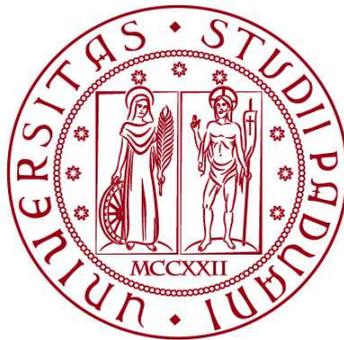


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia**



**ELABORATO DI LAUREA**

**RUOLO DEL GENE *KMT5A* NELLA CRESCITA DI  
TUMORI IPOFISARI GH-SECERNENTI MEDIANTE LA  
VIA DI SEGNALAZIONE WNT/ $\beta$ -CATENINA**

**Tutor: Prof. Gianluca Occhi  
Dipartimento di Biologia**

**Laureando: Giovanni Vettori**

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**



## INDICE

<b>1. Abstract</b> .....	5
<b>2. Introduzione</b> .....	6
2.1 Ipofisi e PitNETs.....	6
2.2 Funzione di <i>KMT5A</i> .....	10
2.3 Via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina con riferimento a <i>KMT5A</i> .....	11
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	13
3.1 Raccolta dei tessuti e coltura cellulare .....	13
3.2 Trasfezione lentivirale.....	13
3.3 RT-qPCR.....	14
3.4 Western Blot (WB).....	14
3.5 CCK-8 .....	15
3.6 EdU.....	16
3.7 Saggio di formazione di colonie.....	16
3.8 Citometria a flusso per valutare l'apoptosi .....	17
3.9 Analisi immunohistochimica.....	17
3.10 Saggio tumorale su xenotrapianto di topo nudo.....	18
<b>4. Risultati</b> .....	19
4.1 Livello di espressione di <i>KMT5A</i> .....	19
nei tessuti con GH PitNETs e ipofisari normali .....	19
4.2 Effetti del knockdown di <i>KMT5A</i> sulle cellule GH3 in vitro.....	20
4.3 Effetti dell'inibitore di <i>KMT5A</i> UNC0379 sulle cellule GH3 in vitro..	22
4.4 L'attività di <i>KMT5A</i> in cellule GH3 in vitro potrebbe avvenire mediante la via Wnt/ $\beta$ -catenina .....	24
4.5 Effetti del knockdown di <i>KMT5A</i> e del trattamento con UNC0379 su cellule GH3 in vivo .....	25
4.6 L'attività di <i>KMT5A</i> in cellule GH3 in vivo potrebbe avvenire mediante la via Wnt/ $\beta$ -catenina .....	26
<b>5. Discussione</b> .....	27
<b>6. Bibliografia</b> .....	31



## 1. Abstract

L'adenoma ipofisario secernente ormone della crescita (GH) è considerato uno dei tipi più dannosi di tumori neuroendocrini ipofisari (PitNETs). Studi precedenti hanno individuato una rilevante correlazione positiva tra un'aumentata espressione del gene che codifica per la N-lisina metiltransferasi (*KMT5A*) e la proliferazione di PitNETs.

In questo studio si approfondisce il ruolo di questo gene nello sviluppo di tali tumori. È stata dapprima valutata, con tecniche di immunoistochimica, RT-qPCR e Western Blot (WB), l'espressione di *KMT5A* in individui sani e affetti da GH PitNET, oltre che in cellule di ratto ipofisarie sane e di tipo GH3. Le cellule GH3 – isolate da ipofisi di ratti che presentano un adenoma ipofisario GH-secernente – sono poi state utilizzate per indagare innanzitutto la diminuzione dell'espressione di *KMT5A* indotta per mezzo di un inibitore selettivo realizzato mediante la tecnologia di interferenza con RNA e in secondo luogo la crescita *in vitro* mediante tecniche che utilizzano CCK-8, EdU, citometria a flusso (FCM), formazione di cloni e WB. La proliferazione di cellule GH3 è anche stata valutata *in vivo* mediante uno xenotrapianto.

È emerso che a fronte dell'elevata espressione di *KMT5A* in GH PitNETs e cellule GH3, la riduzione indotta della sua espressione porta all'inibizione della crescita tumorale con apoptosi cellulare. Mediante WB è infine stata evidenziata una potenziale salienza della via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, che potrebbe essere coinvolta nel sistema mediante il quale *KMT5A* promuove la proliferazione dei PitNETs.

## 2. Introduzione

### 2.1 Ipofisi e PitNETs

L'ipofisi è una ghiandola neuroendocrina localizzata alla base del cervello all'interno della sella turcica, una piccola cavità ossea. È costituita da due lobi principali: l'adenipofisi (anteriore) e neuroipofisi (posteriore), con origini embrionali e funzioni distinte. L'ipofisi secreta molteplici ormoni che hanno un ruolo fondamentale nel metabolismo, nella crescita, nella riproduzione e nella risposta allo stress. Alcuni di questi sono l'ormone della crescita (GH o somatotropina), la prolattina, l'ormone adrenocorticotropo (ACTH) e quello tireotropo (TSH), l'ormone follicolo-stimolante (FSH) e quello luteinizzante (LH). L'attività di questa ghiandola è strettamente regolata dall'ipotalamo, porzione cerebrale che controlla la neuroipofisi mediante segnali nervosi e l'adenipofisi tramite ormoni di rilascio e inibizione. Il controllo di quest'ultima è esercitato attraverso un sistema di vasi sanguigni noto come sistema portale ipotalamo-ipofisario.

I tumori ipofisari sono neoplasie benigne che originano nell'adenipofisi e costituiscono la terza tipologia più comune di tumore del sistema nervoso centrale<sup>1</sup>, con una prevalenza del 17%<sup>2</sup>. Data la loro attività e localizzazione possono influenzare significativamente la funzionalità endocrina e neurologica. Possono essere classificati sulla base di diversi criteri. Si definiscono silenti quando producono ormoni in quantità rilevabili a livello tissutale senza determinare sintomi evidenti di eccesso ormonale, non funzionanti se non producono quantità rilevabili di ormoni e quindi non causano effetti sistemici legati all'iperproduzione ormonale, oppure funzionanti (approssimativamente metà, 46%-64%), quando manifestano un'augmentata secrezione ormonale (prolattina, GH, ACTH, TSH, gonadotropine)<sup>2,3</sup>. Generalmente è stato osservato che gli adenomi ipofisari silenti sono più estesi e invasivi rispetto a quelli funzionanti<sup>4</sup>. Anche quelli funzionanti però, benché istologicamente benigni, a causa della loro morbosità provocano una diminuzione dell'aspettativa di vita<sup>2</sup>. Un'ulteriore distinzione può essere fatta in base all'invasività, la tendenza delle cellule tumorali ad invadere tessuti circostanti, con la scala Knosp, basata sulla risonanza magnetica (MRI), che individua 5 classi di crescita tumorale: a grado 0 l'adenoma è considerato intrasellare non invasivo, a gradi 1 e 2 è parasellare non invasivo, mentre le classi 3 e 4 indicano una crescita parasellare e invasiva, che può anche essere aggressiva in caso di crescita particolarmente rapida e di mancata risposta ai trattamenti farmacologici, radiologici o chirurgici, abitualmente funzionanti<sup>3</sup>.

Il tumore ipofisario GH-secerne rappresentando circa il 12% degli adenomi ipofisari funzionanti ed è associato a diverse complicanze. Queste possono essere conseguenza diretta dell'ipersecrezione di somatotropina, e risultare in gigantismo e acromegalia che può manifestarsi con gozzo, osteoartrite, polipi del colon, apnea notturna, disturbi riproduttivi, diabete, ipertensione e malattie cardiovascolari, oppure indirette, date dalla massa tumorale che aumentando di

dimensioni va ad esercitare pressione in corrispondenza del chiasma ottico con una conseguente perdita, parziale o totale, della vista. In entrambe le situazioni le conseguenze possono seriamente influire sulla qualità e sull'aspettativa di vita dei pazienti.

Come osservato nello studio "Välimäki, Niko, Hande Demir, Esa Pitkänen, Eevi Kaasinen, Atte Karppinen, Leena Kivipelto, Camilla Schalin-Jäntti, Lauri A. Aaltonen, e Auli Karhu. «Whole-Genome Sequencing of Growth Hormone (GH)-Secreting Pituitary Adenomas». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 100, fasc. 10 (ottobre 2015): 3918–27.", su un campione di 12 pazienti con tumori ipofisari GH-secerenti sono state riscontrate una media di 129 single nucleotide variants (SNVs) di cui mediamente 2.3 riguardanti regioni codificanti. L'unica variazione ricorrente, osservata nel 25% dei casi, era la mutazione gain-of-function di *GNAS* (Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating), gene che permette la sintesi della subunità alfa della proteina  $G_s$  ( $G_{\alpha s}$ ), complesso GTPasico associato a recettori di membrana che stimola l'attività dell'adenilato ciclasi. Questa mutazione, chiamata gsp (somatic *GNAS* point mutation), comporta l'attivazione costitutiva della proteina  $G_s$ , determinando un aumento dei livelli di cAMP e dell'attività di PKA (Protein Kinase A) che in ultimo stimola la secrezione di GH. Inerente alle proteine G è anche da segnalare la mutazione del gene *GPR101* che codifica per un GPCR (G-Protein Coupled Receptor), recettore coinvolto nella regolazione della crescita e dell'omeostasi cellulare. Questo gene è mutato e sovraespresso in pazienti affetti da XLAG. L'acrogigantismo legato all'X (XLAG) è un'endocrinopatia genetica rara che si presenta in età infantile, causata dall'ipersecrezione di GH/IGF-1 (e spesso anche di prolattina) correlata alla microduplicazione di una regione del cromosoma X (Xq26.3) che coinvolgerebbe quattro geni, di cui però solo *GPR101* è sovraespresso. Tale sovraespressione porta ad un aumento dell'attività del recettore GPR101, comportando un incremento della sintesi di cAMP da parte dell'adenilato ciclasi e di conseguenza anche dell'attività delle chinasi A (PKA) che promuovono in ultimo la trascrizione di geni che regolano la secrezione di GH, aumentandola<sup>5,6</sup>. Esistono anche forme familiari di adenomi ipofisari GH-secerenti, seppur meno frequenti, e possono essere di tipo isolato (FIPA), in cui solo l'ipofisi presenta cellule tumorali, o sindromico. Nel primo gruppo circa nell'80% dei casi non è possibile individuare una mutazione genetica; nonostante ciò, le due più frequenti colpiscono il gene *AIP* (11q13.3), con una prevalenza del 17% circa, e *GPR101*, di cui si è trattato sopra. La proteina codificata da *AIP* (aryl hydrocarbon receptor-interacting protein) agisce da soppressore tumorale. È un co-chaperone citoplasmatico lungo 330 amminoacidi che presenta delle regioni conservate tra cui tre domini TPR (tetratricopeptide repeats) all'estremità carbossi-terminale, il terzo dei quali può interagire con il recettore specifico del peptide, AhR (aryl hydrocarbon receptor), e con un dimero di Hsp90 (heat shock protein 90). AhR è un recettore che appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione attivati da ligandi e una volta attivato dal legame con composti esogeni o endogeni viene traslocato nel nucleo ad opera di ARNT (AhR Nuclear

Translocator) dove modula l'espressione genica. Hsp90 invece è una proteina chaperone i cui ruoli sono l'agevolazione del folding proteico, la stabilizzazione contro lo stress termico e la regolazione della degradazione proteica, oltre alla stabilizzazione di proteine che facilitano la crescita tumorale. Il complesso AIP-Ahr-Hsp90 è fondamentale per prevenire la degradazione di Ahr e allo stesso tempo ne regola la traslocazione nucleare, mantenendolo inattivo a livello citoplasmatico se necessario. L'attività aberrante di Ahr dovuta a mutazioni di *AIP*, che quindi non è più in grado di formare il complesso, può contribuire alla progressione tumorale mediante l'attivazione di geni coinvolti ad esempio nella proliferazione cellulare, l'angiogenesi e la resistenza all'apoptosi. AIP agisce da oncosoppressore anche interagendo con la via di segnalazione di cAMP: mantiene bassa la concentrazione di cAMP in modo indiretto e regola gli effetti di PKA a valle. In alcuni studi vengono evidenziate alcune modalità secondo cui queste regolazioni si verificano, ma si suppone ne esistano altre ancora non completamente chiarite. In condizioni normali le subunità  $\alpha$  di alcune proteine  $G_i$  ( $G\alpha_i-2$  e  $G\alpha_i-3$ ) inibiscono la sintesi di cAMP; in tumori ipofisari con *AIP* mutato è stata osservata una ridotta espressione di  $G\alpha_i-2$  che comporta la presenza di concentrazioni maggiori di cAMP e in ultimo di GH. È stata poi riscontrata una correlazione positiva tra *AIP* mutato e ridotta espressione di PDE4A4 e PDE4A8, fosfodiesterasi che idrolizzano cAMP, attenuando o interrompendo la trasduzione del segnale. AIP inoltre interagisce anche con PKA, chinasi attivata da cAMP, e in particolare con le sue subunità catalitica (PRKACA) e regolatoria (PRKAR1A)<sup>6</sup>. D'altra parte nel gruppo sindromico l'adenoma ipofisario è solo uno dei disturbi che si presentano. Nel caso di MEN1 (Multiple Endocrine Neoplasia 1) ad esempio, la mutazione del gene *MEN1* che codifica per la menina, peptide che regolando proteine correlate al ciclo cellulare come p27 e CDK4 (cyclin-dependent kinase subunit 4) assolve la sua funzione di oncosoppressore, può portare allo sviluppo della classica triade di iperparatiroidismo, adenomi ipofisari e tumori neuroendocrini. Pazienti con complesso di Carney (CNC), correlato alla mutazione del gene *PRKAR1A*, invece, presentano tumori endocrini e non con pigmentazione cutanea a chiazze e mixomi cardiaci e cutanei<sup>5</sup>. Oltre alle mutazioni genetiche un'altra causa di insorgenza di adenomi ipofisari, in particolare nelle forme sporadiche, sono le modificazioni epigenetiche, come la regolazione dell'espressione genica post-trascrizionale ad opera di miRNA, siRNA e lncRNA ma anche la metilazione del DNA stesso o istonica, come quella operata da KMT5A. Ulteriori cause alla base dell'insorgenza di questo tipo di tumori, ma non solo, sono il coinvolgimento di altre vie di segnalazione, come le vie Ras/Raf/MEK/ERK e PI3K/AKT/mTOR, che interagiscono tra loro e regolano la proliferazione cellulare e la genesi tumorale. La via di segnalazione Ras/Raf/MEK/ERK, nota anche come via delle MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), è un'importante via di trasduzione del segnale che regola la proliferazione, differenziazione e apoptosi cellulare e che risulta essere over-attivata in vari tumori, compresi quelli ipofisari. Svariati segnali extracellulari tra cui ormoni, fattori di crescita come EGF (epidermal growth factor) e IGF-1 (Insulin-like

Growth Factor 1) e di differenziamento sono in grado di attivarla. Il primo componente è Ras, una piccola proteina G con attività GTPasica che opera da interruttore molecolare e la cui attivazione avviene ad opera di recettori sulla superficie cellulare che legano un ligando specifico. Quando Ras lega GTP (Ras-GTP) recluta e attiva Raf, una chinasi citoplasmatica che fosforila e attiva MEK1/2 (MAPK/ERK Kinase), un'altra chinasi che a sua volta attiva ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinase) fosforilandone un residuo tirosinico (Tyr185) e uno treoninico (Thr183). ERK1/2 allora trasloca nel nucleo dove attiva fattori di trascrizione che regolano l'espressione di svariati geni coinvolti in vari processi fisiologici, quali *CCND1* (che codifica per la Ciclina D1) e *c-Myc*, coinvolti nel ciclo cellulare. Mutazioni somatiche, alterazioni epigenetiche e sovraespressioni di vari elementi quali i fattori di crescita possono portare a una sovra-attivazione di questa via, contribuendo così alla proliferazione eccessiva delle cellule, tra cui quelle somatotrope che quindi secernono GH in quantità eccessiva, oltre alla resistenza all'apoptosi e la stimolazione della neoangiogenesi<sup>7-9</sup>. Anche PI3K/AKT/mTOR è una via di segnalazione intracellulare fondamentale, coinvolta nella regolazione di numerosi processi cellulari e attivata da fattori di crescita, ormoni e altri segnali extracellulari. L'attivazione della via ha luogo quando un recettore localizzato sulla superficie cellulare, come RTK (Receptor Tyrosine Kinase) o GPCR (G-Protein Coupled Receptor) viene attivato. Questo fosforila e attiva PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase), la cui subunità catalitica p110 fosforila PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate) in PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate), che recluta sul lato citoplasmatico della membrana plasmatica proteine contenenti domini PH (pleckstrin homology), tra cui AKT (anche conosciuta come PKB, Protein Kinase B); questa è una serina/treonina chinasi che, una volta reclutata da PIP3, viene fosforilata e attivata da PI3K. AKT, una volta attivata, fosforila e attiva mTOR (Mammalian Target of Rapamycin), una serina/treonina chinasi che può formare con altre proteine i complessi mTORC1 o mTORC2, con diversi ruoli cellulari quali la sintesi proteica e la regolazione dell'omeostasi, del metabolismo e della sopravvivenza cellulare. AKT fosforila inoltre numerosi altri bersagli a valle andando a regolare vari processi quali la sintesi proteica, inibendo TSC2, inibitore di mTORC1, la sopravvivenza cellulare, l'apoptosi cellulare e il metabolismo, attivando ad esempio GSK-3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ ), che va indirettamente anche ad attivare la Ciclina D1. Anche questa via può essere bersaglio di mutazioni somatiche, alterazioni epigenetiche e sovraespressioni che ne potenziano l'attivazione o la rendono addirittura costitutiva, andando in ultimo a promuovere la crescita tumorale<sup>7-9</sup>.

Nonostante le molteplici cause, le modalità di trattamento di questo tipo di adenomi sono simili a quelle adottate per altre tipologie di tumori ipofisari e prevedono in primo luogo l'asportazione chirurgica e solo in caso di recidività o successo incompleto, trattamento farmacologico ed eventualmente radiologico.

## 2.2 Funzione di KMT5A

Il gene *KMT5A* (anche conosciuto come SET8, SETD8 o PR-Set7) è localizzato sul braccio lungo del cromosoma 12 (12q24.31) e appartiene alla famiglia genica SET. Codifica per la N-lisina metiltransferasi, proteina enzimatica che catalizza la mono-metilazione della proteina Lys-20 dell'istone H4 (H4K20) andando a modificare il ripiegamento cromosomale e a modulare l'espressione genica. La proteina deve il suo nome ai suoi molteplici domini SET (core-SET, c-SET, i-SET, n-SET) che svolgono attività metiltransferasica. Nel caso di SET8 avviene una mono-metilazione a livello della lisina 20 dell'istone H4 utilizzando un gruppo metile proveniente dal cofattore S adenosil metionina (SAM), il quale viene demetilato a S-adenosil omocisteina (SAH). H4K20 può anche essere di- o tri-metilato rispettivamente dalle proteine enzimatiche Suv4-20h1/KMT5B e Suv4-20h2/KMT5C<sup>10</sup>. La mono-metilazione istonica di H4K20 a H4K20me1 ha un ruolo anche nella modulazione dell'espressione di numerosi fattori non-istonici, quali ncRNA (lncRNA, miRNA), p53, Numb, CDC20, Twist, Wnt, contribuendo a rendere l'attività di questo enzima significativa in numerosi processi fondamentali quali la regolazione del ciclo cellulare, della trascrizione genica e dell'apoptosi oltre che la riparazione del DNA<sup>11</sup>.

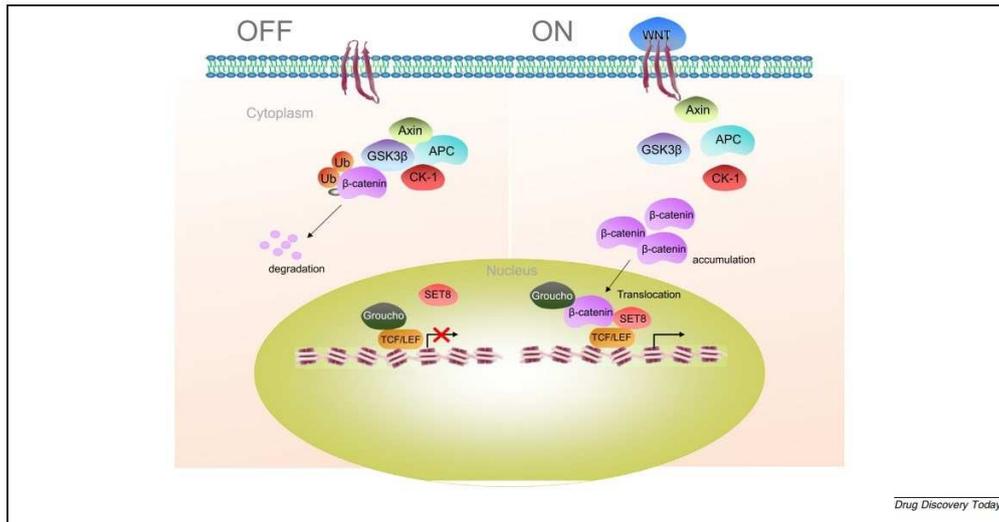
Come evidenziato nel presente studio, il blocco della mono-metilazione di H4K20, indotto tramite knockdown di *KMT5A*, ha come effetti interferenza con il ciclo cellulare e alterazione dell'espressione genica e, di conseguenza, può portare ad apoptosi. In merito al ciclo cellulare livelli inadeguati di KMT5A determinano complicazioni quali l'incapacità di iniziare la fase S, la ri-replicazione del DNA e l'errata progressione mitotica. Si rivela quindi indispensabile la regolazione della sua concentrazione ad opera di svariati enzimi. Durante la fase G<sub>2</sub>/M KMT5A è funzionale a reclutare complessi proteici promuoventi la condensazione della cromatina, quali condensina II e L3MBTL1; la sua concentrazione durante questa fase è elevata. Durante le prime fasi della mitosi il complesso chinasi ciclina-dipendente 1 (cdk1)/ciclina B fosforila KMT5A a livello del residuo serinico 29 (S29) impedendone l'ubiquitinazione – e la conseguente degradazione – da parte di APC<sup>cdh1</sup> (anaphase-promoting complex), una E3 ubiquitina ligasi che porta specifiche proteine marcate verso la degradazione a livello del proteasoma 26S. La fosforilazione permette anche la rimozione di KMT5A dai cromosomi mitotici con la sua conseguente ricollocazione nello spazio extracromosomale, funzionale alla progressione della mitosi. Durante l'anafase e fino a G<sub>1</sub> KMT5A viene invece defosforilato dalle fosfatasi Cdc14: questo ne permette l'ubiquitinazione da parte di APC<sup>cdh1</sup> e la degradazione con una conseguente diminuzione della concentrazione, ancora una volta funzionale alla progressione della mitosi<sup>12</sup>. Durante G<sub>1</sub> KMT5A libero viene ubiquitinato dal complesso SCF<sup>Skp2</sup> (Skp, Cullin, F-box containing) e poi degradato. Durante la fase S oltre a SCF<sup>Skp2</sup> è presente CRL4<sup>cdt2</sup>, complesso specifico che ubiquitina invece KMT5A legato alla cromatina, permettendo l'inizio della replicazione del DNA e impedendo sia il compattamento prematuro della cromatina (che deve avvenire una volta terminata la replicazione) che la ri-replicazione<sup>13</sup>. Compresi questi meccanismi, è chiaro come la disregolazione della metilazione istonica dovuta a un'alterazione dell'espressione di tale gene possa essere correlata con

l'insorgenza di molteplici tumori, tra cui quello all'ipofisi, alla prostata, al seno e all'esofago. Nel presente studio si indaga ulteriormente il ruolo oncogeno di tale gene la cui sovraespressione è correlata, mediante il pathway di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, anche all'insorgenza di tumori ipofisari funzionanti secernenti ormone della crescita (GH PitNETs).

### 2.3 Via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina con riferimento a KMT5A

La via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, la cosiddetta "canonica" tra le vie di segnalazione Wnt, è una via di trasduzione del segnale che regola processi biologici chiave quali lo sviluppo embrionale, la proliferazione, la differenziazione e la migrazione cellulare, come anche l'omeostasi in tessuti adulti. Le componenti principali della via canonica sono: le proteine ligando Wnt, i recettori transmembrana Frizzled (Fzd) e i co-recettori LRP5/6, il complesso di distruzione citoplasmatico composto da APC (adenomatous polyposis coli), AXIN (una scaffold protein), GSK-3 $\beta$  (glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), CK1 (casein kinase 1) e DVL (Dishevelled), la  $\beta$ -catenina, i fattori di trascrizione TCF (T cell factors)/LEF (lymphoid enhancing factors) e la proteina nucleare Groucho. In assenza di Wnt la  $\beta$ -catenina viene fosforilata dalle chinasi del complesso di distruzione, quindi ubiquitinata e infine degradata, mentre a livello nucleare l'azione dei fattori di trascrizione TCF/LEF è impedita dal legame con la proteina Groucho. In presenza di proteine Wnt a livello extracellulare queste vengono riconosciute e si legano a livello dei recettori Fzd-LRP5/6; il complesso di distruzione interagisce con il complesso ligando-recettore mediante DVL non potendo più compiere la sua attività fosforilativa.  $\beta$ -catenina quindi non viene degradata ma in seguito a suo accumulo citoplasmatico viene traslocata nel nucleo dallo shuttle citoplasmatico-nucleare. Qui scaccia Groucho e interagisce con i fattori di trascrizione TCF/LEF insieme ad altri elementi attivando la trascrizione di geni bersaglio che regolano principalmente la proliferazione cellulare<sup>14,15</sup>.

KMT5A svolge un ruolo chiave nella via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, che dev'essere però ancora essere completamente chiarito. Si suppone che esso si leghi direttamente a TCF/LEF insieme alla  $\beta$ -catenina e catalizzi la monometilazione di H4K20 a livello del TBE (TCF binding element), la sequenza di DNA a cui si lega il complesso TCF/LEF- $\beta$ -catenina. Questo permetterebbe la modulazione della trascrizione di geni target quali Ciclina D1, la cui proteina svolge un ruolo di promotore del ciclo cellulare accelerando la transizione tra la fase G1 e la fase S, e c-Myc<sup>11,16</sup>.



**FIGURE 3**  
SET8-mediated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activation. **(a)** In the absence of Wnt ligand,  $\beta$ -catenin is labeled by the Axin/anaphase-promoting complex (APC)/glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  complex and degraded by ubiquitination. **(b)** In the presence of Wnt ligand,  $\beta$ -catenin accumulates and enters the nucleus. Transcription is then activated by SET8 by replacing the repressor protein Groucho and binding to lymphoid enhancing factor (LEF)/T cell factor (TCF) transcription factors.

Immagine tratta da “Yang, C.; Wang, K.; Zhou, Y.; Zhang, S.-L. Histone Lysine Methyltransferase SET8 Is a Novel Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Drug Discov. Today* **2021**, *26* (10), 2423–2430. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.004>”

La disregolazione della via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina, a cui abbiamo visto essere strettamente correlato anche KMT5A, è correlata all’insorgenza tumorale mediante meccanismi quali la proliferazione cellulare incontrollata, l’alterazione della differenziazione cellulare e l’inibizione dell’apoptosi. Nel caso del segnale Wnt4, ad esempio, esso è stato dimostrato essere sovraespresso, insieme alla proteina downstream  $\beta$ -catenina<sup>17</sup>, in svariati tumori ipofisari funzionanti e non, compresi quelli secernenti ormone della crescita. Inoltre è stata evidenziata un’interessante correlazione inversa tra upregolazione di Wnt4/ $\beta$ -catenina e invasività tumorale<sup>18</sup>, che però risulta essere in contraddizione con altri studi<sup>19</sup>.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Raccolta dei tessuti e coltura cellulare

I tessuti ipofisari umani normali sono stati ottenuti da campioni di cadavere senza malattie endocrine, mentre i tessuti di tumore ipofisario GH-secernenti sono stati ottenuti da campioni intraoperatori.

Le cellule della linea GH3, provenienti da un centro di risorse cellulari, sono state coltivate in terreno DMEM arricchito con il 10% di siero fetale bovino e 1% penicillina/streptomicina in un incubatore a 37 °C con il 5% di CO<sub>2</sub>. Il terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) è un terreno di coltura cellulare incompleto che contiene prevalentemente amminoacidi, vitamine e glucosio e viene spesso arricchito con siero fetale bovino (FBS), altri amminoacidi e nutrienti per supportare efficientemente la crescita di cellule in coltura. È inoltre particolarmente indicato per la crescita di cellule aderenti, quali sono le GH3.

#### 3.2 Trasfezione lentivirale

La trasfezione è un processo che permette, mediante l'introduzione di acidi nucleici nella cellula, l'alterazione dell'espressione genica, consentendone lo studio. Può essere transiente oppure stabile, nel caso in cui il materiale genetico introdotto si integri nel genoma cellulare. La trasfezione lentivirale utilizza lentivirus, retrovirus con replicazione lenta derivati da HIV-1.

Nel presente studio è stato effettuato il knockdown specifico del gene *KMT5A* nelle cellule GH3. Le cellule GH3 sono state seminate in piastre a 6 pozzetti a una confluenza (quantità di cellule aderenti) del 60%. Eseguita la trasfezione utilizzando il vettore GV493 le cellule sono state coltivate per 48 ore e poi esaminate per verificarne l'efficienza con un microscopio a fluorescenza invertita. A partire da queste è stata fatta una selezione per ottenere una linea cellulare trasfettata stabilmente con sh*KMT5A* mediante particelle lentivirali, la quale è poi stata coltivata in terreno completo integrato con 1 µg/mL di puomicina. Per effettuare il silenziamento del gene d'interesse è stato utilizzato uno short hairpin RNA (shRNA), una piccola sequenza di RNA che si ripiega a formare una struttura simile ad una forcina che verrà poi processata da un'RNasi Dicer a dare uno small interfering RNA (siRNA). L'efficienza del knockdown di *KMT5A* nelle cellule GH3 è stata valutata mediante Western Blot (WB) e RT-qPCR.

### 3.3 RT-qPCR

La Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) è una tecnica che misura in tempo reale i livelli di mRNA nei campioni per quantificare l'espressione genica, nel nostro caso del gene *KMT5A* dopo che ne è stato effettuato il knockdown nella linea cellulare GH3. Essa combina la Reverse Transcription PCR (RT-PCR) con la quantitative PCR (qPCR), anche detta Real Time PCR (da alcuni autori chiamata ambigualmente RT-PCR). La Reverse Transcription PCR prevede l'utilizzo di una trascrittasi inversa che a partire dall'mRNA prelevato dal campione sintetizza un doppio filamento di cDNA, necessario per l'esecuzione della PCR. La qPCR permette, mediante l'uso di coloranti o sonde fluorescenti, di monitorare il processo di amplificazione alla fine di ogni ciclo e quindi di conoscere in tempo reale la quantità di materiale genetico amplificato.

L'mRNA è stato estratto dalle cellule utilizzando il reagente TRIzol e per sintetizzare il filamento di cDNA corrispondente è stato utilizzato un kit di trascrizione inversa, ottenuto utilizzando primer specifici (Tabella 1) necessari alla trascrittasi inversa. Il filamento a doppia elica così ottenuto è stato utilizzato per condurre la qPCR e per monitorare l'accumulo di prodotto è stato utilizzato il colorante fluorescente FastStart Universal SYBR Green. La fluorescenza rilevata ad ogni ciclo viene utilizzata per calcolare la quantità iniziale di mRNA nel campione e il valore del ciclo soglia (Ct) ottenuto, ovvero il numero di cicli dopo il quale il prodotto di amplificazione è rilevabile, viene normalizzato con quello di un gene di riferimento, in questo caso *GAPDH*. Gli esperimenti di RT-qPCR sono stati eseguiti in triplicato per ciascun set di primer.

Tabella 1

**Table 1:** Primer sequences for qRT-PCR

Gene name		Primer sequences (5'→3')
Rat-KMT5A	F	ACCATTGGCCGGAATCTACA
	R	ATGACGGGGGTGGAGTTTTT
Rat-GAPDH	F	ACTCCATTCTCCACCTTTG
	R	CCCTGTTGCTGTAGCCATATT

### 3.4 Western Blot (WB)

Mentre la PCR viene utilizzata per quantificare specifiche porzioni di materiale genetico il WB è impiegato per rilevare e quantificare specifiche proteine in un campione, nel nostro caso la proteina KMT5A che dovrebbe essere assente in seguito a knockdown del suo gene codificante.

Le proteine totali sono state estratte dalle cellule utilizzando un buffer di lisi RIPA contenente PMSF (phenylmethlylsulfonyl fluoride), inibitore delle

proteasi che permette la conservazione delle proteine al di fuori dell'ambiente cellulare, e quantificate con un kit per il dosaggio delle proteine BCA (bicinchoninic acid). Le proteine sono state poi separate mediante SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis): SDS è un detergente che denatura le proteine e conferisce una carica negativa proporzionale alla massa, che mediante l'elettroforesi in gel di poliacrilamide permette una disposizione spaziale delle proteine differenziata in base alla carica elettrica e di conseguenza alla massa (le proteine con massa minore migrano più velocemente verso il catodo). Le proteine sono poi state trasferite su membrane di nitrocellulosa o polivinilidene fluoruro (PVDF) che fungono da supporto stabile per la rilevazione delle proteine. Le membrane sono state poi incubate con gli anticorpi primari durante la notte a 4°C. Questi legano le proteine di interesse, marcandole; gli anticorpi primari utilizzati includono: anti-KMT5A, anti-Ciclina D1, anti-β-catenina, anti-TCF1, anti-c-Myc, anti-Caspasi3 scissa, anti-GAPDH (controllo). Successivamente le membrane sono state incubate con gli anticorpi secondari corrispondenti per 90 minuti a temperatura ambiente. Questi, che si legano a quelli primari corrispondenti, sono coniugati con una molecola che permette il rilevamento del segnale, solitamente un enzima o un fluoroforo. Il segnale viene sviluppato tramite una reazione chimica, ad esempio con un substrato che emette luce, e le proteine di interesse marcate così visibili sono state rilevate, in questo caso utilizzando il reagente super ECL(enhanced chemiluminescence)-Plus, e quantificate utilizzando il software Image J.

### 3.5 CCK-8

Cell Counting Kit-8 è un saggio colorimetrico utile a valutare gli effetti del knockdown di *KMT5A* nelle colture cellulari di GH3 in vitro. In questo studio è stato utilizzato insieme ad altre tecniche. È basato sull'utilizzo di un reagente contenente un sale tetrazolico – che presenta un anello a cinque membri contenente quattro atomi di azoto e uno di carbonio – che è solitamente il WST-8 (Water-Soluble Tetrazolium salt 8). Questo viene ridotto a dare un prodotto colorato, il formazan, ad opera della deidrogenasi cellulare, enzima fondamentale in numerosi processi metabolici cellulari e quindi disponibile solo in presenza di cellule vive. Il formazan, solubile in acqua, va ad alterare la trasmittanza e di conseguenza l'assorbanza del liquido in cui si trova, ed essa può essere misurata con lo spettrofotometro.

Nel presente studio le cellule sono state contate e diluite a una concentrazione di  $1 \times 10^5$  cellule/mL. Successivamente sono state seminate in piastre da 96 pozzetti a una densità di  $1 \times 10^4$  cellule per pozzetto, con 5 pozzetti duplicati assegnati a ciascun gruppo sperimentale. Le piastre sono state poi poste in incubatore per un'incubazione continua. Dopo un periodo di coltura di 24 ore, 48 ore, 72 ore e 96 ore rispettivamente, 10  $\mu$ L di soluzione CCK-8 sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e ulteriormente incubati a 37 °C per 2 ore. Infine, è

stata misurata l'assorbanza a 450 nm utilizzando un lettore di micropiastre SpectraMax M5 e i risultati della misurazione sono stati utilizzati per generare una curva di proliferazione.

### 3.6 EdU

Sono state seminate un totale di  $1 \times 10^5$  cellule per pozzetto in piastre da 12 pozzetti. Le cellule sono state poi trattate rispettivamente con DMSO, UNC0379 (5  $\mu$ M) e UNC0379 (10  $\mu$ M). Il DMSO (dimetilsolfossido) è un composto organico che ad alte concentrazioni può indurre stress ossidativo e alterazione della membrana cellulare, andando in ultimo a provocare apoptosi cellulare. UNC0379 è un inibitore selettivo e competitivo del substrato di KMT5A, la lisina 20 (K20) dell'istone 4 (H4). Il blocco della mono-metilazione di H4K20 ha come effetti interferenza con il ciclo cellulare e alterazione dell'espressione genica e, di conseguenza, può portare ad apoptosi. Questa procedura, come CCK-8, è funzionale alla valutazione degli effetti del knockdown di *KMT5A* nelle cellule GH3, anche se con modalità differente. In seguito al trattamento con DMSO e UNC0379, 500  $\mu$ L di reagente EdU preparato sono stati aggiunti a ciascun pozzetto e le cellule sono state immediatamente fissate e colorate dopo un'incubazione di 2 ore. Infine, le cellule sono state osservate per valutare gli effetti del knockdown e fotografate utilizzando un microscopio a fluorescenza invertito.

### 3.7 Saggio di formazione di colonie

La riduzione della proliferazione cellulare provocata dal knockdown di *KMT5A*, valutato con CCK-8 ed Edu è stata ulteriormente verificata con un saggio di formazione di colonie.

Esso prevede una diluizione, in questo caso a 1000 cellule per pozzetto, a cui segue la crescita cellulare in colonie distinte, che saranno infine fissate e contate fornendo una misura della capacità delle cellule di sopravvivere e proliferare.

Le cellule GH3 in fase logaritmica sono state contate e 1000 cellule sono state incubate in ciascun pozzetto di una piastra da 6 pozzetti. Dopo l'adesione delle cellule il mezzo è stato cambiato ogni 3 giorni per 14 giorni e la crescita cellulare è stata osservata al microscopio. Successivamente, le cellule sono state fissate utilizzando paraformaldeide al 4% e colorate con violetto di cristallo all'1%. Le cellule sono state quindi osservate al microscopio, e il tasso di formazione dei cloni è stato determinato calcolando il numero di cloni osservati:

$$\text{tasso di formazione dei cloni} = \frac{\text{numero di cloni}}{\text{numero di cellule incubate}} \times 100\%$$

### 3.8 Citometria a flusso per valutare l'apoptosi

Le cellule sono state digerite con tripsina senza EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) e raccolte. Il mezzo raccolto è stato combinato con la soluzione di sospensione cellulare in una provetta da centrifuga da 10 mL e le cellule sono state raccolte tramite centrifugazione. Dopo la conta, le cellule sono state risospese in 100  $\mu$ L di tampone di legame Annexin V 1 $\times$  a una concentrazione di  $1 \times 10^6$  cellule/mL. Le cellule colorate sono poi state esaminate mediante citometria a flusso (FCM) entro 1 ora.

La citometria a flusso è una tecnica che mediante l'impiego di laser permette un'analisi multiparametrica di singole cellule o frammenti di esse che si trovano in sospensione. Il liquido di sospensione attraversa un capillare all'interno del quale ogni particella sospesa, colpita dal laser, devia il raggio luminoso; la capacità di ogni cellula, o frammento di essa, di deviare la luce (light scattering) viene quindi quantificata.

### 3.9 Analisi immunoistochimica

Tramite l'analisi immunoistochimica è stato possibile valutare l'espressione di KMT5A in sezioni di tessuto normali e con GH PitNETs.

I tessuti sono stati fissati con paraformaldeide al 4%, successivamente inclusi in blocchi di paraffina, sezionati con microtomo e poi deparaffinati e reidratati sequenzialmente. In seguito è stata effettuata la riparazione dell'antigene, processo necessario per esporre gli epitopi antigenici (di KMT5A) che possono essere stati mascherati durante la fissazione, e l'inattivazione della perossidasi endogena, che impedisce la catalizzazione della reazione cromogenica evitando così falsi positivi. È stato allora aggiunto l'anticorpo primario anti-KMT5A e incubato a 4 °C per tutta la notte. Successivamente le sezioni sono state lavate con PBS (Phosphate-Buffered Saline) per rimuovere l'anticorpo primario in eccesso mantenendo stabile il pH e poi incubate con l'anticorpo secondario, coniugato a perossidasi, a 37°C per 30 minuti. Sono quindi stati aggiunti perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) e 3,3'-diaminobenzidina (DAB): la perossidasi catalizza l'ossidazione di DAB da parte di  $H_2O_2$ . Il DAB così ossidato forma un precipitato marrone in corrispondenza del legame anticorpo-antigene, il cosiddetto segnale DAB, che è stato utilizzato per la visualizzazione dei campioni, controcolorati poi con ematossilina per evidenziare la morfologia cellulare. Dopo la disidratazione le immagini sono state catturate al microscopio e l'espressione di KMT5A è stata quantificata misurando l'assorbanza media delle aree positive (marroni) e negative (blu), osservabili in Figura 1.

### 3.10 Saggio tumorale su xenotrapianto di topo nudo

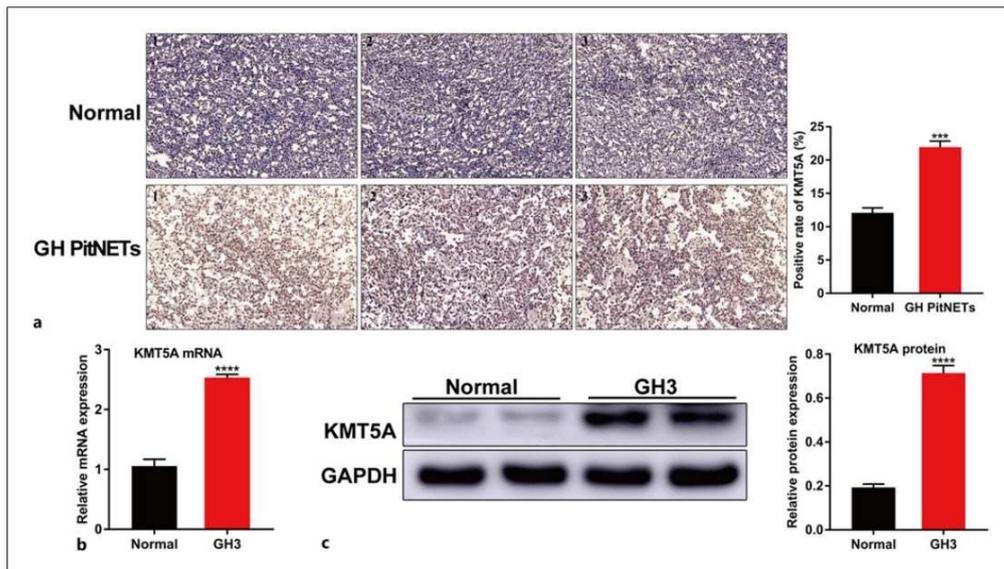
Uno xenotrapianto è stato utilizzato per valutare il ruolo di KMT5A nella progressione di GH PitNETs in vivo. Sono stati utilizzati topi nudi di ceppo BALB/c femmine (6 per gruppo), di età compresa tra 6 e 8 settimane e dal peso di circa 18-20 g. Questi topi, albini e privi di pelo, sono immunodeficienti: presentano infatti una mutazione a livello di *Foxn1* che causa assenza del timo con conseguente carenza o assenza di linfociti T maturi, permettendo quindi uno xenotrapianto senza rigetto. La sottocute ascellare dei topi nudi è stata utilizzata come sito per la formazione dei tumori. Le cellule GH3 in fase di crescita logaritmica sono state raccolte e risospese in PBS a una concentrazione di  $1 \times 10^7$  cellule/mL. Successivamente nella regione ascellare di ciascun topo è stata effettuata un'iniezione sottocutanea di 0,2 mL di sospensione cellulare ( $2 \times 10^6$  cellule/topo). Il volume del tumore è stato misurato ogni 7 giorni ed è stata tracciata una curva di crescita del tumore. Al 7° giorno dopo l'iniezione sottocutanea delle cellule GH3, il gruppo trattato con UNC0379 ha ricevuto un'iniezione intraperitoneale giornaliera di 1 mg/kg di UNC0379. Dopo 42 giorni i topi sono stati soppressi e i tumori trapiantati raccolti per successivi esperimenti di RT-qPCR, WB e immunohistochimica.

## 4. Risultati

### 4.1 Livello di espressione di KMT5A nei tessuti con GH PitNETs e ipofisari normali

Sono state prelevate tre porzioni di tessuto ipofisario normale da cadavere e tre porzioni di tessuto ipofisario presentante tumore GH-secernente e utilizzate per un'analisi comparativa dei livelli di espressione di KMT5A mediante immunohistochimica. I risultati hanno mostrato che l'espressione di KMT5A nel gruppo con GH PitNETs era significativamente maggiore rispetto a quella nel gruppo di tessuti ipofisari normali (Fig. 1a). Sono stati prelevati anche tessuti ipofisari da 12 ratti Wistar, ratti albini sani utilizzati come gruppo di controllo, per valutare i livelli di espressione di KMT5A rispetto alle cellule GH3, utilizzando RT-qPCR e WB. I risultati hanno dimostrato un'espressione notevolmente maggiore di KMT5A nelle cellule GH3 rispetto a quella nei tessuti ipofisari dei ratti Wistar (Fig. 1b,c).

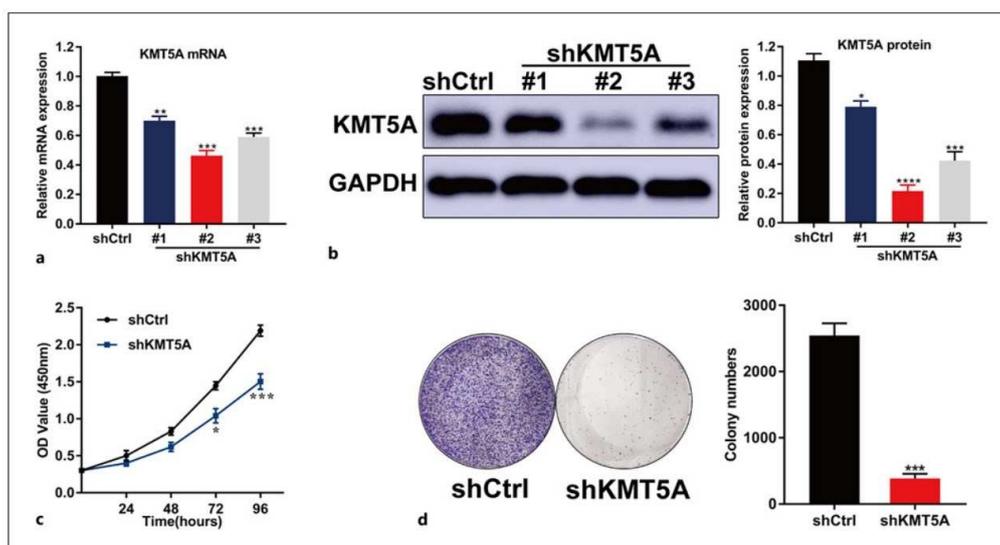
Figura 1



## 4.2 Effetti del knockdown di *KMT5A* sulle cellule GH3 in vitro

Per creare la linea cellulare GH3 con knockdown di *KMT5A* è stata utilizzata la trasfezione lentivirale e la sua efficienza è stata valutata tramite RT-qPCR e WB. Dai dati è emersa una significativa diminuzione del livello di espressione di *KMT5A* nei gruppi knockdown (#1, #2 e #3) rispetto ai gruppi di controllo (shCtrl). In particolare, il gruppo #2 ha mostrato la riduzione più significativa (Fig. 2a, b) e di conseguenza è stato selezionato per gli esperimenti successivi. Per valutare l'impatto del knockdown di *KMT5A* sulla proliferazione delle cellule GH3 sono stati utilizzati il saggio CCK-8 e il saggio di formazione di cloni. I risultati di entrambi hanno evidenziato una significativa diminuzione della capacità proliferativa del gruppo sh*KMT5A* rispetto al gruppo di controllo. Il saggio CCK-8 ha rivelato che, rispetto al gruppo shCtrl, la capacità proliferativa delle cellule GH3 nel gruppo sh*KMT5A* è diminuita 24 ore dopo la trasfezione, riduzione che diventava sempre più significativa man mano che la durata dell'esperimento progrediva (Fig. 2c). Il saggio di formazione di cloni ha confermato una significativa riduzione del numero di cloni cellulari nel gruppo sh*KMT5A* rispetto al gruppo shCtrl (Fig. 2d).

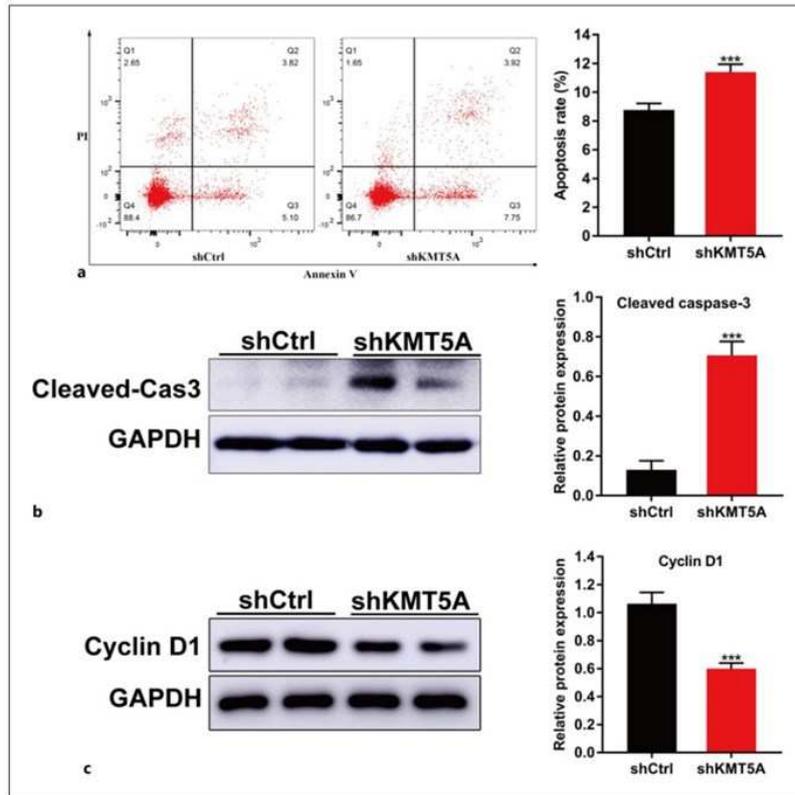
Figura 2



Come indicato nel capitolo introduttivo il blocco della mono-metilazione di H4K20, indotto tramite knockdown di *KMT5A*, ha come effetti interferenza con il ciclo cellulare e alterazione dell'espressione genica e, di conseguenza, può portare ad apoptosi. Per verificare questa ipotesi è stata utilizzata la citometria a flusso (FCM). I risultati hanno evidenziato che il gruppo sh*KMT5A* presentava una percentuale maggiore di cellule apoptotiche (11,67%) rispetto al gruppo shCtrl (8,92%) (Fig. 3a). È stato poi impiegato il Western Blot (WB) per investigare l'effetto del knockdown di *KMT5A* sull'espressione di Caspasi-3 scissa, una proteina correlata all'apoptosi, e di Ciclina D1, una proteina correlata

al ciclo cellulare, nelle cellule GH3. I risultati hanno evidenziato che, rispetto al gruppo shCtrl, il livello di espressione di Caspasi-3 scissa nel gruppo shKMT5A era aumentato (Fig. 3b), mentre il livello di espressione di Ciclina D1 era diminuito (Fig. 3c).

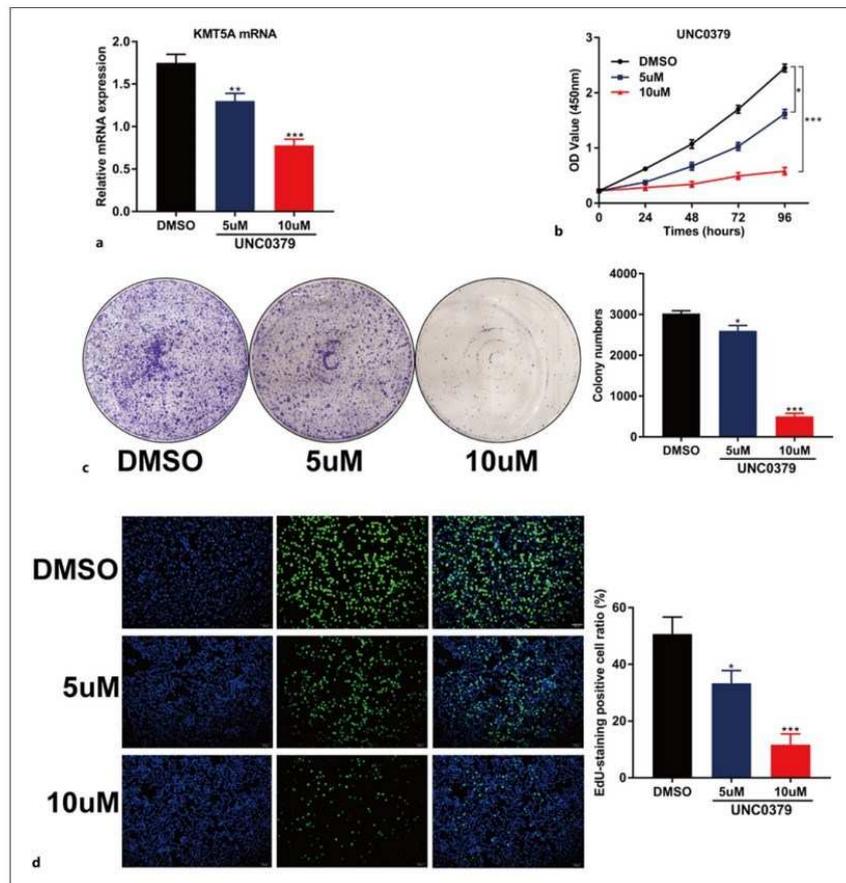
Figura 3



#### 4.3 Effetti dell'inibitore di KMT5A UNC0379 sulle cellule GH3 in vitro

I risultati appena descritti provano che il knockdown di *KMT5A* nelle cellule GH3 esercita effetti inibitori sulla proliferazione cellulare e induce l'apoptosi. Sono stati condotti altri studi per verificare se l'inibitore specifico di KMT5A, UNC0379, esibisse gli stessi effetti. I risultati della RT-qPCR hanno evidenziato che l'espressione di KMT5A diminuiva con l'aumento della concentrazione di UNC0379 (Fig. 4a). I risultati dei saggi CCK-8, di formazione di cloni e EdU hanno rivelato che il trattamento con UNC0379 inibiva la proliferazione delle cellule GH3 e questo effetto inibitorio diventava più marcato con l'aumento della durata del trattamento e della concentrazione di UNC0379 (Fig. 4b, c, d).

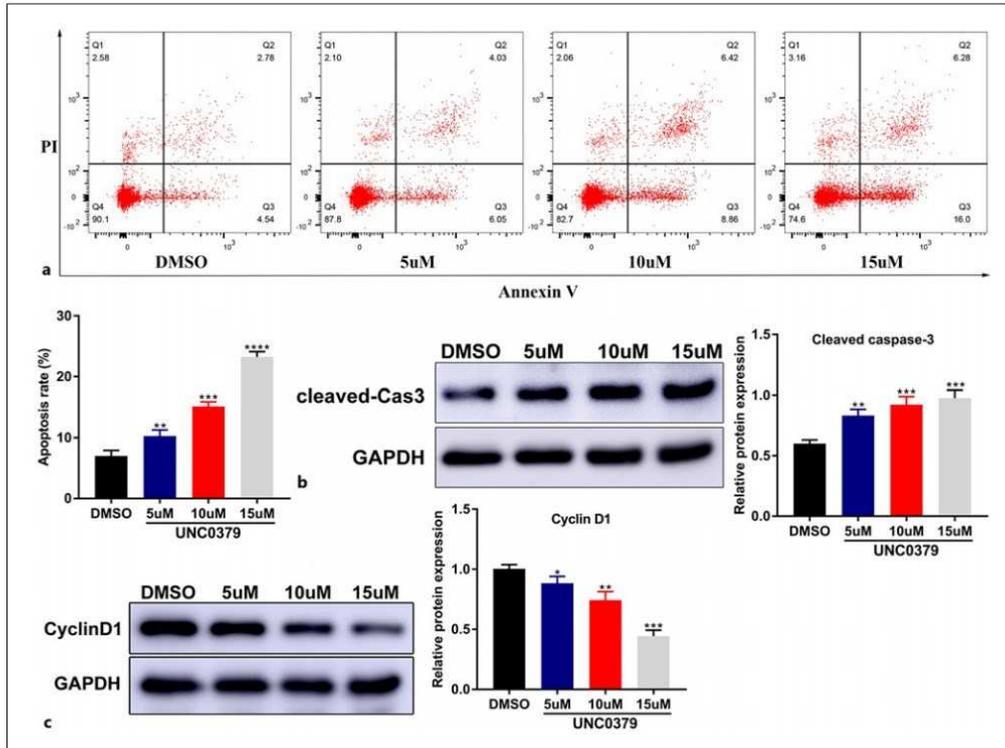
Figura 4



L'effetto di UNC0379 sull'apoptosi delle cellule GH3 è stato rilevato tramite FCM. I risultati hanno mostrato che, rispetto al gruppo trattato con DMSO, il tasso di apoptosi del gruppo trattato con UNC0379 era più elevato e aumentava con l'aumento della concentrazione di UNC0379 (Fig. 5a). È stata condotta anche un'analisi WB per valutare l'effetto di UNC0379 sui livelli di espressione di Caspasi-3 scissa e Ciclina D1 nelle cellule GH3. Rispetto al gruppo trattato con DMSO l'espressione di Caspasi-3 scissa era aumentata nel gruppo trattato con UNC0379 (Fig. 5b), mentre l'espressione di Ciclina D1 era diminuita (Fig.

5c), e queste variazioni erano diventavano più significative con il progressivo aumento della concentrazione di UNC0379.

Figura 5

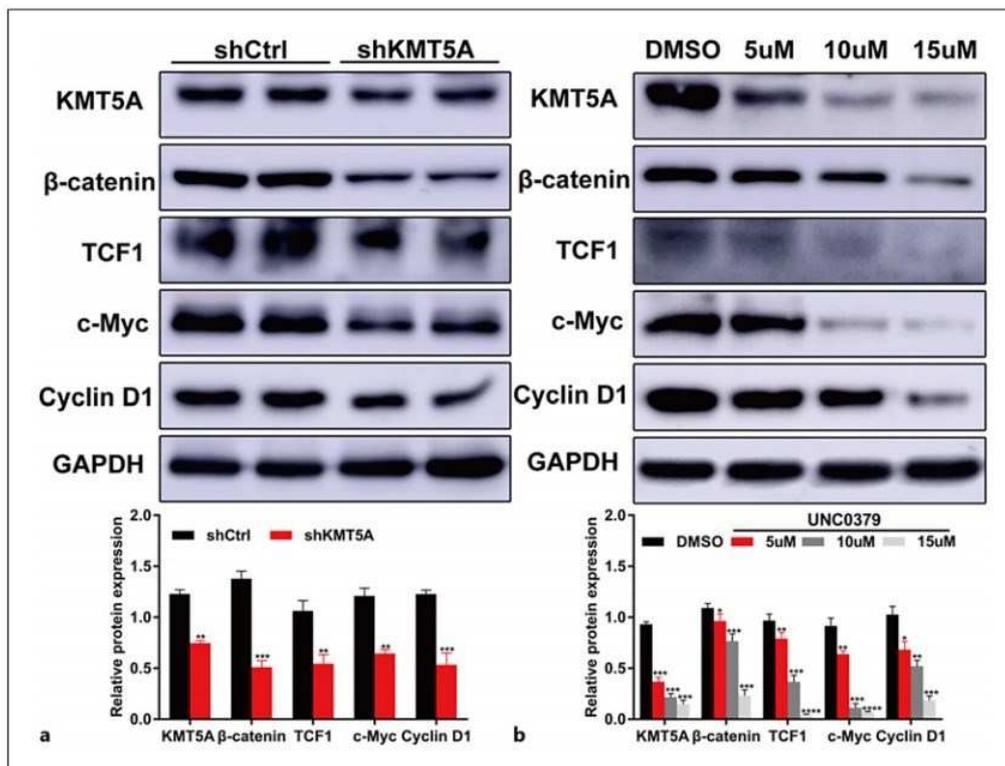


#### 4.4 L'attività di KMT5A in cellule GH3 in vitro potrebbe avvenire mediante la via Wnt/ $\beta$ -catenina

I risultati precedenti hanno dimostrato che il knockdown di *KMT5A* o il trattamento con UNC0379 inibiscono la progressione del ciclo cellulare e promuovono l'apoptosi nelle cellule GH3.

Per indagare ulteriormente il potenziale meccanismo molecolare attraverso il quale *KMT5A* influenza la proliferazione delle cellule GH3, abbiamo eseguito analisi WB. I risultati hanno evidenziato una significativa riduzione dell'espressione di  $\beta$ -catenina, TCF1, c-Myc e Ciclina D1 (due proteine target della via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina) dopo il knockdown di *KMT5A* (Fig. 6a). Allo stesso modo, UNC0379 ha inibito anche i livelli di espressione delle proteine *KMT5A*,  $\beta$ -catenina, TCF1, c-Myc e Ciclina D1 nelle cellule GH3 e l'effetto inibitorio è diventato più evidente con l'aumento della concentrazione di UNC0379 (Fig. 6b).

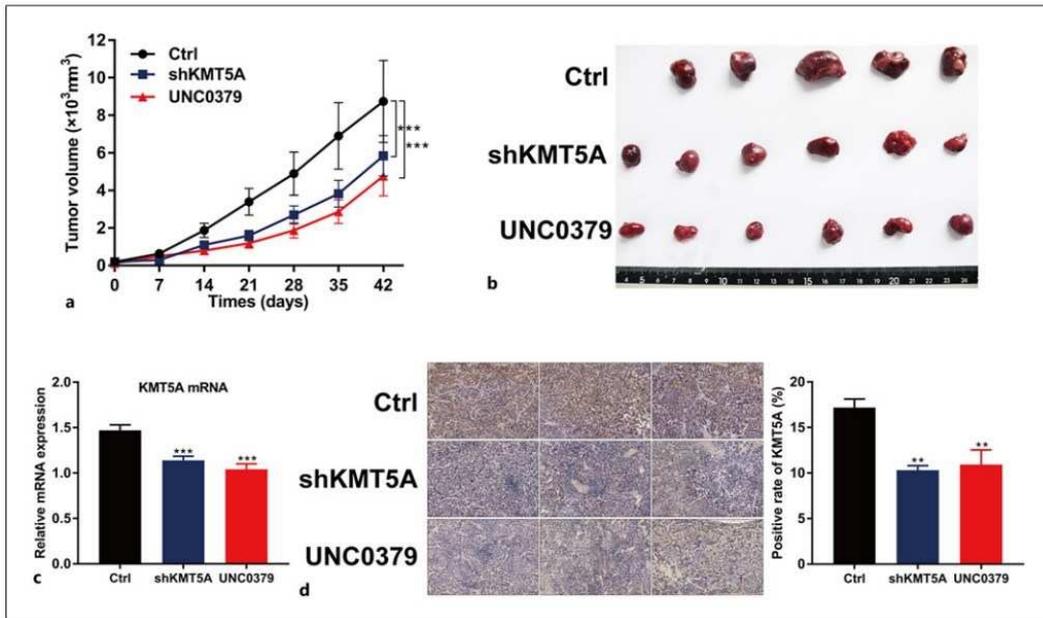
Figura 6



#### 4.5 Effetti del knockdown di *KMT5A* e del trattamento con UNC0379 su cellule GH3 in vivo

Visti i risultati ottenuti in vitro, successivamente sono stati valutati gli effetti del knockdown di *KMT5A* e del trattamento con UNC0379 in vivo. È stato realizzato uno xenotrapianto di GH PitNETs mediante iniezione sottocutanea di cellule GH3 in topi nudi. Il volume del tumore è stato misurato ogni 7 giorni dopo l'iniezione ed è stata tracciata una curva di crescita tumorale. I risultati hanno indicato che la crescita del tumore nei gruppi shKMT5A e UNC0379 era più lenta rispetto al gruppo di controllo (Fig. 7a). Dopo 42 giorni, i topi nudi sono stati soppressi e i tumori trapiantati sono stati raccolti e fotografati. Rispetto al gruppo di controllo, il volume del tumore nei gruppi shKMT5A e UNC0379 era significativamente ridotto (Fig. 7b). I risultati di RT-qPCR e immunohistochemica hanno mostrato che, rispetto al gruppo di controllo, il livello di espressione di *KMT5A* nei gruppi shKMT5A e UNC0379 era diminuito (Fig. 7c, d).

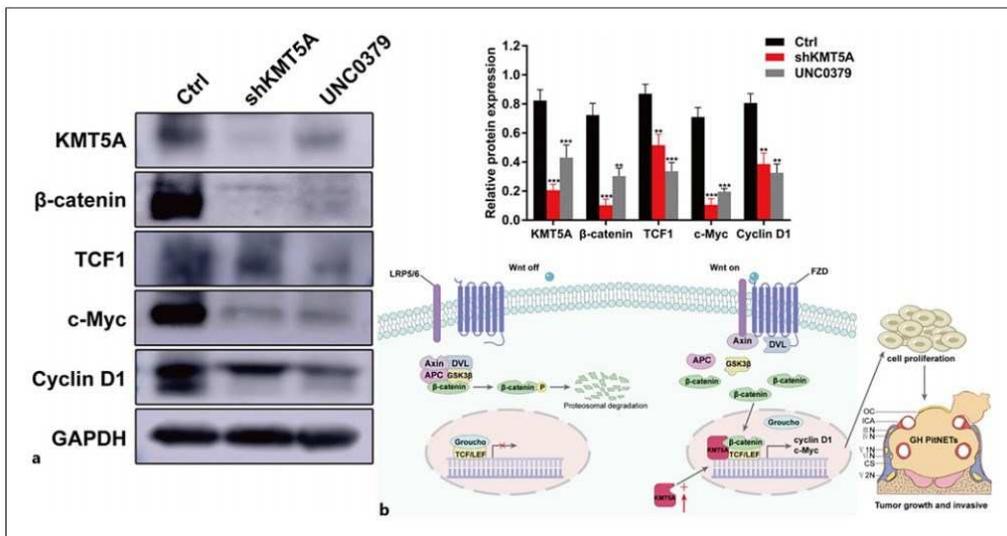
Figura 7



#### 4.6 L'attività di KMT5A in cellule GH3 in vivo potrebbe avvenire mediante la via Wnt/ $\beta$ -catenina

Gli effetti di KMT5A sulla crescita dei tumori sottoposti a xenotrapianto sono stati analizzati tramite WB. I risultati hanno evidenziato che il knockdown di *KMT5A* o il trattamento con UNC0379 risultano in una riduzione dei livelli di espressione della proteina KMT5A e di conseguenza anche di quelli di  $\beta$ -catenina, TCF1 e delle proteine target c-Myc e Ciclina D1. Questi risultati sono coerenti con i risultati sperimentali cellulari in vitro (Fig. 8a), suggerendo che KMT5A possa influenzare la proliferazione delle cellule GH3 e promuovere la progressione tumorale attraverso il percorso Wnt/ $\beta$ -catenina (Fig. 8b).

Figura 8



## 5. Discussione

I risultati ottenuti evidenziano il ruolo di *KMT5A* nella proliferazione di tumori ipofisari secernenti ormone della crescita: il knockdown del suo gene codificante, infatti, ha determinato sia in vitro che in vivo una minore crescita tumorale. Per dimostrare, come illustrato nell'introduzione, che il blocco della mono-metilazione di H4K20 indotto tramite knockdown di *KMT5A* abbia come effetti interferenza con il ciclo cellulare e alterazione dell'espressione genica e, di conseguenza, porti ad apoptosi, è stata misurata la variazione della presenza di proteine coinvolte nel ciclo cellulare, Ciclina D1, e nell'apoptosi, Caspasi-3 scissa, la cui espressione è rispettivamente diminuita ed aumentata. Il ruolo della Ciclina D1 è precedentemente stato descritto, mentre quello della Caspasi-3 necessita di alcune spiegazioni: essa viene sintetizzata in forma inattiva con il nome di Procaspasi-3. L'insorgenza di eventuali segnali apoptotici intrinseci o estrinseci determina l'attivazione di caspasi iniziatrici come la Caspasi-8 e la Caspasi-9 che effettuano un taglio proteolitico e quindi attivano la Procaspasi-3. La Caspasi-3 scissa quindi agisce tagliando proteine cellulari essenziali e portando alla disgregazione cellulare.

In precedenti studi è stato ipotizzato e provato il coinvolgimento di *KMT5A* nella modulazione della trascrizione di geni target della via di segnalazione Wnt/ $\beta$ -catenina e nell'accumulo nucleare della  $\beta$ -catenina stessa, e il ruolo che la deregolazione di questa via ha nell'insorgenza e nella progressione di diversi tipi di tumore tramite proliferazione cellulare incontrollata, alterazione della differenziazione cellulare e inibizione dell'apoptosi. Nel presente studio è stato dimostrato il coinvolgimento di questa via nell'insorgenza e nella progressione di tumori ipofisari secernenti ormone della crescita in quanto il knockdown di *KMT5A* ha comportato una significativa riduzione della  $\beta$ -catenina, con ruoli molteplici, e di geni target come *c-Myc* e *CCDN1*, le cui proteine corrispondenti sono coinvolte nel ciclo cellulare.

L'espressione di *KMT5A* stesso poi è regolata da altri fattori, come miR-335, che appartiene ai microRNA (miRNA), trascritti non codificanti lunghi circa 20-22 nucleotidi che svolgono un ruolo cruciale nella regolazione della crescita, migrazione e invasione cellulare mediante la modulazione dell'espressione genica. Sebbene esistano anche oncomiR, miR-335 è un soppressore della metastasi tumorale, in particolare nel cancro al seno, che agisce inibendo la proliferazione e il ciclo cellulare. È emerso che questo miRNA è in grado di legarsi alla regione 3'-UTR (untranslated region) di *KMT5A* regolandone negativamente l'espressione e che se sovraespresso può contrastare la progressione tumorale<sup>20</sup>.

Oltre a quelli appena citati, *KMT5A* interagisce attraverso vari pathway con numerosi altri fattori, anche non-istonici, modulandone l'espressione e quindi l'attività e venendo a sua volta modulato. Vediamone quindi alcuni esempi per avere una visione più ampia del ruolo di questo gene.

In un precedente studio gli autori hanno evidenziato l'importanza del lncRNA (trascritto non codificante lungo 200 nucleotidi o più) LINC00473, il

maggiormente overespresso in adenomi ipofisari, nel promuovere la proliferazione cellulare in tumori ipofisari. LINC00473 infatti, andando a regolare negativamente il miRNA miR-502-3p, permette l'up-regolazione di *KMT5A* che determina in ultimo un'aumentata metilazione di H4K20. Ciò a sua volta porta a sovraespressione di Ciclina D1 e CDK2, determinando un più rapido ciclo cellulare mediante la diminuzione della durata della transizione tra la fase G1 e la fase S e quindi una potenziata proliferazione tumorale<sup>21</sup>.

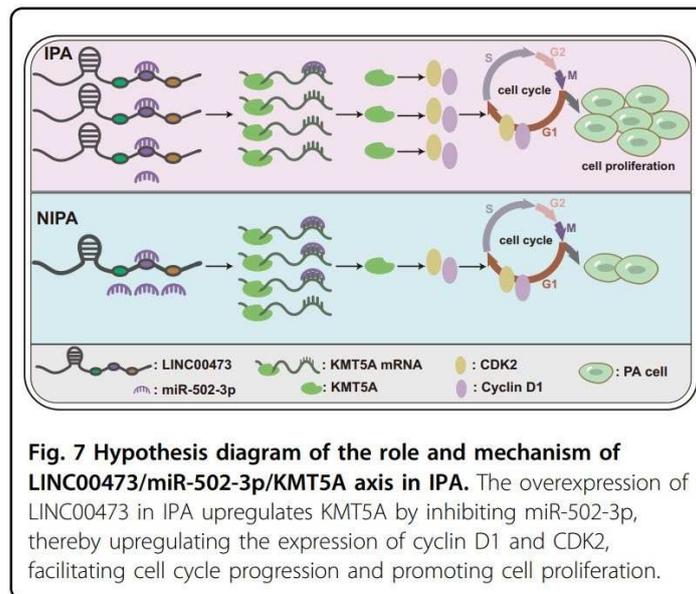
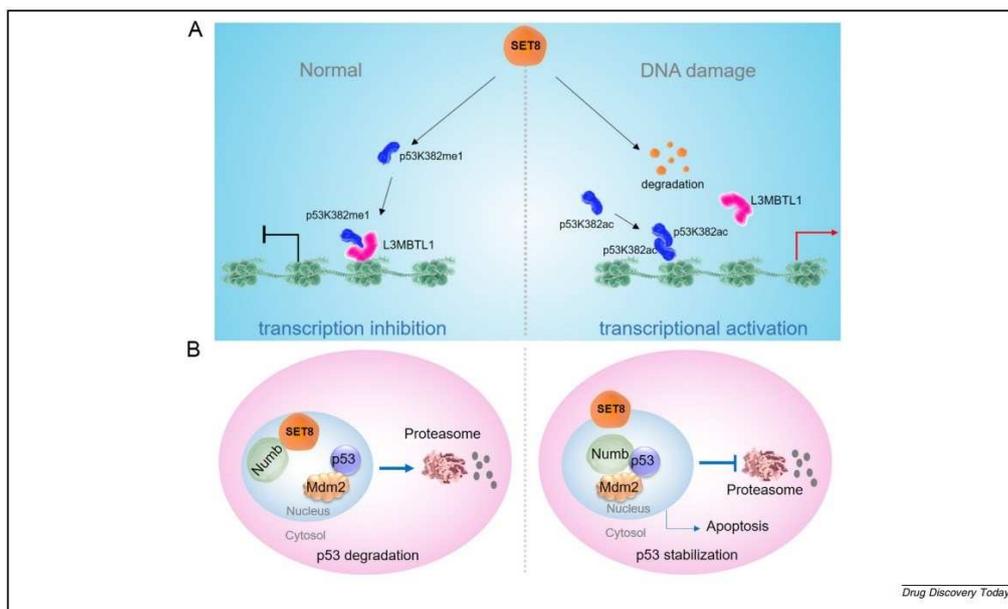


Immagine tratta da “Li, J.; Qian, Y.; Zhang, C.; Wang, W.; Qiao, Y.; Song, H.; Li, L.; Guo, J.; Lu, D.; Deng, X. LncRNA LINC00473 Is Involved in the Progression of Invasive Pituitary Adenoma by Upregulating KMT5A via ceRNA-Mediated miR-502-3p Evasion. *Cell Death Dis.* **2021**, *12* (6), 580. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03861-y>.”

*KMT5A* interagisce anche con l'importante fattore di trascrizione p53, inibendo la sua fondamentale attività di soppressore tumorale. È infatti in grado di reclutare specifiche proteine regolatrici quali Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1 (L3MBTL1) che andando a legare p53, dopo che la lisina 382 di questo viene metilata da *KMT5A* convertendolo a p53K382me1, ne blocca l'attività. Un'altra modalità di inibizione dell'attività di p53 avviene tramite la regolazione di Numb. Questa proteina si lega a Mdm2, fattore che controlla l'attività di p53, ne stabilizza il legame con p53 e ne impedisce la degradazione. *KMT5A*, però, mediando la fosforilazione di residui lisinici di Numb – Lys158 e Lys163 – impedisce la stabilizzazione del complesso Mdm2-p53 che viene ubiquitinato e degradato a livello del proteasoma<sup>11,22</sup>.



**FIGURE 2**  
 SET8 regulation of p53 transcriptional activity. (a) SET8-mediated p53 methylation allows Lethal(3)malignant brain tumor-like protein 1 (L3MBTL1) to recognize and bind to p53, thereby inhibiting the corresponding transcriptional activity. DNA damage prevents SET8-mediated p53 methylation and promotes transcriptional activation; (b) SET8-mediated Numb methylation inhibits the Numb-p53 interaction and leads to subsequent p53 ubiquitination and degradation.

Immagine tratta da “Yang, C.; Wang, K.; Zhou, Y.; Zhang, S.-L. Histone Lysine Methyltransferase SET8 Is a Novel Therapeutic Target for Cancer Treatment. *Drug Discov. Today* 2021, 26 (10), 2423–2430. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.004>”

A livello di tumore alla prostata poi è stato individuato un altro gene la cui proteina viene regolata da KMT5A. È CDC20 (Cell Division Cycle 20), proteina regolatrice necessaria nella mitosi per il movimento nucleare prima dell'anafase e per la separazione dei cromosomi, per la quale è stata supposta un'attività tumorale in svariati tumori, tra cui quello alla prostata. Dopo aver provato l'esistenza di una correlazione diretta tra i due geni – la diminuzione di KMT5A riduce l'espressione di *CDC20* ma al contrario una riduzione della presenza di *CDC20* non altera i livelli di espressione di *KMT5A* – sono stati indagati i meccanismi di regolazione e ne sono stati individuati due, uno diretto e uno indiretto. Quello diretto prevede la metilazione di H4K20 (da parte di KMT5A) all'interno del promotore di *CDC20*, con il conseguente potenziamento della trascrizione. Il meccanismo indiretto invece prevede l'inibizione di p53 attraverso la sua metilazione (a livello della lisina 382) da parte di KMT5A che libera la repressione trascrizionale di *CDC20*<sup>23</sup>.

Per quanto riguarda eventuali sviluppi metastatici un gene rilevante è *TWIST*, la cui proteina agisce come cofattore nella transizione epitelio-mesenchimale (EMT), primo passo verso la metastasi tumorale, e interagisce con KMT5A. KMT5A, attraverso la sua attività di mono-metilazione di H4K20 a H4K20me1, agisce come doppio modificatore epigenetico: viene reclutato da *TWIST* a livello delle regioni promotore di E-caderine e N-caderine contribuendo a reprimere la trascrizione delle prime e attivare la trascrizione delle seconde<sup>10</sup>. La funzione svolta da KMT5A quindi si rivela centrale nella proliferazione di adenomi ipofisari secernenti ormone della crescita e non solo. Ulteriori studi

riguardanti questo gene e gli elementi con cui interagisce possono dimostrarsi preziosi nell'identificazione di target e strategie terapeutiche potenzialmente valide per il trattamento di molteplici tipologie di tumori con diverse sedi.

## 6. Bibliografia

- (1) Wang, W.; Ma, L.; Zhao, Y.; Liu, M.; Ye, W.; Li, X. Research Progress on the Role of the Wnt Signaling Pathway in Pituitary Adenoma. *Front. Endocrinol.* **2023**, *14*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1216817>.
- (2) Mehta, G. U.; Lonser, R. R. Management of Hormone-Secreting Pituitary Adenomas. *Neuro-Oncol.* **2016**, now130. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now130>.
- (3) Jotanovic, J.; Tebani, A.; Hekmati, N.; Sivertsson, Å.; Lindskog, C.; Uhlén, M.; Gudjonsson, O.; Tsatsaris, E.; Engström, B. E.; Wikström, J.; Pontén, F.; Casar-Borota, O. Transcriptome Analysis Reveals Distinct Patterns Between the Invasive and Noninvasive Pituitary Neuroendocrine Tumors. *J. Endocr. Soc.* **2024**, *8* (5), bvae040. <https://doi.org/10.1210/jendso/bvae040>.
- (4) Torregrosa-Quesada, M. E.; García-Martínez, A.; Sánchez-Barbie, A.; Silva-Ortega, S.; Cámara, R.; Fajardo, C.; Lamas, C.; Aranda, I.; Pico, A. The Silent Variants of Pituitary Tumors: Demographic, Radiological and Molecular Characteristics. *J. Endocrinol. Invest.* **2021**, *44* (8), 1637–1648. <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01468-2>.
- (5) Caimari, F.; Korbonits, M. Novel Genetic Causes of Pituitary Adenomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2016**, *22* (20), 5030–5042. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0452>.
- (6) Vasilev, V.; Daly, A. F.; Trivellin, G.; Stratakis, C. A.; Zacharieva, S.; Beckers, A. HEREDITARY ENDOCRINE TUMOURS: CURRENT STATE-OF-THE-ART AND RESEARCH OPPORTUNITIES: The Roles of AIP and GPR101 in Familial Isolated Pituitary Adenomas (FIPA). *Endocr. Relat. Cancer* **2020**, *27* (8), T77–T86. <https://doi.org/10.1530/ERC-20-0015>.
- (7) Dworakowska, D.; Wlodek, E.; Leontiou, C. A.; Igreja, S.; Cakir, M.; Teng, M.; Prodromou, N.; Góth, M. I.; Grozinsky-Glasberg, S.; Gueorguiev, M.; Kola, B.; Korbonits, M.; Grossman, A. B. Activation of RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR Pathways in Pituitary Adenomas and Their Effects on Downstream Effectors. *Endocr. Relat. Cancer* **2009**, *16* (4), 1329–1338. <https://doi.org/10.1677/ERC-09-0101>.
- (8) Derwich, A.; Sykutera, M.; Bromińska, B.; Rubiś, B.; Ruchała, M.; Sawicka-Gutaj, N. The Role of Activation of PI3K/AKT/mTOR and RAF/MEK/ERK Pathways in Aggressive Pituitary Adenomas-New Potential Therapeutic Approach-A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24* (13), 10952. <https://doi.org/10.3390/ijms241310952>.
- (9) Suojun, Z.; Feng, W.; Dongsheng, G.; Ting, L. Targeting Raf/MEK/ERK Pathway in Pituitary Adenomas. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **2012**, *48* (3), 389–395. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.11.002>.
- (10) Yang, F.; Sun, L.; Li, Q.; Han, X.; Lei, L.; Zhang, H.; Shang, Y. SET8 Promotes Epithelial–Mesenchymal Transition and Confers TWIST Dual Transcriptional Activities. *EMBO J.* **2012**, *31* (1), 110–123. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.364>.
- (11) Yang, C.; Wang, K.; Zhou, Y.; Zhang, S.-L. Histone Lysine Methyltransferase SET8 Is a Novel Therapeutic Target for Cancer

- Treatment. *Drug Discov. Today* **2021**, *26* (10), 2423–2430. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.004>.
- (12) Wu, S.; Wang, W.; Kong, X.; Congdon, L. M.; Yokomori, K.; Kirschner, M. W.; Rice, J. C. Dynamic Regulation of the PR-Set7 Histone Methyltransferase Is Required for Normal Cell Cycle Progression. *Genes Dev.* **2010**, *24* (22), 2531–2542. <https://doi.org/10.1101/gad.1984210>.
- (13) Wu, S.; Rice, J. C. A New Regulator of the Cell Cycle: The PR-Set7 Histone Methyltransferase. *Cell Cycle Georget. Tex* **2011**, *10* (1), 68–72. <https://doi.org/10.4161/cc.10.1.14363>.
- (14) Liu, J.; Xiao, Q.; Xiao, J.; Niu, C.; Li, Y.; Zhang, X.; Zhou, Z.; Shu, G.; Yin, G. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signalling: Function, Biological Mechanisms, and Therapeutic Opportunities. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2022**, *7* (1), 3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>.
- (15) Taciak, B.; Pruszyńska, I.; Kiraga, L.; Bialasek, M.; Krol, M. Wnt Signaling Pathway in Development and Cancer. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* **2018**, *69* (2). <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.2.07>.
- (16) Li, Z.; Nie, F.; Wang, S.; Li, L. Histone H4 Lys 20 Monomethylation by Histone Methylase SET8 Mediates Wnt Target Gene Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108* (8), 3116–3123. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009353108>.
- (17) Semba, S.; Han, S. Y.; Ikeda, H.; Horii, A. Frequent Nuclear Accumulation of Beta-Catenin in Pituitary Adenoma. *Cancer* **2001**, *91* (1), 42–48. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010101\)91:1<42::aid-encr6>3.0.co;2-7](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010101)91:1<42::aid-encr6>3.0.co;2-7).
- (18) Li, W.; Zhang, Y.; Zhang, M.; Huang, G.; Zhang, Q. Wnt4 Is Overexpressed in Human Pituitary Adenomas and Is Associated with Tumor Invasion. *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* **2014**, *21* (1), 137–141. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2013.04.034>.
- (19) Taghavi, S. F.; Ghorbani, M.; Panahi, M.; Nazem, S.; Karimi, M.; Salimi, V.; Tavakoli-Yaraki, M. Differential Expression Levels of  $\beta$ -Catenin Are Associated with Invasive Behavior of Both Functional and Non-Functional Pituitary Neuroendocrine Tumor (PitNET). *Mol. Biol. Rep.* **2023**, *50* (8), 6425–6434. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08523-0>.
- (20) Wang, Y.; Wang, H.; Ding, Y.; Li, Y.; Chen, S.; Zhang, L.; Wu, H.; Zhou, J.; Duan, K.; Wang, W.; Chen, C.; Yang, Q. N-Peptide of vMIP-II Reverses Paclitaxel-Resistance by Regulating miRNA-335 in Breast Cancer. *Int. J. Oncol.* **2017**, *51* (3), 918–930. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4076>.
- (21) Li, J.; Qian, Y.; Zhang, C.; Wang, W.; Qiao, Y.; Song, H.; Li, L.; Guo, J.; Lu, D.; Deng, X. LncRNA LINC00473 Is Involved in the Progression of Invasive Pituitary Adenoma by Upregulating KMT5A via ceRNA-Mediated miR-502-3p Evasion. *Cell Death Dis.* **2021**, *12* (6), 580. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03861-y>.
- (22) Dhami, G. K.; Liu, H.; Galka, M.; Voss, C.; Wei, R.; Muranko, K.; Kaneko, T.; Cregan, S. P.; Li, L.; Li, S. S.-C. Dynamic Methylation of Numb by Set8 Regulates Its Binding to P53 and Apoptosis. *Mol. Cell* **2013**, *50* (4), 565–576. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.028>.

- (23) Alebady, Z. A. H.; Azizyan, M.; Nakjang, S.; Lishman-Walker, E.; Al-Kharaif, D.; Walker, S.; Choo, H. X.; Garnham, R.; Scott, E.; Johnson, K. L.; Robson, C. N.; Coffey, K. CDC20 Is Regulated by the Histone Methyltransferase, KMT5A, in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers* **2023**, *15* (14), 3597. <https://doi.org/10.3390/cancers15143597>.

# Lysine Methyltransferase 5A Promotes the Progression of Growth Hormone Pituitary Neuroendocrine Tumors through the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway

Junjun Li<sup>a</sup> Hao Song<sup>a,b</sup> Ting Chen<sup>a</sup> Sixi Zhang<sup>a</sup> Chao Zhang<sup>c</sup>  
Chen Ma<sup>a</sup> Lingye Zhang<sup>a</sup> Tengfei Wang<sup>a</sup> Yuan Qian<sup>d</sup> Xingli Deng<sup>a,e</sup>

<sup>a</sup>Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, China;

<sup>b</sup>Guangyuan Central Hospital, Guangyuan, China; <sup>c</sup>Xiangyang First People's Hospital, Xiangyang, China; <sup>d</sup>The Clinical Medical Research Center for Obstetrics and Gynecology (Yunnan Joint Key Laboratory), Kunming City of Maternal and Child Health Hospital, Kunming City of Women and Children Hospital, Kunming, China;

<sup>e</sup>Puer People's Hospital, Puer, China

## Keywords

KMT5A · PitNETs · Growth hormone · Wnt/ $\beta$ -catenin

## Abstract

**Introduction:** Growth hormone (GH) secreting pituitary adenoma is considered one of the most harmful types of Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNETs). Our previous research has found that high expression of Lysine methyltransferase 5A (KMT5A) is closely related to the proliferation of PitNETs. The aim of this study was to investigate the role and molecular mechanism of KMT5A in the progression of GH PitNETs. **Methods:** Immunohistochemistry, qRT-PCR, and Western blot (WB) were used to assess the expression levels of KMT5A in human normal pituitary and GH PitNETs, as well as in rat normal pituitary and GH3 cells. Additionally, we utilized RNA interference technology and treatment with a selective KMT5A inhibitor to decrease the expression of KMT5A in GH3 cells. CCK-8, EdU, flow cytometry (FCM), clone formation, and WB assay were further employed to evaluate the impact of KMT5A on the proliferation of GH3 cells in vitro. A xenograft model was established to evaluate the role of KMT5A in GH PitNETs

progression in vivo. **Results:** KMT5A was highly expressed in GH PitNETs and GH3 cells. Moreover, the reduction of KMT5A expression led to inhibited growth of GH PitNETs and increased apoptosis of tumor cells, as indicated by the findings from CCK-8, EdU, clone formation, and FCM assays. Additionally, WB analysis identified the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway as a potential mechanism through which KMT5A promotes GH PitNETs progression. **Conclusion:** Our research suggests that KMT5A may facilitate the progression of GH PitNETs via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. Therefore, KMT5A may serve as a potential therapeutic target and molecular biomarker for GH PitNETs.

© 2024 The Author(s).

Published by S. Karger AG, Basel

## Introduction

GH PitNETs, accounting for about 12% of all pituitary adenomas, are common functional pituitary adenomas that pose a significant threat to human health [1]. As the

Junjun Li and Hao Song contributed equally to this work.

tumor grows, it can exert space-occupying effects, such as optic chiasm compression leading to visual field loss, decreased vision, or even blindness, and third ventricle compression resulting in obstructive hydrocephalus [2, 3]. Moreover, patients with GH PitNETs who are exposed to prolonged excessive GH secretion may lead to physical deformities and extensive systemic manifestations, including gigantism, acromegaly, goiter, osteoarthritis, colon polyps, sleep apnea, reproductive disorders, diabetes, hypertension, and cardiovascular diseases, which seriously impact the quality of patients' life and life-span [4–6].

Surgical resection of tumors is the primary treatment for GH PitNETs, which can effectively reduce serum GH levels and alleviate the effects of the tumor's space-occupying impact. Pharmacological therapy is often employed as a secondary option for patients with persistent GH secretion post-surgery involving somatostatin receptor ligands and dopamine agonists. Radiotherapy is a potential alternative if medical treatment is unavailable or unsuccessful. However, a minority of GH PitNETs grow aggressively and rapidly, cannot be controlled even after standardized surgical, pharmacological, and radiological treatments, and have early recurrence [7, 8]. Therefore, it is essential to explore new molecular biomarkers and therapeutic targets for GH PitNETs to enhance the clinical diagnosis and treatment of GH PitNETs.

Our previous research has revealed that LINC00473 promotes the progression of PitNETs by up-regulating KMT5A through a ceRNA-mediated evasion of miR-502-3p [15]. KMT5A, also known as SET8, SETD8, PR-Set7, is a member of the SET gene family, located on the long arm of human chromosome 12 (12q24.31). In normal physiological conditions, KMT5A plays a critical role in regulating gene transcription and replication initiation, maintaining genome stability, and controlling the cell cycle [9, 10]. Recently, overexpression of KMT5A has been observed in various tumors, including esophageal squamous cell carcinoma [11], prostate cancer [12], and breast cancer [13]. KMT5A exerts its tumor promoting effects through regulating signaling pathways such as Wnt/ $\beta$ -catenin, p53, and TWIST [14].

However, the role of KMT5A in GH PitNETs and its specific molecular mechanisms remain unclear. The objective of this study is to ascertain the involvement of KMT5A in the progression of GH PitNETs and elucidate its potential mechanisms through *in vitro* and *in vivo* experiments.

**Table 1.** Primer sequences for qRT-PCR

Gene name	Primer sequences (5'→3')
Rat-KMT5A	
F	ACCATTGGCCGGAATCTACA
R	ATGACGGGGTGGAGTTTT
Rat-GAPDH	
F	ACTCCATTCTCCACCTTTG
R	CCCTGTTGCTGTAGCCATATT

## Methods

### Tissues Collecting

Normal human pituitary tissues were obtained from cadaver specimens without any endocrine diseases at the Anatomy Department of Kunming Medical University. Pathologically confirmed GH PitNET tissues were obtained from intraoperative specimens from the Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University. The study was approved by the Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University (No. 2019-0816).

### Cell Line and Cell Culture

The GH3 cell line (NO.1101RAT-PMMC000008) was obtained from the Cell Resource Center of the Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences. All GH3 cells were cultivated in DMEM medium (Hyclone, Logan Utah, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (BI, Kibbutz Beit Haemek, Israel) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco, NY, USA) in a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator.

### Lentiviral Transfection

The KMT5A gene was specifically knocked down in GH3 cells using the vector GV493 (hU6-MCS-CBh-gcGFP-IRES-puromycin) through services provided by GenePharma Company (Shanghai, China). Prior to transfection, GH3 cells were seeded in 6-well plates at a confluence of 60%. Transfected cells were cultured for 48 h and then examined for transfection efficiency using an inverted fluorescent microscope. Concurrently, the shKMT5A stably transfected cell line was generated by screen with complete medium supplement with 1  $\mu$ g/mL puromycin, as recommended by the lentiviral stable transfection instructions. The knockdown efficiency of KMT5A in GH3 cells was assessed using WB and qRT-PCR. The stably transfected cell lines were subsequently constructed and cryopreserved for future use.

### qRT-PCR

Total RNA was extracted from cells using TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA). Subsequently, cDNA was synthesized employing a reverse transcription kit (Thermo Scientific, MA, USA). qRT-PCR was conducted using the FastStart Universal SYBR Green (Roche, Basel, Switzerland) with GAPDH utilized as the reference gene. Amplification was detected using the TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix II machine (Applied Biosystems, CA, USA). qRT-PCR experiments were performed in triplicate for each primer set. The primer sequences are shown in Table 1.

### WB Analysis

Total proteins were extracted using RIPA lysis buffer containing PMSF (Solarbio, Beijing, China) and quantified with BCA protein assay kit (Beyotime, Shanghai, China). The proteins were separated by SDS-PAGE (Beyotime, Shanghai, China) and transferred on PVDF membranes (Millipore, MA, USA). The membranes were then incubated with the primary antibodies overnight at 4°C. The primary antibodies include: anti-KMT5A (Abcam, ab111691, Cambridge, UK), anti-cyclin D1 (Abcam, ab16663, Cambridge, UK), anti- $\beta$ -catenin (Abcam, ab32572, Cambridge, UK), anti-TCF1 (Sigma-Aldrich, ZRB1460, St. Louis, MO, USA), anti-c-Myc (Abcam, ab19312, Cambridge, UK), anti-cleaved caspase-3 (Abcam, ab32043, Cambridge, UK), anti-GAPDH (Abcam, ab128915, Cambridge, UK). Next, the membranes were incubated with the corresponding secondary antibody (Abcam, ab205718, Cambridge, UK) for 90 min at room temperature. Proteins were detected using the super ECL-Plus reagent (Millipore, MA, USA) and quantified using Image J software.

### CCK-8

Cells were counted and diluted a concentration of  $1 \times 10^5$  cells/mL. Cells were seeded into 96-well plates at a density of  $1 \times 10^4$  cells per well, with 5 duplicate wells assigned to each experimental group. Subsequently, the plates were placed in an incubator for continuous incubation. Following a culture period of 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h respectively, 10  $\mu$ L CCK-8 solution (Dojindo, Kumamoto, Japan) was added to each well and further incubated at 37°C for 2 h. Finally, the absorbance at 450 nm was measured using a SpectraMax M5 (Molecular Devices, CA, USA) microplate reader, and the measurement results were used to generate a proliferation curve.

### EdU

A total of  $1 \times 10^5$  cells were seeded per well in 12-well plates. The cells were then treated with DMSO, UNC0379 (5  $\mu$ M) and UNC0379 (10  $\mu$ M) respectively. EdU reagent was prepared following the instructions provided in the EdU cell proliferation detection kit (Ruibo Biotechnology Co., LTD., Guangzhou, China). Subsequently, 500  $\mu$ L prepared EdU reagent was added to each well, and the cells were immediately fixed and stained after incubation for 2 h. Finally, the cells were observed and photographed using an inverted fluorescence microscope. Image analysis was performed by Image J software.

### Colony Formation Assay

GH3 cells in the logarithmic phase were counted, and 1,000 cells were incubated in each well of a 6-well plate. After cell adherence, the medium was changed every 3 days for 14 days, and cell growth was observed under a microscope. Afterward, the cells were fixed using 4% paraformaldehyde and stained with 1% crystal violet. Subsequently, the cells were observed under a microscope, and the rate of clone formation rate was determined by calculating the number of observed cell clones, clone formation rate = (clone number/number of incubated cells)  $\times$  100%.

### Cell Apoptosis

The cells were digested with trypsin without EDTA and collected. The collected medium was combined with the cell suspension solution in a 10 mL centrifuge tube, and the cells were harvested through centrifugation. After counting, the cells were

resuspended in 100  $\mu$ L 1 $\times$ Annexin V binding buffer (Solarbio, Beijing, China) at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/mL. Following the instructions of the Annexin V 633 Apoptosis Detection Kit (Dojindo, Kumamoto, Japan), the stained cells were examined by FCM within 1 h, and the data were analyzed using FlowJo V 10.6.2.

### Immunohistochemical Analysis

Tissues were fixed using 4% paraformaldehyde, and subsequently embedded in paraffin blocks, and then dewaxed and rehydrated sequentially. After antigen repair and endogenous peroxidase inactivation, the primary antibody anti-KMT5A (Abcam, ab111691, Cambridge, UK) was added and incubated at 4°C overnight. Next, the slices were washed with PBS and incubated with secondary antibody (Abcam, ab205718, Cambridge, UK) at 37°C for 30 min. The developed DAB signal was used for visualization, and the samples were counterstained with hematoxylin. Following dehydration, images were captured under microscope. KMT5A expression was quantified by measuring the average absorbance of the positive (brown) and negative (blue) staining using Image J.

### Nude Mouse Xenograft Tumor Assay

Female BALB/c nude mice ( $n = 6$  per group), aged 6–8 weeks and weighing approximately 18–20 g were utilized. The axillary subcutis of the nude mice served as the site for tumor formation. The logarithmically growing GH3 cells were harvested and resuspended in PBS at a concentration of  $1 \times 10^7$  cells/mL. Subsequently, each nude mouse's axillary region was injected subcutaneously with 0.2 mL cell suspension ( $2 \times 10^6$  cells/mouse). Tumor volume was measured every 7 days, and the tumor growth curve was plotted. On the 7th day after subcutaneous injection of GH3 cells, the UNC0379 group received a daily intraperitoneal injection of 1 mg/kg of UNC0379 (a selective KMT5A inhibitor). After 42 days, the nude mice were euthanized, and the transplanted tumors were harvested for subsequent qRT-PCR, WB, and immunohistochemistry experiments. All procedures were conducted in accordance with the guidelines and regulations of the Animal Ethics Committee of Kunming Medical University (No. kmmu20190718).

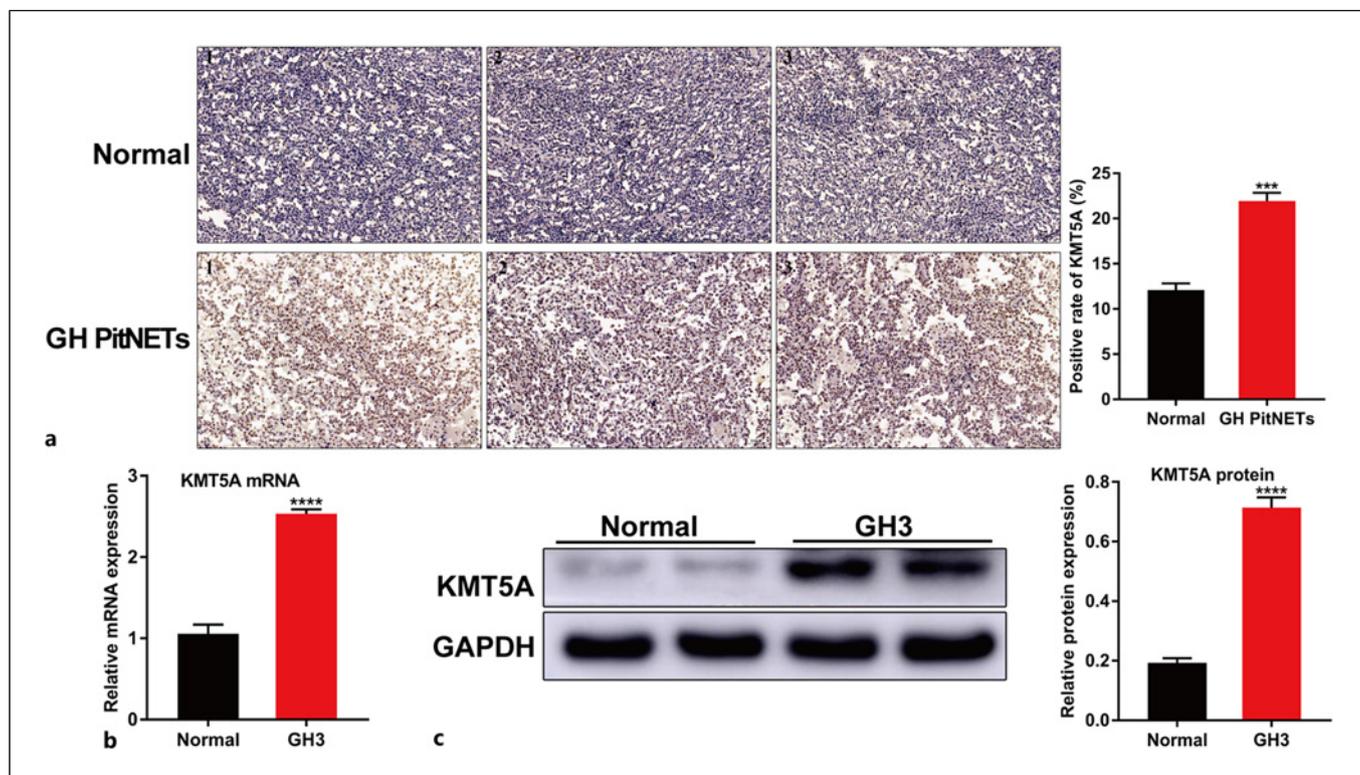
### Statistical Analysis

The statistical analysis was performed using SPSS version 25.0 software. The data were presented as mean  $\pm$  standard deviation. Intergroup comparisons were conducted using an independent sample  $t$  test, while multigroup comparisons were conducted using the one-way analysis of variance.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### Expression Level of KMT5A in GH PitNET Tissue Is Higher than That in Normal Pituitary Tissues

Three cadaver-derived normal pituitary tissues and three GH PitNET tissues were obtained for comparative analysis of KMT5A expression levels using immunohistochemistry. The results showed that KMT5A expression in GH PitNETs group was significantly higher



**Fig. 1.** Expression of KMT5A in normal human pituitary tissues, GH PitNET tissues, Wistar rat pituitary tissues and GH3 cells. **a** Immunohistochemical analysis of the expression level of KMT5A in human normal pituitary tissues and GH PitNET tissues. **b** Detection of KMT5A mRNA expression levels in Wistar rat pituitary tissues and GH3 cells by qRT-PCR. **c** Detection of KMT5A protein expression levels in Wistar rat pituitary tissues and GH3 cells by WB. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Bars represent mean  $\pm$  SD.

than that in the normal pituitary tissue group (shown in Fig. 1a).

Pituitary tissues from 12 Wistar rats were obtained to assess the expression levels of KMT5A in both Wistar rat pituitary tissues and GH3 cells using qRT-PCR and WB analysis. The findings demonstrated a notably elevated expression of KMT5A in GH3 cells compared with that in Wistar rat pituitary tissues (shown in Fig. 1b, c).

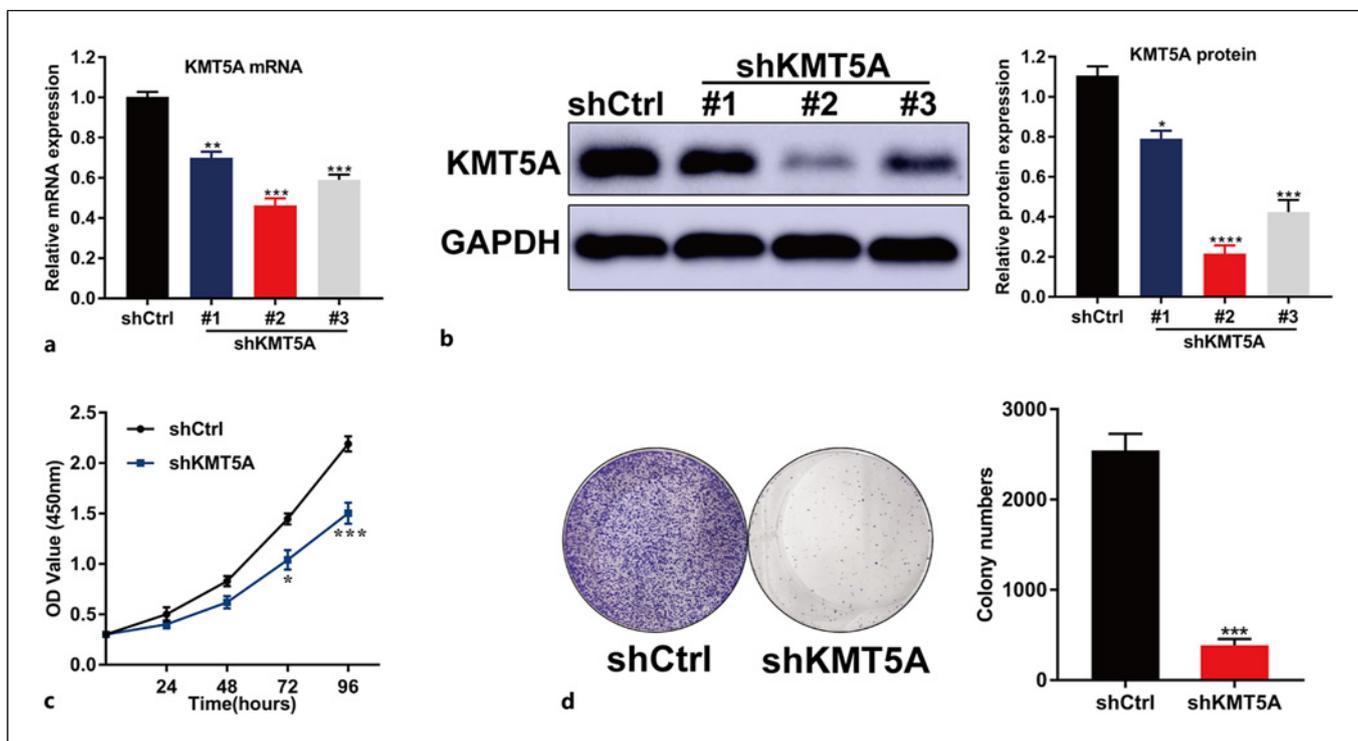
#### *Knockdown of KMT5A Suppresses the Proliferation of GH3 Cells*

To establish the KMT5A knockdown GH3 cell line, shRNA was constructed and transduced into GH3 cells. The transfection efficiency was assessed by qRT-PCR and WB analyses. The data revealed a notable decrease in the expression level of KMT5A in knockdown groups #1, #2, and #3 compared with shCtrl groups. Notably, group #2 displayed the most significant reduction (shown in Fig. 2a, b). Consequently, group #2 was selected as the shKMT5A group for subsequent experiments.

The CCK-8 assay was utilized to assess the impact of KMT5A knockdown on the proliferation of GH3 cells. The results showed that compared with the shCtrl group, the proliferation ability of GH3 cells in the shKMT5A group was decreased 24 h after transfection. Furthermore, this reduction in proliferation became significant as the experimental duration progressed to 72 h post-transfection (shown in Fig. 2c). Subsequently, these outcomes were validated by clone formation assay, which demonstrated a significant reduction in the number of cell clones in the shKMT5A group compared with the shCtrl group (shown in Fig. 2d).

#### *Knockdown of KMT5A Induced GH3 Cell Apoptosis and Inhibited Cell Cycle Progression*

FCM was employed to detect the impact of KMT5A knockdown on GH3 cell apoptosis. The results showed that the shKMT5A group exhibited a higher percentage of apoptotic cells (11.67%) compared with the shCtrl group (8.92%) (shown in Fig. 3a). WB was utilized to investigate the effect of the KMT5A knockdown on the expression of



**Fig. 2.** Effect of KMT5A knockdown on GH3 cell proliferation. **a** qRT-PCR detection of the shRNA transfection efficiency in GH3 cells. **b** Detection of shRNA transfection efficiency of GH3 cells by WB. **c** Detection of the effect of KMT5A knockdown on GH3 cell viability by CCK-8 assay. **d** Clonal formation evaluation of the effect of KMT5A knockdown on GH3 cell proliferation. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Bars represent mean  $\pm$  SD.

cleaved caspase-3, an apoptosis related protein, as well as Cyclin D1, a cell cycle related protein, in GH3 cells. The results showed that compared with the shCtrl group, the expression level of cleaved caspase-3 in the shKMT5A group increased (shown in Fig. 3b), while the expression level of Cyclin D1 decreased (shown in Fig. 3c).

#### *KMT5A Inhibitor UNC0379 Suppresses the Proliferation of GH3 Cells*

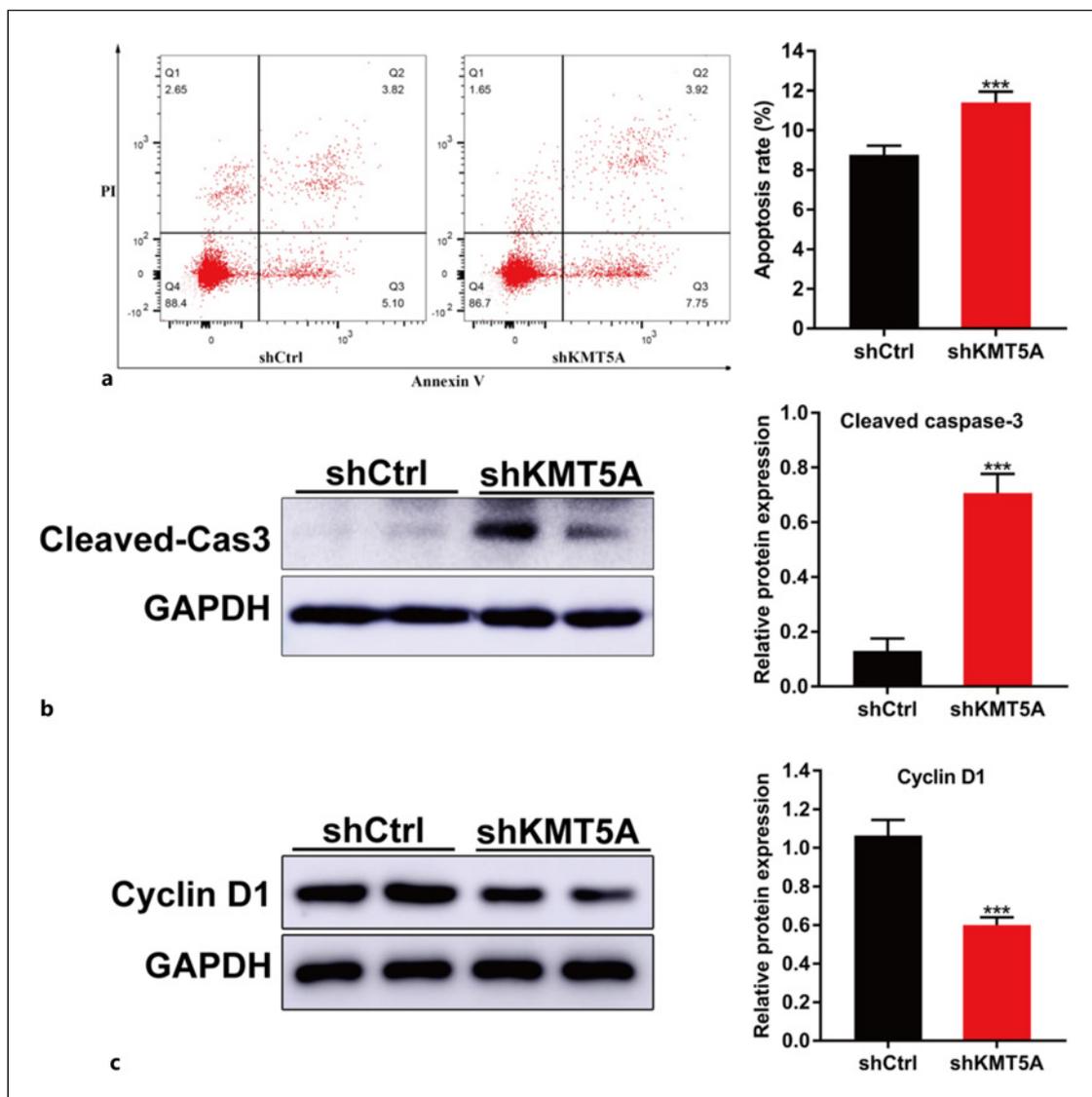
The aforementioned experimental results indicate that the knockdown of KMT5A in GH3 cells exerts inhibitory effects on cell proliferation and induces cell apoptosis. Subsequent studies were conducted to ascertain whether the KMT5A inhibitor UNC0379 exhibits the same effects. The qRT-PCR results showed that the expression of KMT5A decreased with the increase of UNC0379 concentration (shown in Fig. 4a). CCK-8, clone formation and EdU assay results showed that treatment with UNC0379 could inhibit the proliferation of GH3 cells, and this inhibitory effect became more pronounced with the increase in treatment duration and UNC0379 concentration (shown in Fig. 4b–d).

#### *UNC0379 Induces GH3 Cell Apoptosis and Inhibit Cycle Progression*

The effect of UNC0379 on apoptosis of GH3 cells was detected by FCM. The results showed that compared with the DMSO group, the apoptosis rate of the UNC0379 group was higher, and the apoptosis rate increased with the increase of UNC0379 concentration (shown in Fig. 5a). WB analysis was conducted to assess the effect of UNC0379 on the expression levels of cleaved caspase-3 and cyclin D1 in GH3 cells. Compared with the DMSO group, the expression of cleaved caspase-3 was increased in the UNC0379 group (shown in Fig. 5b), while the expression of cyclin D1 was decreased (shown in Fig. 5c), and these changes were more significant with the increase of UNC0379 concentration.

#### *KMT5A May Affect GH3 Cell Proliferation and Apoptosis through the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway*

Based on previous experimental results, the knockdown of KMT5A or treatment with UNC0379 inhibited the cell cycle progression and promoted the apoptosis in



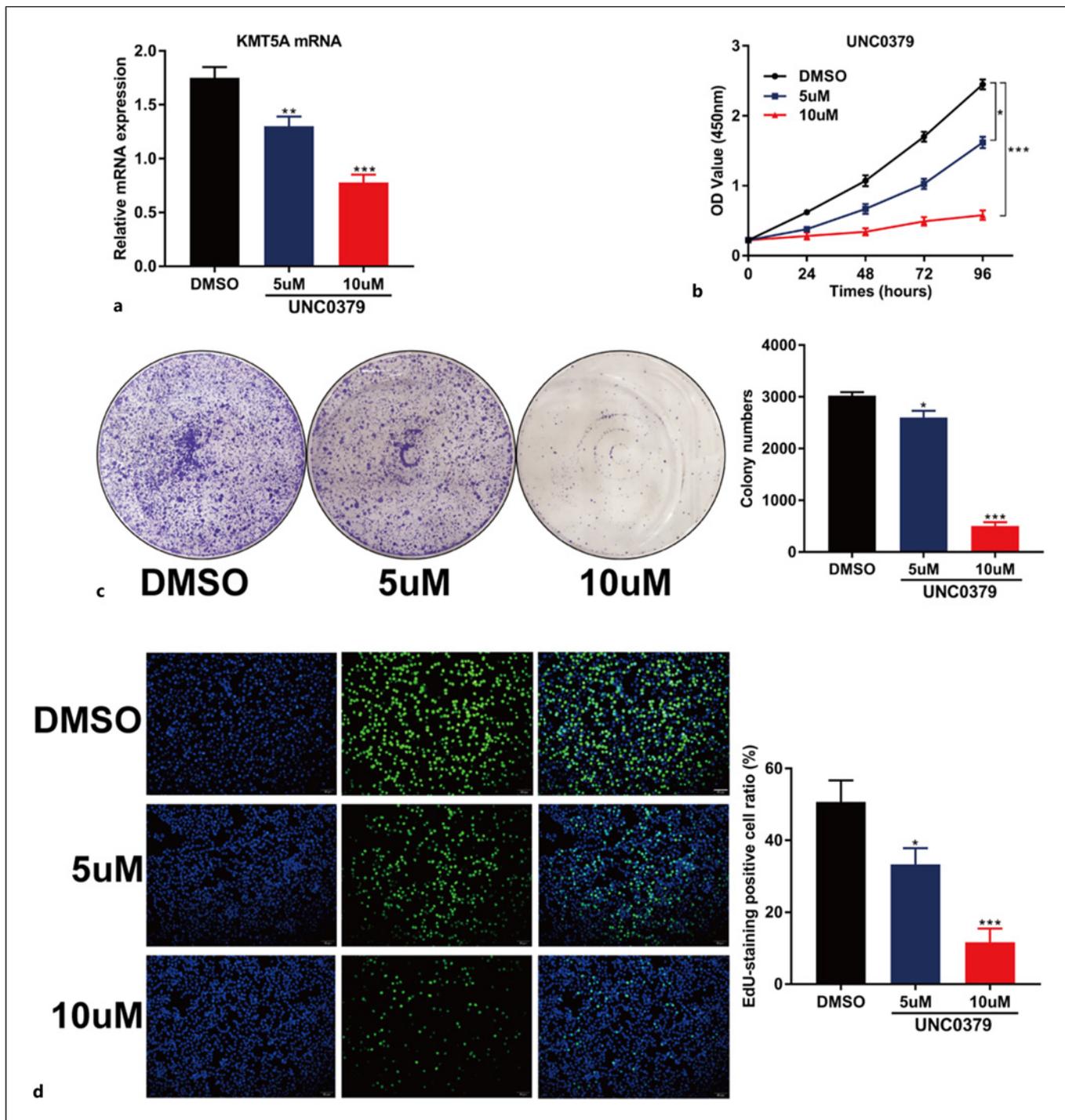
**Fig. 3.** Effect of knockdown of KMT5A on the apoptosis and cell cycle of GH3 cells. **a** FCM results showed that knockdown of KMT5A promoted GH3 cell apoptosis. **b** WB assay showed that the expression level of cleaved caspase-3 was elevated in the shKMT5A group compared with the shCtrl group. **c** WB assay showed that the cell cycle protein cyclin D1 expression level was decreased in the shKMT5A group compared with the shCtrl group. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Bars represent mean  $\pm$  SD.

GH3 cells. KMT5A may play a significant role in the proliferation of GH3 cells. To further investigate the potential molecular mechanism by which KMT5A affects the proliferation of GH3 cells, we performed WB analyses. The results demonstrated that the expressions of  $\beta$ -catenin, TCF1, c-Myc and Cyclin D1 were significantly decreased following the KMT5A knockdown (shown in Fig. 6a). Similarly, UNC0379 also inhibited the expression levels of KMT5A,  $\beta$ -catenin, TCF1, c-Myc and Cyclin D1

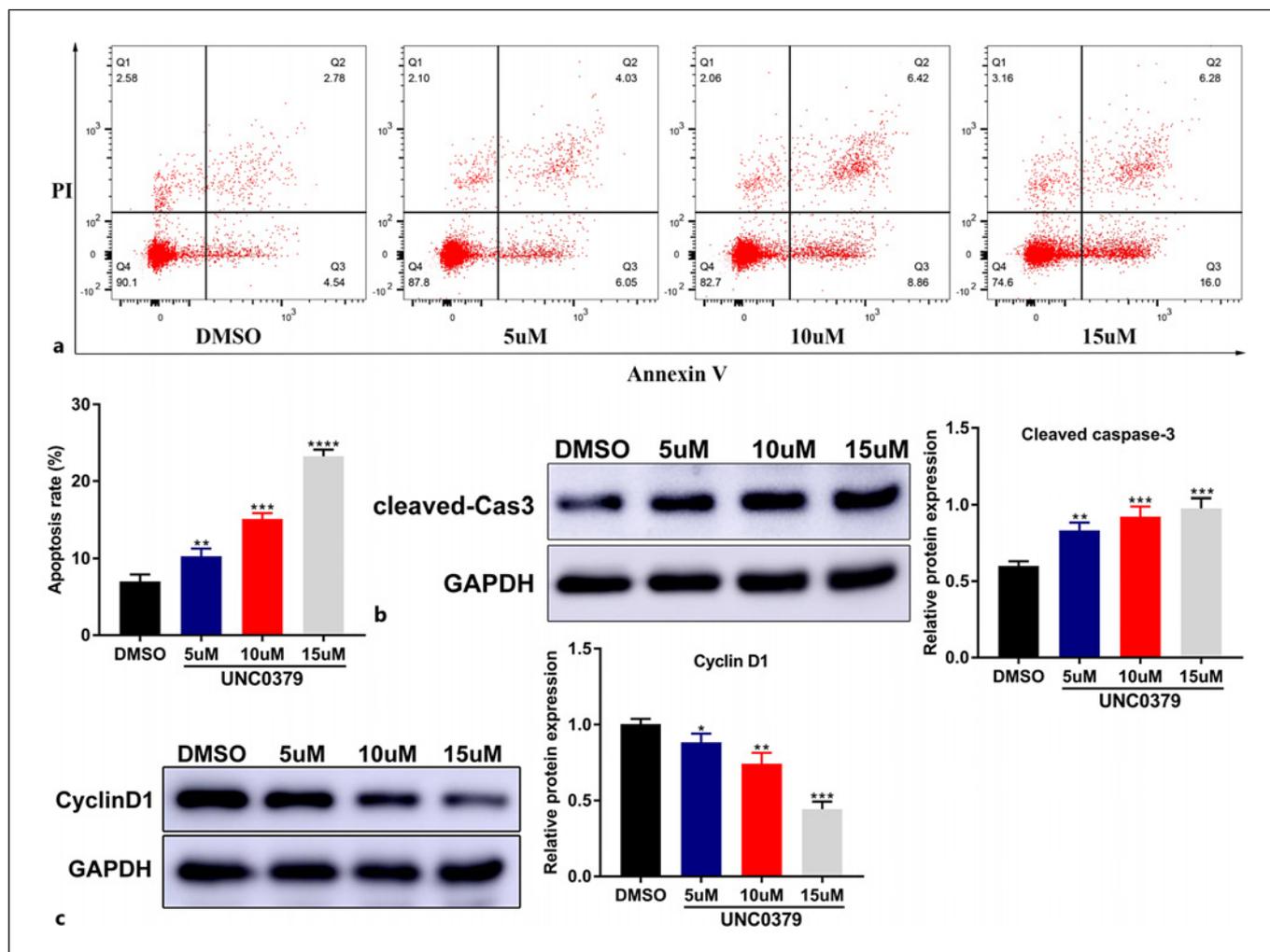
proteins in GH3 cells, and the inhibitory effect was more obvious with the increase of UNC0379 concentration (shown in Fig. 6b).

#### *Knockdown of KMT5A or UNC0379 Treatment Inhibits GH3 Cell Proliferation in vivo*

The xenograft model of GH PitNETs was constructed by subcutaneous injection of GH3 cells into nude mice. Tumor volume was measured every 7 days



**Fig. 4.** The effect of UNC0379 on the proliferation of GH3 cells. **a** qRT-PCR analysis of the expression level of KMT5A mRNA in GH3 cells treated with UNC0379. **b** CCK-8 detection of the effect of UNC0379 on GH3 cell viability. **c** Clonal formation evaluation of the effect of UNC0379 on GH3 cell proliferation. **d** Cell proliferation was analyzed by EdU assay. The nucleus is shown in blue and EdU-staining positive cells are shown in green. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Bars represent mean  $\pm$  SD.

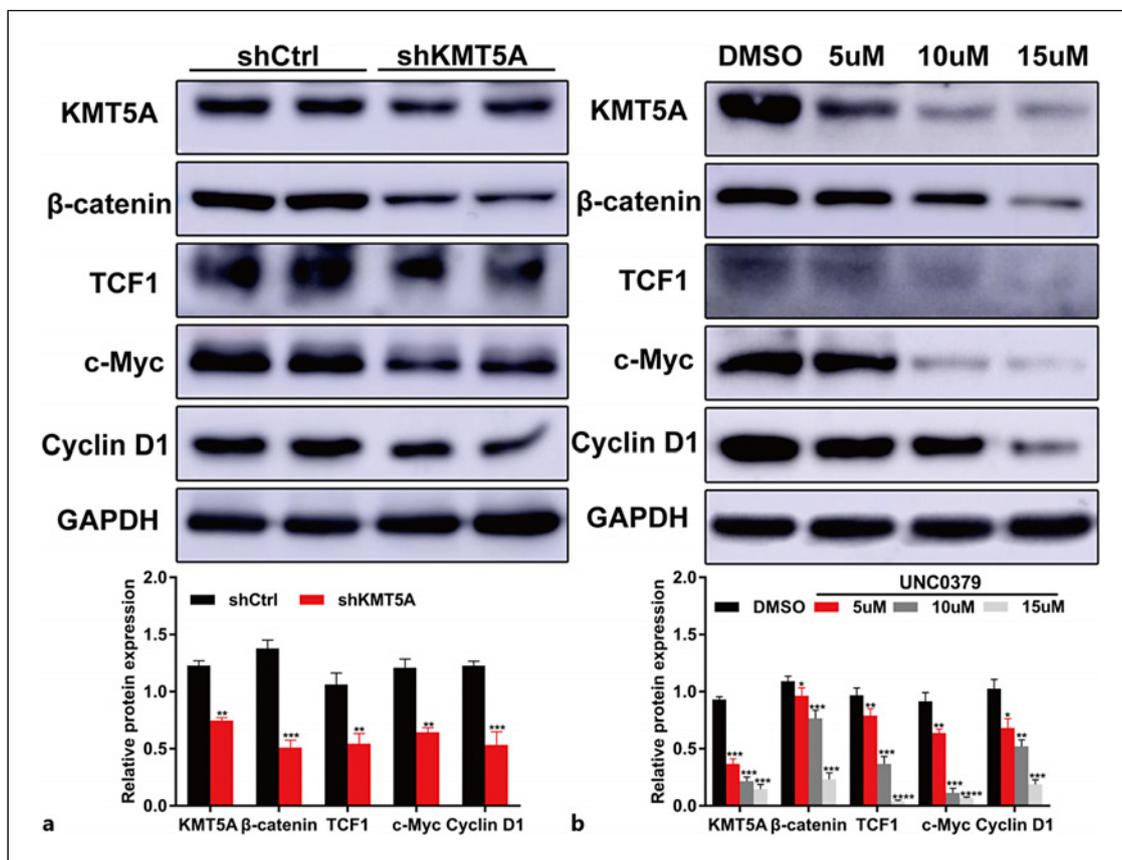


**Fig. 5.** Effect of UNC0379 on the GH3 cell proliferation. **a** The apoptotic effect of UNC0379 on GH3 cells was demonstrated by FCM. **b** WB assay showed that the expression level of cleaved caspase-3 was higher in the UNC0379 group than in the DMSO group. **c** WB assay showed that the expression level of cyclin D1 was lower in the UNC0379 group compared with the DMSO group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Bars represent mean  $\pm$  SD.

after injection, and a tumor growth curve was plotted. The results showed that tumor growth in the shKMT5A and UNC0379 groups was slower than that in the control group (shown in Fig. 7a). After 42 days, the nude mice were euthanized; the transplanted tumors were harvested and photographed. Compared with the control group, the tumor volume in shKMT5A and UNC0379 groups was significantly decreased (shown in Fig. 7b). qRT-PCR and immunohistochemistry results showed that compared with the control group, the expression level of KMT5A in shKMT5A and UNC0379 groups was decreased (shown in Fig. 7c, d).

#### *KMT5A May Affect the Proliferation of GH3 Cells through the Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway*

The effects of KMT5A on the growth of GH PitNET xenografted model tumors were analyzed by WB detection. The results showed that knockdown of KMT5A or UNC0379 treatment resulted in down-regulation of KMT5A protein expression levels, and the expression levels of  $\beta$ -catenin, TCF1 and downstream target proteins c-Myc and Cyclin D1 in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway were also down-regulated accordingly. These results are consistent with in vitro cellular experimental findings (shown in Fig. 8a), suggesting that KMT5A may influence the



**Fig. 6.** Effects of KMT5A on the expression levels of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway and its downstream target genes. **a** WB showed that the expression levels of  $\beta$ -catenin, TCF1 as well as their target proteins c-Myc and cyclin D1 were decreased after KMT5A knockdown. **b** WB results showed that UNC0379 treatment inhibits the expression levels of  $\beta$ -catenin, TCF1, c-Myc, and cyclin D1 protein in GH3 cells. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Bars represent mean  $\pm$  SD.

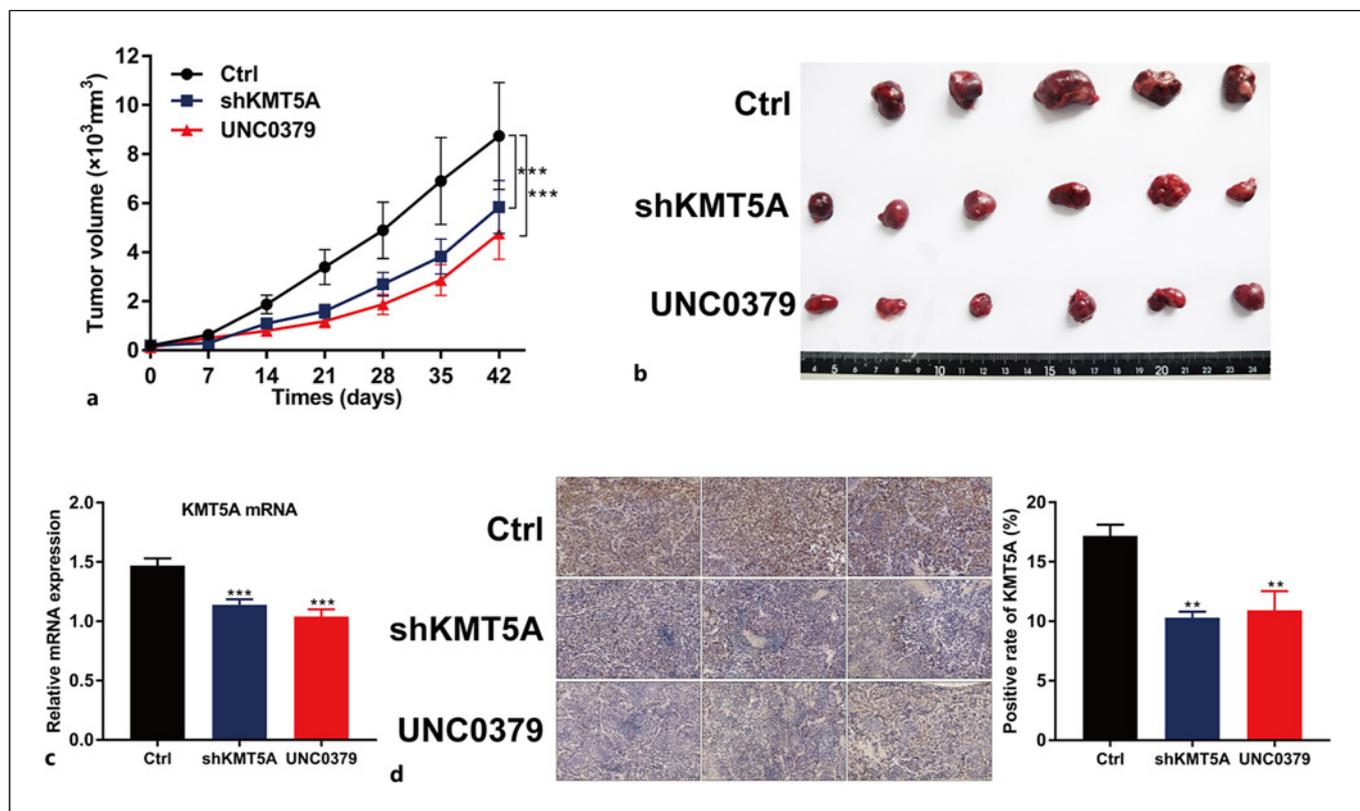
proliferation of GH3 cells and promote tumor progression through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway (shown in Fig. 8b).

## Discussion

N-lysine methyltransferase KMT5A is a methyltransferase containing a SET domain that catalyzes the monomethylation of histone H4K20me1. KMT5A has been implicated in various pathways, including Wnt, histone, p53, PCNA, and TWIST, and is primarily involved in DNA repair, gene transcription, cell cycle, and apoptosis, as well as other essential physiological processes. It plays a crucial role in maintaining genomic integrity and controlling cell cycle progression and development [16–18]. The loss of KMT5A function in *Drosophila*, as demonstrated by Huang et al. [19], leads to

a delay in reactivation of neural stem cells (NSCs) and a deficiency in H4K20 monomethylation in the brain. Further investigations have confirmed that KMT5A promotes NSCs reactivation by regulating Wnt signaling and cell cycle progression. The potential mechanism is that when Wnt is activated,  $\beta$ -catenin accumulates and translocates the nucleus. Then KMT5A promotes the transcription of downstream target genes such as Cyclin D1, c-Myc, matrix metalloproteinases (MMPs) by replacing the inhibitory protein Groucho and binding to lymphocyte enhancer factor (LEF)/T cell factor (TCF) transcription factors [20].

KMT5A's effects and regulatory mechanisms in human tumors have been extensively reported. For instance, one study demonstrated that KMT5A promotes Numb protein methylation in breast cancer, leading to the inhibition of p53-dependent apoptosis. Down-regulation of KMT5A expression induces apoptosis through the

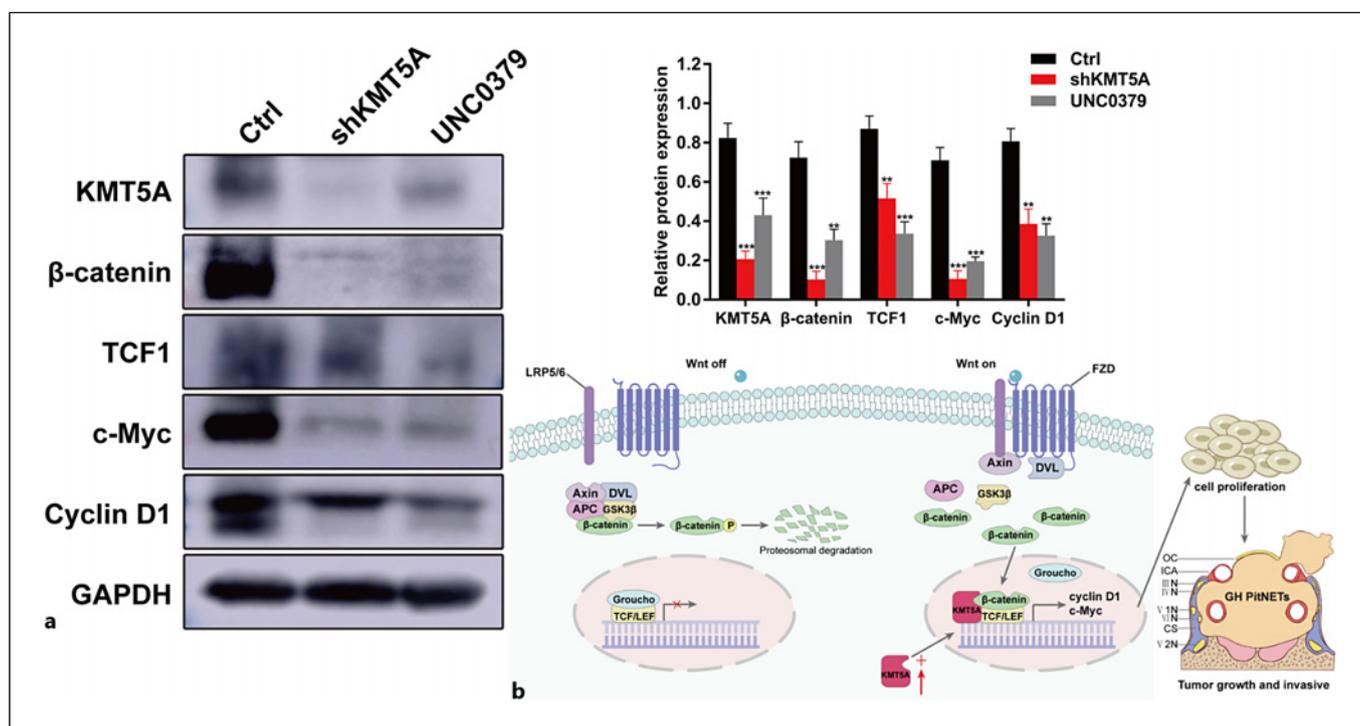


**Fig. 7.** Effect of KMT5A on the growth of GH PitNETs. **a** The tumor growth curve. **b** The images and volume of the tumors when harvested. **c** qRT-PCR detection of the expression level of KMT5A in tumor tissues. **d** Immunohistochemical detection of the expression level of KMT5A in tumor tissues. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Bars represent mean  $\pm$  SD.

KMT5A/Numb/p53 pathways [21]. Other research has revealed that miR-335 significantly inhibits the expression of KMT5A through the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, thereby suppressing the expression of its downstream genes cyclin D1 and c-Myc in breast cancer. In addition, the ectopic expression of miR-335 or the deletion of its target gene KMT5A can enhance the sensitivity of paclitaxel-resistant breast cancer cells to paclitaxel [22]. Similarly, An et al. [23] found that KMT5A promotes the expression of downstream molecules by activating the  $\beta$ -catenin signaling pathway, thereby increasing the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells. In our previous studies, we discovered that LINC00473 down-regulates miR-502-3p and up-regulates KMT5A through the ceRNA mechanism, thereby regulating the cell cycle through the LINC00473/miR-502-3p/KMT5A signaling axis, and affecting the proliferation and invasion of pituitary adenomas [15]. In this study, we found that both KMT5A knockdown and the application of the inhibitor UNC0379 could inhibit the proliferation of GH PitNETs

by affecting the process of cell cycle and promoting apoptosis.

The mechanism underlying the promotion of GH PitNETs proliferation by KMT5A was further investigated in this study. Our findings revealed that a decrease in KMT5A expression leads to apoptosis of GH PitNETs cells, which is accompanied by an increased expression of caspase-3. Caspase-3 is a member of the caspase family and exists in the form of zymogen. When the promoter caspase-8/9 releases pro-apoptotic signals and activates caspase-3, caspase-3 cleaves key proteins within the cell through proteolysis, executing the function of apoptosis [24]. Germline mutation of AIP gene is a known cause of familial solitary pituitary adenomas, especially GH tumors [25]. In adult male rats, AIP alterations induce IGF-1 elevation and gigantism along with pituitary hyperplasia by blocking the RET/caspase-3/PKC $\delta$  apoptotic pathway [26]. These findings suggest that caspase-3-related apoptosis is closely related to the occurrence and development of GH PitNETs.



**Fig. 8.** WB detection of molecular mechanism of KMT5A affecting GH PitNETs in vivo. **a** The expression levels of  $\beta$ -catenin, TCF1, as well as their downstream target genes, c-Myc and Cyclin D1 were significantly decreased after knockdown of KMT5A or UNC0379 treatment. **b** The schematic diagram shows that KMT5A promotes GH PitNETs tumor progression through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . Bars represent mean  $\pm$  SD.

In addition to the effect of apoptosis, KMT5A plays a more significant role in the regulation of the cell cycle. Research indicates that the abundance of KMT5A varies at different stages of the cell cycle: it is lower in the G1 phase, and inhibition of KMT5A can lead to down-regulation of E2F expression; during the S phase, KMT5A is degraded by the CRL4cdt2 ubiquitin ligase to avoid chromatin fixation and abnormal DNA replication; in the G2/M phase, the abundance of KMT5A first increases and then decreases, ensuring the normal progression of mitosis [27]. This demonstrates that the precise regulation of KMT5A is indispensable for the cell cycle. Our findings indicate that KMT5A knockdown or UNC0379 treatment can diminish the expression of Cyclin D1. Cyclin D1 is encoded by the proto-oncogene CCND1, expressed in early G1, peaking in late G1, and is ubiquitinated and degraded in the S phase. It acts as a cell cycle initiator or growth factor sensor, accelerating the transition from G1 to S phase, and facilitating progression through the G1/S checkpoint when its expression is increased [28]. In our previous research [15], as well as in this study and in drug-resistant breast cancer research

[22], it has been observed that KMT5A promotes tumor cell proliferation and invasion by up-regulating the expression of Cyclin D1.

As previously mentioned, KMT5A has the ability to activate the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway through monomethylated H4K20.  $\beta$ -Catenin aids KMT5A in competitively binding transcription factors LEF/TCF to further activate downstream target genes like cyclin D1 and c-Myc [20]. As a conserved signal transduction pathway, the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates cell proliferation and differentiation [29]. Dysregulation of this pathway often arises from mutations in various components, particularly mutations or silencing of Wnt tumor suppressors, with mutations in  $\beta$ -catenin being the most commonly observed alterations in cancer [30]. Aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is closely associated with the development of numerous tumors, including PitNETs [31]. Gaston-Massuet et al. [32] found that the expression of mutated  $\beta$ -catenin leads to a significant increase in the total number and proliferative potential of pituitary progenitor/stem cells. Furthermore,  $\beta$ -catenin mutations in undifferentiated Rathke's pouch

progenitor cells are closely associated with the occurrence of craniopharyngiomas in both mice and humans. Studies on non-functioning PitNETs have revealed that phosphorylation at serine 552 of  $\beta$ -catenin is correlated with tumor invasion and recurrence [33]. In this study, we observed that both KMT5A knockdown and UNC0379 treatment resulted in reduced the expression of  $\beta$ -catenin and TCF1, which suggests that KMT5A is involved in the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in GH PitNETs.

In conclusion, our research findings indicate that KMT5A is overexpressed in GH PitNETs, influencing the cell cycle and apoptosis of GH PitNETs, thereby promoting tumor proliferation. Down-regulation of KMT5A or the application of inhibitor UNC0379 can reverse this effect. Further studies indicate that KMT5A promotes the progression of GH PitNETs through activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, suggesting that KMT5A is a potential molecular marker and therapeutic target for GH PitNETs.

### Acknowledgment

We express our gratitude to Dr. Lu Di and Jiazhi Guo for their valuable technical support.

### Statement of Ethics

The study involving human participants was conducted in accordance with the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments or comparable ethical standards. All procedures were

approved by the Research Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University (Approval No. 2019-0816) and written informed consent was obtained for participation in this study. In addition, for the animal experiments, all procedures adhered to the guidelines outlined in the Care and Use of Laboratory Animals in cancer research and received approval from the Animal Ethics Committee of Kunming Medical University (Approval No. kmmu20190718).

### Conflict of Interest Statement

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Funding Sources

This study was supported by the Applied Basic Research Joint Special Fund project of Science and Technology Department of Yunnan Province and Kunming Medical University (Nos. 202101AY070001-017 and 202101AY070001-081).

### Author Contributions

X.L.D. and Y.Q. designed research. J.J.L, H.S., S.X.Z., C.Z., and T.C. performed research. C.M., L.Y.Z., and T.F.W. analyzed the data. J.J.L. and H.S. wrote the paper.

### Data Availability Statement

All data generated or analyzed during this study are included in this published article. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

### References

- 1 Tritos N, Miller K. Diagnosis and management of pituitary adenomas: a review. *JAMA*. 2023;329(16):1386–98. <https://doi.org/10.1001/jama.2023.5444>.
- 2 Ntali G, Wass J. Epidemiology, clinical presentation and diagnosis of non-functioning pituitary adenomas. *Pituitary*. 2018;21(2):111–8. <https://doi.org/10.1007/s11102-018-0869-3>.
- 3 Mehta G, Lonser R. Management of hormone-secreting pituitary adenomas. *Neuro Oncol*. 2017;19(6):762–73. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now130>.
- 4 Fleseriu M, Langlois F, Lim DST, Varlamov EV, Melmed S. Acromegaly: pathogenesis, diagnosis, and management. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2022;10(11):804–26. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(22\)00244-3](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(22)00244-3).
- 5 Colao A, Grasso LFS, Giustina A, Melmed S, Chanson P, Pereira AM, et al. Acromegaly. *Nat Rev Dis Primers*. 2019;5(1):20. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0071-6>.
- 6 Gadelha MR, Kasuki L, Lim DST, Fleseriu M. Systemic complications of acromegaly and the impact of the current treatment landscape: an update. *Endocr Rev*. 2019;40(1):268–332. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00115>.
- 7 Melmed S, Bronstein MD, Chanson P, Klubanski A, Casanueva FF, Wass JAH, et al. A Consensus Statement on acromegaly therapeutic outcomes. *Endocrinology*. 2018;14(9):552–61. <https://doi.org/10.1038/s41574-018-0058-5>.
- 8 Gadelha MR, Kasuki L. Refractory somatotroph adenomas. *Pituitary*. 2023;26(3):266–8. <https://doi.org/10.1007/s11102-023-01324-5>.
- 9 Beck DB, Oda H, Shen SS, Reinberg D. PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription. *Genes Dev*. 2012;26(4):325–37. <https://doi.org/10.1101/gad.177444.111>.
- 10 Xu L, Zhang L, Sun J, Hu X, Kalvakolanu DV, Ren H, et al. Roles for the methyltransferase SETD8 in DNA damage repair. *Clin Epigenetics*. 2022;14(1):34. <https://doi.org/10.1186/s13148-022-01251-5>.
- 11 Wang C, Wu J, Zhao Y, Guo Z. miR-502 mediated histone methyltransferase SET8 expression is associated with outcome of esophageal squamous cell carcinoma. *Sci Rep*. 2016;6:32921. <https://doi.org/10.1038/srep32921>.
- 12 Alebady ZAH, Azizyan M, Nakjang S, Lishman-Walker E, Al-Kharaif D, Walker S, et al. CDC20 is regulated by the histone methyltransferase, KMT5A, in castration-resistant prostate cancer. *Cancers*. 2023;15(14):3597. <https://doi.org/10.3390/cancers15143597>.

- 13 Yu B, Su J, Shi Q, Liu Q, Ma J, Ru G, et al. KMT5A-methylated SNIP1 promotes triple-negative breast cancer metastasis by activating YAP signaling. *Nat Commun.* 2022;13(1):2192. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29899-w>.
- 14 Yang C, Wang K, Zhou Y, Zhang SL. Histone lysine methyltransferase SET8 is a novel therapeutic target for cancer treatment. *Drug Discov Today.* 2021;26(10):2423–30. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.004>.
- 15 Li J, Qian Y, Zhang C, Wang W, Qiao Y, Song H, et al. LncRNA LINC00473 is involved in the progression of invasive pituitary adenoma by upregulating KMT5A via ceRNA-mediated miR-502-3p evasion. *Cell Death Dis.* 2021;12(6):580. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03861-y>.
- 16 Oda H, Okamoto I, Murphy N, Chu J, Price SM, Shen MM, et al. Monomethylation of histone H4-lysine 20 is involved in chromosome structure and stability and is essential for mouse development. *Mol Cell Biol.* 2009;29(8):2278–95. <https://doi.org/10.1128/MCB.01768-08>.
- 17 Abbas T, Shibata E, Park J, Jha S, Karnani N, Dutta A. CRL4(Cdt2) regulates cell proliferation and histone gene expression by targeting PR-Set7/Set8 for degradation. *Mol Cell.* 2010;40(1):9–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.09.014>.
- 18 Wu S, Wang W, Kong X, Congdon LM, Yokomori K, Kirschner MW, et al. Dynamic regulation of the PR-Set7 histone methyltransferase is required for normal cell cycle progression. *Genes Dev.* 2010;24(22):2531–42. <https://doi.org/10.1101/gad.1984210>.
- 19 Huang J, Gujar MR, Deng Q, Y Chia S, Li S, Tan P, et al. Histone lysine methyltransferase Pr-set7/SETD8 promotes neural stem cell reactivation. *EMBO Rep.* 2021;22(4):e50994. <https://doi.org/10.15252/embr.202050994>.
- 20 Li Z, Nie F, Wang S, Li L. Histone H4 Lys 20 monomethylation by histone methylase SET8 mediates Wnt target gene activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(8):3116–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009353108>.
- 21 Dhami GK, Liu H, Galka M, Voss C, Wei R, Muranko K, et al. Dynamic methylation of Numb by Set8 regulates its binding to p53 and apoptosis. *Mol Cell.* 2013;50(4):565–76. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.04.028>.
- 22 Wang Y, Wang H, Ding Y, Li Y, Chen S, Zhang L, et al. N-peptide of vMIP-II reverses paclitaxel-resistance by regulating miRNA-335 in breast cancer. *Int J Oncol.* 2017;51(3):918–30. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.4076>.
- 23 An J, Zhang J, Wang Z, Wang K, Liang W, Liu X, et al. KMT5A knockdown suppresses osteosarcoma cell proliferation and metastasis through  $\beta$ -Catenin signalling. *Clin Invest Med.* 2022;45(3):E23–31. <https://doi.org/10.25011/cim.v45i3.38933>.
- 24 Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107–20. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.96>.
- 25 Hernández-Ramírez LC, Gabrovská P, Dénes J, Stals K, Trivellini G, Tilley D, et al. Landscape of familial isolated and young-onset pituitary adenomas: prospective diagnosis in AIP mutation carriers. *J Clin Endocrinol Metab.* 2015;100(9):E1242–54. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1869>.
- 26 Garcia-Rendueles AR, Chenlo M, Oroz-Gonzar F, Solomou A, Mistry A, Barry S, et al. RET signalling provides tumorigenic mechanism and tissue specificity for AIP-related Somatotrophinomas. *Oncogene.* 2021;40(45):6354–68. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-02009-8>.
- 27 Wu S, Rice JC. A new regulator of the cell cycle: the PR-Set7 histone methyltransferase. *Cell Cycle.* 2011;10(1):68–72. <https://doi.org/10.4161/cc.10.1.14363>.
- 28 Knudsen E, Witkiewicz A, Rubin S. Cancer takes many paths through G1/S. *Trends Cell Biol.* 2023;10:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.10.007>.
- 29 Niehrs C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(12):767–79. <https://doi.org/10.1038/nrm3470>.
- 30 Liu J, Xiao Q, Xiao J, Niu C, Li Y, Zhang X, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):3. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00762-6>.
- 31 Wang W, Ma L, Zhao Y, Liu M, Ye W, Li X. Research progress on the role of the Wnt signaling pathway in pituitary adenoma. *Front Endocrinol.* 2023;14:1216817. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1216817>.
- 32 Gaston-Massuet C, Andoniadou CL, Signore M, Jayakody SA, Charolidi N, Kyeyune R, et al. Increased Wingless (Wnt) signaling in pituitary progenitor/stem cells gives rise to pituitary tumors in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(28):11482–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101553108>.
- 33 Rai A, Yelamanchi SD, Radotra BD, Gupta SK, Mukherjee KK, Tripathi M, et al. Phosphorylation of  $\beta$ -catenin at Serine552 correlates with invasion and recurrence of non-functioning pituitary neuroendocrine tumours. *Acta Neuropathol Commun.* 2022;10(1):138. <https://doi.org/10.1186/s40478-022-01441-5>.