet. Dev.,* 2012; 22: 50-55.
14. Arya S. *et al.,* Implications of MGMT methylation status in pituitary adenoma, *Pathol.– Res. Pract.,* 2014; 210: 407-411.
15. Bello M.J., De Campos J.M., Isla A., Casartelli C., Rey J.A., Promoter CpG methylation of multiple genes in pituitary adenomas: Frequent involvement of Caspase-8, *Oncol. Rep.* 2006; 15: 443-448.
16. Jaffrain-Rea M.L. *et al.,* p16 (INK4a, MTS-1) gene polymorphism and methylation status in human pituitary tumours, *Clin. Endocrinol. (Oxf),* 1999; 51: 317-325.
17. Simpson D.J., Clayton R.N., Farrell W.E., Preferential loss of Death Associated Protein kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion, *Oncogene,* 2002; 21: 1217-1224.
18. Herman J.G., Graff J.R., Myohanen S., Nelkin B.D., Baylin S.B., Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* 1996; 93: 9821-9826.
19. Qian Z.R. *et al.,* Tumor-specific downregulation and methylation of the CDH13 (H-cadherin) and CDH1 (E-cadherin) genes correlate with aggressiveness of human pituitary adenomas, *Mod. Pathol.,* 2007; 20: 1269-1277.
20. Seemann N. *et al.,* CDKN2A/p 16 inactivation is related to pituitary adenoma type and size, *J. Pathol.*, 2001; 193: 491-497.
21. Ogino A. *et al.,* The p15(INK4b)/p16(INK4a)/RB1 pathway is frequently deregulated in human pituitary adenomas, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 2005; 64: 398-403.
22. Yoshino A. *et al.,* Promoter hypermethylation profile of cell cycle regulator genes in pituitary adenomas, *J. Neurooncol.*, 2007; 83: 153-162.
23. Bahar A., Bicknell J.E., Simpson D.J., Clayton R.N., Farrell W.E., Loss of expression of the growth inhibitory gene GADD45gamma, in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation, *Oncogene*, 2004; 23: 936-944.
24. Yuan Y. *et al.,* Reduction of GSTP1 expression by DNA methylation correlates with clinicopathological features in pituitary adenomas, *Mod. Pathol.*, 2008; 21: 856-865.
25. Ruebel K.H. *et al.,* Effects of DNA methylation on galectin-3 expression in pituitary tumors, *Cancer Res.*, 2005; 65: 1136-1140.
26. Ruskyte K. *et al.,* MMP-14 and TGFβ-1 methylation in pituitary adenomas, *Oncol. Lett.,* 2016; 3013-3017, doi:10.3892/ol.2016.4919.
27. Vaitkiene P., Valiulyte I., Glebauskiene B., Liutkeviciene R., N-myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) promoter methylation and expression in pituitary adenoma, *Diagn. Pathol.*, 2017; 12: 33.
28. Qian Z.R. *et al.,* Inactivation of RASSF1A tumor suppressor gene by aberrant promoter hypermethylation in human pituitary adenomas, *Lab. Invest.*, 2005; 85: 464-473.
29. Teschendorff A.E. *et al.,* A beta-mixture quantile normalization method for correcting probe design bias in Illumina Infinium 450 k DNA methylation data, *Bioinformatics*, 2013; 29: 189-196.
30. Aggerholm A., Hokland P., Guldberg, P., DAP-kinase CpG island methylation in acute myeloid leukemia: methodology versus biology?, *Blood*, 2000; 95: 2997-2998.
31. Hussain Askree S. *et al.,* Allelic dropout can cause false-positive results for prader-willi and Angelman syndrome testing, *J. Mol. Diagnostics*, 2011; 13: 108-112.
32. Hassler M. *et al.,* Diversity of cytogenetic and pathohistologic profiles in glioblastoma, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2006; 166: 46-55.
33. Blanc J.L. *et al.,* Correlation of clinical features and methylation status of MGMT gene promoter in glioblastomas, *J. Neurooncol.*, 2004; 68: 275-283.
34. Xia D., Reardon D.A., Bruce J.L., Lindeman N.I., The Clinical Implications of Inconsistently Methylated Results from Glioblastoma MGMT Testing by Replicate Methylation-Specific PCR, *J. Mol. Diagnostics*, 2016; 18: 864-871.
35. Bengtsson D. *et al.,* Long-term outcome and MGMT as a predictive marker in 24 patients with atypical pituitary adenomas and pituitary carcinomas given treatment with temozolomide, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2015; 100: 1689-1698.