

A 9-cisz retinsav és a mitotán tumorelles hatásainak és a mikroRNS kifejeződés mintázatának vizsgálata mellékvesekéreg-rák xenograft modelljein

Doktori tézisek

Nagy Zoltán

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Igaz Péter, D.Sc., Egyetemi docens

Hivatalos bírálók:

Dr. Nagy Bálint, D.Sc., Egyetemi docens

Dr. Garami Miklós, Ph.D., Egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke:

Prof. Dr. Sági Zoltán, D.Sc., Egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Hubina Erika, Ph.D., Főorvos

Dr. Borka Katalin, Ph.D., Egyetemi adjunktus

Budapest
2016

I. BEVEZETÉS

A mellékvesekéreg-rák (adrenocorticalis carcinoma, ACC) egy ritka, de rossz prognózisú daganat. Diagnózisában és kezelésében számos probléma ismert. Ezek közé tartoznak a képalkotó diagnosztika nehézségei, illetve az, hogy nincs olyan preoperatív laboratóriumi marker, ami a rosszindulatúságot egyértelműen jelezné. Az eltávolított daganat szövettani vizsgálata nehéz, és nagy gyakorlatot igényel. Terápiájában a sebészi kezelésen kívül kevés hatékony módszer létezik.

Jelenleg egyetlen mellékvesekéreg specifikus szer ismert, a DDT származék, adrenolitikus hatású és számos mellékhatással bíró mitotán (o,p-DDD), melyet már több mint 60 éve alkalmazunk a klinikai gyakorlatban annak ellenére, hogy hatásmechanizmusát pontosan ismernénk. Az áttétes formák szisztémás kemoterápiás kezelésében a legjobb eredményt az etopozid, doxorubicin, ciszplatin és mitotán kombinációval érték el, amivel így is csak 14,8 hónap az átlagos túlélés. Mindezen okok miatt intenzív kutatások folynak új, kedvezőbb mellékhatásprofilú, jobb hatásfokú szerek azonosítása céljából.

Korábbi *in silico* tanulmányunkban mellékvese-daganatok funkcionális genomikai útvonalelemzése során megállapítottuk, hogy a mellékvesekéreg-rák patomechanizmusában fontos szerepet tölt be a retinsav jelátvitel retinoid X receptoron keresztüli csökkenése. Ezen eredmények alapján munkacsoportunk a receptor specifikus ligandjával, a 9-cisz retinsavval végzett *in vitro* kísérleteket, melyekben a 9-cisz retinsav idő és dózis függvényében csökkentette az NCI-H295R humán mellékvesekéreg-rák sejtvonal hormonszekréciónját és életképességét, valamint jelentős génexpressziós változásokat is kiváltott. *In vivo* pedig egy kis elemszámú, összesen 6 egeret tartalmazó előkísérletben, a 9-cisz retinsav csökkentette a NCI-H295R xenograft tumorok növekedését, és tumorelles hatást fejtett ki [5].

Az értekezésem alapjául szolgáló munkában a 9-cisz retinsav mellékvesekéreg-rákra gyakorolt hatásának *in vivo* vizsgálatát tűztük ki célul egy nagy elemszámú NCI-H295R mellékvesekéreg-rák egér xenograft modellen. Az egereket mitotánnal, 9-cisz retinsavval, valamint a két szer kombinációjával kezeltük, majd a kezelés végén patológiai, génexpressziós, fehérje,

mikroRNS elemzést végeztünk a lehetséges hatás mechanizmusának felderítése érdekében.

A mikroRNS-ek expressziós mintázata a kezelés hatására változott, ami felveti a kezelés monitorozására történő alkalmasságukat. E kérdést más xenograft modellen is vizsgáltuk nemzetközi kollaboráció keretében.

II. CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám során több szempontból is elemeztem a mellékvesekéreg-carcinoma, a tumorellenes kezelések, és a keringő mikroRNS-ek kapcsolatát. Célul tűztem ki annak vizsgálatát, hogy:

1. A 9-cisz retinsav mint az RXR receptor specifikus ligandja és potenciális új szereplő a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében, a mitotán, mint a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében elérhető egyetlen mellékvesekéreg specifikus készítmény, valamint a két szer kombinációja hogyan befolyásolja az NCI-H295R xenograft egérmodellben a daganatok növekedését?
2. Az alkalmazott kezelések milyen génexpressziós és fehérje szintű változásokat indukálnak?
3. A keringő mikroRNS-ek használhatók-e a daganatok monitorizálására, a tumorellenes kezelések követésére?

III. MÓDSZEREK

III.1. Sejttenyésztés

A sejttenyésztéshez NCI-H295R humán mellékvesekéreg-rák sejt vonalat használtunk fel melyet az American Type Culture Collection-től szereztünk be. A sejteket 37 °C-on, párásított, 5% CO₂-t tartalmazó inkubátorban DMEM:F12 egy az egyhez arányú alapható médiumában szaporítottuk kiegészítve 0,00625 mg/ml inzulin, 10,00625 mg/ml transferrin, 6,25 ng/ml szódium-szelenit, 1,25 mg/ml bovin szérum albumin, 0,00535 mg/ml linolénsav, 2,5% Nu-szérum, 1% HEPES, 1% Penicillin/Streptomycin, 2,5 % glutamin hozzáadásával. A médiumot kétszer- háromszor cseréltük egy héten, a sejtek passzálására hetente egyszer került sor.

III.2. Xenograft modell

A xenograft modellhez 43 hím, 6-8 hetes, 21-23 gramm átlagos tömegű kombinált immunhiányos (SCID) BALB/c törzsű egeret használtunk fel. A kísérlet elején az állatok bőre alá jobb csípő tájékon 200 µl PBS-ben 10⁷ db, felfuszpendált NCI-H295R sejtet oltottunk. Miután a megtapadó tumorok elérték a 3 mm-es átmérőt a 28

napos per os kezeléseket megkezdtük. Az egereket négy csoportra osztva, 11 egér 200 µl/nap kukoricaolaj, 10 egér 200 mg/kg/nap mitotán, 11 egér 5 mg/kg/nap 9-cisz retinsav, illetve 11 egér a mitotán és 9-cisz retinsav kezelést kombinálva kapta. A tumorok méretét hetente kétszer követtük, ugyanazon állatházi gondozó által, melyeknek méretét két átmérő ismeretében a következő formula segítségével számoltuk ki: $(a \cdot a \cdot b \cdot \pi) / 6$.

Az állatok éter anesztéziában, cervikális diszlokációval történő leölése után a tumorokat eltávolítottuk, súlyukat lemértük. A tumorok felét formalinban fixáltuk, a másik felét pedig folyékony nitrogénben fagyasztottuk, és -80 °C-on tároltuk. A formalinban fixált tumorból szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatot végeztünk. A tumorokon kívül a tüdők, szív, vesék, máj és lép is el lett távolítva toxicitási vizsgálat céljából. Az egerekből ezen kívül teljes vért nyertünk, melyből plazmát izoláltunk. Az állatkísérletes vizsgálatokhoz etikai engedéllyel rendelkezünk (TUKÉB engedélyszám: XVI/03047-2/2008).

III.3. Szövetteni és immunhisztokémiai vizsgálat

Paraffinba ágyazott formalinban fixált szövetekből 4 µm-es szeleteket paraffin-mentesítettünk, majd ezután hematoxilín-eosin és Ki-67 immunhisztokémiai festékekkel megfestettük a mintákat. A metszeteken a tumor azon részeit jelöltük ki, ahol a Ki-67 pozitív és negatív sejtek egyenként jól elkülönültek (ROI). Az elemzést 3 független patológus is elvégezte vak módon. A proliferációs indexet a pozitív sejtek százalékos arányában határoztuk meg. A három patológus által meghatározott értékeket átlagoltuk.

III.4. RNS izolálás tumor szövetből

Az izoláláshoz a fagyasztott tumor szöveteket először folyékony nitrogénben történő porítással homogenizáltuk, majd az RNS izolálást a porított tumorból Qiagen miRNeasy Mini Kit felhasználásával, gyártó utasításai szerint végeztük el. Az RNS koncentrációját NanoDrop 2000 spektrofotométerrel, minőségét pedig Agilent 2100 Bioanalyzer System segítségével határoztuk meg.

III.5. Hírvivő RNS (mRNS) expressziós profil meghatározása

A gének kifejeződését a róluk átíródó hírvivő RNS-ek profilozásával, összesen 16 mintán vizsgáltuk 4x44K-s Agilent Whole Genome Single-Color Microarray lemezek segítségével, a gyártó utasításai szerint.

III.6. mRNS profil eredményeinek validálása reverz transzkripció kuantitatív polimeráz lánreakció (RT-qPCR) módszerrel

A génexpressziós vizsgálat eredményei alapján hét gént választottunk ki RT-qPCR módszerrel történő validálásra, melyet csoportonként 8 mintán végeztünk el. A vizsgálatot a következő Taqman Gene Expression Assay-ekkel hajtottuk végre: *MYC*, *APOA4*, *CXCR3*, *BAALC*, *PDE4A*, *PRDMI* és *TGFBI*. Referencia génként a *ZNF625*-t választottuk.

Az adatok elemzéséhez és eredmények kiértékeléséhez a $\Delta\Delta CT$ módszert használtuk.

III.7. Fehérje izolálás

A fehérje izolálás első lépéseként a tumor szöveteket folyékony nitrogénben való porítás és ultrahangos

szonikálás segítségével homogenizáltuk, majd 30 percen keresztül 1 ml lízis bufferben jégen lizáltuk. Ezt követően a mintákat 13000 rpm-en 15 percig centrifugáltuk, majd centrifugálás után a felülúszót leszívtuk. A felülúszókból a Bradford által közölt eljárás alapján meghatároztuk a leizolált fehérje koncentrációját.

III.8. Proteomikai elemzés

A proteomikai elemzésünkhöz az azonos mennyiségű, korábban fehérje izoláláskor nyert fehérje lizátumokat SDS-PAGE módszerrel 10 %-os gélen szeparáltuk, majd kolloidikus Coomassie Brilliant Blue-val festettük. Az így kapott géleket digesztáltuk, majd az emésztési folyamatot leállítottuk, a peptideket a gélből először kinyertük, majd szárítottuk.

Az így nyert mintákat feloldottuk, majd nano-LC-MSMS elemzést hajtottunk végre.

A tömegspektrometriai nyers adatokat PAVA script segítségével MSMS peak list fájlokba konvertáltuk, majd ezen fájlok alapján kerestünk humán és egér fehérjéket az UniProtKB megfelelő adatbázisában. Minden adatbázis keresés a saját

ProteinProspector (ver. 5.14 1) (Baker, P.R and Clauser, K.R. <http://prospector.ucsf.edu>) kereső motorral zajlott.

III.9. Western blot analízis

A proteomikai eredmények és irodalmi adatok alapján a SET fehérjét választottuk ki Western blot módszerrel történő validálásra, mely során csoportonként 3-3 mintát elemeztünk. Ezután a xenograft modellen kívül humán normál és tumoros szövetekben is vizsgáltuk a SET fehérje kifejeződését. Az egészséges szöveteket korábban hypernephromával műtött betegektől nyertük (ETT engedély száma: 230-1 5/2006-1018EKU)

Töltési kontrollnak a β -actin-t használtuk. A jelek denzitását ImageJ szoftverrel határoztuk meg.

III.10. Útvonalelemzés

A proteomikai elemzés után a szignifikáns fehérjék listáját DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (<https://david.ncifcrf.gov/>) online elérhető szoftver adatbázisába feltöltöttük, majd segítségével funkcionális útvonalelemzést hajtottunk végre.

III.11. Plazma és exoszóma RNS izolálás

A keringő, valamint exoszóma mikroRNS-ek vizsgálata céljából 100 µl, illetve 130 µl egerekből nyert plazmából teljes RNS-t, valamint exozómát izoláltunk Qiagen miRNeasy Serum/Plasma Kit illetve Total Exosome Isolation Kit felhasználásával, a gyártó utasításai szerint kiegészítve egy mesterséges spike-in kontroll, a *cel-miR-39* hozzáadásával.

Ehhez a nemzetközi kutatópartnerünk (Constanze Hantel, München, Germany) által létrehozott SW-13 és SJ-ACC3 xenograft egerekből nyert vérplazmát is felhasználtunk. Kísérletük során a klinikumban alkalmazott EDP/M kemoterápiás kezelés hatékonyságát hasonlították össze annak liposzómába csomagolt változatával (LEDP/M).

III.12. Keringő mikroRNS-ek mérése RT-qPCR módszerrel

Korábbi tanulmányaink és irodalmi adatok alapján az NCI-H295R xenograft plazmájából izolált keringő mikroRNS-ek esetén négy, a *hsa-miR-181b*, *hsa-miR-184*, *hsa-miR-210* és *hsa-miR-483-5p*, míg az SW-13 és SJ-ACC3 modellek plazmájából izolált exoszóma

mikroRNS-ek esetén kettő, a *hsa-miR-210* és *hsa-miR-483-5p* mikroRNS-t választottunk ki qRT-PCR módszerrel történő validálásra Taqman miRNA Assay-ek segítségével. Referencia mikroRNS-ként az izoláláskor mintákhoz adott *cel-miR-39-et* használtuk.

III.13. Szöveti mikroRNS mérés RT-qPCR módszerrel

Figyelembe véve az NCI-H295R xenograft modellben mért keringő mikroRNS eredményeinket csak a szöveti *hsa-miR-483-5p* mikroRNS-t vizsgáltuk RT-qPCR módszerrel Taqman miRNA Assay-t használva, a gyártó utasításai alapján. Normalizáláshoz referenciaként az irodalomban gyakran használt, és leírt *U6*, *RNU6B*, *RNU44* és *RNU48* géneket választottuk.

IV. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

IV.1. A tumor növekedésének elemzése

A kezelés alatti, illetve a kezelés végén mért tumortérfogatokat az egyes tumorok első lemért térfogatához normalizáltuk, hogy az adatok összehasonlíthatóak legyenek. Az így kapott értékek mindhárom kezelt csoportban kisebbek voltak a kontroll csoporthoz képest a kísérlet mind a 28 napja alatt. A kezelés végén a kontroll csoportban 22,48-szoros, a mitotán kezeltben 9,3-szeres, a 9-cisz retinsav kezeltben 12,3-szeres, valamint a mitotán és 9-cisz retinsav kezelést együtt kapó csoportban 8,22-szoros növekedést mértünk a normalizált térfogatok szintjén. A tumorok méretét elemezve ez az érték csak a mitotán, illetve az együttesen 9-cisz retinsav és mitotán kezelést kapó csoportban érte el a szignifikancia szintjét. A 9-cisz retinsav önmagában is ígéretes tendenciát mutatott, de a tumorokban mért nagy szórásnak köszönhetően a különbség nem lett szignifikáns.

IV.2. Szövettan és Ki-67 értékelés

A szövettani vizsgálatban a hematoxin-eozin (HE) festett metszeteken megfigyelhető volt, hogy a 9-cisz

retinsavat kapó csoportokban a tumorok differenciáltabb szöveti megjelenést mutattak, mint a kontroll és a mitotán kezelt egerekben.

Az immunhisztokémiai módszerrel meghatározható Ki-67 proliferációs indexek átlaga szignifikánsan alacsonyabb volt a 9-cisz retinsavat önmagában, mind mitotánnal együttes formában kapó csoportban a kontroll csoporthoz képest. A kombinált, 9-cisz retinsavat és mitotánt együttesen kapó csoport (25,6 \pm 4,09%) mindegyik kezeléshez képest szignifikánsan kisebb Ki-67 indexet mutatott (p=0,00018 vs. kontroll, p=0,00018 vs. mitotán, p=0,01684 vs. 9-cisz retinsav).

IV.3. Microarray elemzés

Elemzésünk során 483 szignifikáns génexpressziós változást találtunk. Ezután a statisztikai elemzést Benjamini-Hochberg False Discovery Rate (FDR)-tel kiegészítve hajtottuk végre, aminek nyomán mindössze 2 szignifikánsan megváltozott kifejeződésű transzkriptumot találtunk, de ezek biológiai jelentősége igen kérdéses. (Egyik a LOC100996813, mely *in silico* predikció alapján a MATE2 (solute carrier family 47 member 2)

egyik variánsát, míg a másik a LOC100268168, egy eddig nem karakterizált nem kódoló RNS-t kódolja.)

V.4. RT-qPCR validáció

A microarray vizsgálatunk Benjamini-Hochberg-FDR nélküli eredményei közül a kifejeződésbeli változások mértéke, illetve irodalmi adatok alapján 7 gént választottunk ki validálásra: azon géneket vizsgáltuk tovább, melyeknek mérésünk alapján a legnagyobb kifejeződésbeli különbséget mutatták a kontroll és kezelt csoportok között, mind negatív, mind pozitív irányban, valamint irodalmi adatok igazolták rosszindulatú folyamatokban betöltött szerepüket. A validálással a 7 kiválasztott gén közül ugyanakkor csak kettő kifejeződését sikerült szignifikánsan megváltoztatni azonosítani. A jól ismert 9-cisz retinsav célgén *APOA4* kifejeződése szignifikánsan emelkedett ($p=0,0045$), míg a számos tumorban felülexpresszálnak leírt *PDE4A* szintje szignifikánsan csökkent ($p=0,0024$) a kombinált kezelést kapó csoportban a kontroll csoporthoz képest. A *PDE4A* a sejt cAMP szintjének alapvető szabályozója. Számos a sejt életében alapvető útvonal tagja, valamint tumorok kialakulásában is szerepet játszik.

V.5. Proteomikai elemzés

A tömegspektrometriával, és bioinformatikai elemzéssel elvégzett proteomikai vizsgálatunk elemzésével 47 szignifikáns fehérje eltérést találtunk a csoportok között.

V.6. Western blot vizsgálat

A 47 fehérje közül egyet választottunk ki további vizsgálatokra, a PP2A inhibitor SET fehérjét, mivel számos irodalmi adatot találtunk tumor asszociált szerepéről. Gátolja a tumorszuppresszor PP2A-t, fontos szabályzó szerepet tölt be alapvető sejt szintű funkciókban (sejtciklus, -migráció, -halál), valamint több jelátviteli útvonalat, pl. a β -katenin, c-Myc és Akt is befolyásol.

Eredményeink azt mutatták, hogy a SET fehérje kifejeződése mindkét 9-cisz retinsavval kezelt csoportban alacsonyabb volt a kontroll csoporthoz képest, de ez csak a kombinált csoportban érte el a szignifikancia szintjét.

A SET fehérje potenciális jelentőségét felvetve humán mellékvesekéreg-rák esetében, 2-2 normális mellékvese szövetet, mellékvesekéreg-adenomát, valamint mellékvesekéreg-carcinomát vizsgáltunk egy

pilóta kísérletben. Ennek során azt találtuk, hogy míg a SET protein normális és adenoma szövetben nem volt detektálható, addig mellékvesekéreg-rák esetében halvány expressziót mutatott.

V.7. Funkcionális útvonalelemzés

Funkcionális útvonalelemzésünkkel a p53 és Wnt jelátviteli útvonalakban szereplő fehérjéket, valamint riboszómákhoz és proteoszómákhoz kapcsolt útvonalakat azonosítottunk.

V.8. MikroRNS kifejeződés

A keringő mikroRNS-ek kifejeződését három, különböző típusú xenograft modellből nyert mintákon vizsgáltuk.

A kiválasztott mikroRNS-ek közül az NCI-H295R xenograft esetén a *hsa-miR-483-5p* szintje szignifikánsan csökkent a kombinált, mitotánt és 9-cisz retinsavat együttesen kapó csoportban a kontrollhoz képest ($p=0,028$).

Az SW-13 és SJ-ACC3 xenograft plazmamintáiból izolált exoszómákban a *hsa-miR-210* szignifikáns csökkenését mértük az LEDP/M kezelést kapó csoportban SW-13 modellben a kontroll, míg SJ-

ACC3 modellben az EDP/M csoporthoz képest. A *hsa-miR-210* a legjobban ismert ún. hypoxamiR, szintje hypoxia esetén növekszik, és számos daganatban leírták jelentőségét. Csökkenése a kezelés hatékonyságát jelezheti.

Szöveti szinten is vizsgáltuk a plazmában szignifikánsan csökkenő mikroRNS-eket, de meglepő módon itt nem találtunk szignifikáns eltérést. A szöveti és keringő mikroRNS-ek kifejeződésében hasonló diszkrpanciát más modellekben is leírtak, de ennek háttere nem tisztázott.

VII. KÖVETKEZTETÉSEK

Elsőként vizsgáltuk a 9-cisz retinsav tumorellenes hatását mellékvesekéreg-rák *in vivo*, preklinikai modelljén mind önmagában, mind mitotánnal kombinálva, mely során:

- A 9-cisz retinsavval kezelt csoportokban jelentősen lassult a tumornövekedés, valamint szignifikánsan csökkent az immunhisztokémiai festéssel meghatározott Ki-67 proliferációs index
- Génexpressziós vizsgálatokkal csekély számú génváltozást azonosítottunk, csupán a 9-cisz retinsav célgénként jól ismert *APOA4* felül, míg a számos rosszindulatú daganatban felülexpresszáldottnak leírt *PDE4A* alulexpresszióját sikerült validálnunk a 9-cisz retinsavat és mitotánt együttesen kapó csoportban
- Proteomikai elemzéssel 47 szignifikáns fehérje eltérést találtunk a csoportok között, melyek közül a SET fehérjét választottuk ki validálásra, és igazoltuk expressziójának csökkenését a kezelések hatására. A SET egy új szereplő lehet a mellékvesekéreg-carcinoma biológiájában.
- A keringő mikroRNS-ek közül a *hsa-miR-483-5p*, valamint *hsa-miR-210* kezelés hatására való

csökkenését azonosítottuk, ami felveti alkalmazhatóságukat a kezelés monitorizálására

VIII. AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ SAJÁT KÖZLEMÉNYEK

Nagy Z, Baghy K, Hunyadi-Gulyás E, Micsik T, Nyirő G, Rácz G, Butz H, Perge P, Kovalszky I, Medzihradzsky KF, Rácz K, Patócs A, Igaz P. Evaluation of 9-cis retinoic acid and mitotane as antitumoral agents in an adrenocortical xenograft model. AMERICAN JOURNAL OF CANCER RESEARCH 5:(12) pp. 3645-3658. (2015) **IF: 3,425**

Jung S, **Nagy Z**, Fassnacht M, Zambetti G, Weiss M, Reincke M, Igaz P, Beuschlein F, Hantel C. Progress for a liposomal chemotherapy protocol against adrenocortical carcinoma. ENDOCRINE-RELATED CANCER 23:(10) pp. 825-837. (2016) **IF:4,472**

IX. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Nagy Z, Igaz P. Introduction to microRNAs: Biogenesis, Action, Relevance of Tissue microRNAs in Disease Pathogenesis, Diagnosis and Therapy-The Concept of Circulating microRNAs. *EXS* 106: pp. 3-30. (2015)

Igaz I, Nyíró G, **Nagy Z**, Butz H, Nagy Z, Perge P, Sahin P, Tóth M, Rácz K, Igaz P, Patócs A. Analysis of Circulating MicroRNAs In Vivo following Administration of Dexamethasone and Adrenocorticotropin. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY 2015: Paper 589230. 6 p. (2015)
IF:2,376

Szabo DR, Baghy K, Szabo PM, Zsippai A, Marczell I, **Nagy Z**, Varga V, Eder K, Toth S, Buzas EI, Falus A, Kovalszky I, Patocs A, Racz K, Igaz P. Antitumoral effects of 9-cis retinoic acid in adrenocortical cancer. CELLULAR AND MOLECULAR LIFE SCIENCES 71:(5) pp. 917-932. (2014) **IF:5,808**

Nagy Z, Szabó DR, Zsippai A, Falus A, Rácz K, Igaz P. A hosszú, nem kódoló RNS-ek jelentősége a daganatbiológiában. ORVOSI HETILAP 153:(38) pp. 1494-1501. (2012)