

Keringő mikroRNS-ek változása hormonális hatásokra és lehetséges biológiai jelentőségük

Doktori tézisek

Dr. Igaz Iván

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Konzulens: Dr. Patócs Attila, Ph.D., egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Pósz Zoltán, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.,
egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sápi Zoltán, az MTA doktora
egyetemi tanár,

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kiss András, Ph.D.,
egyetemi docens
Dr. Gundy Sarolta, Ph.D.,
osztályvezető

Budapest
2015

I. BEVEZETÉS

A mikroRNS-ek fehérjét nem kódoló, érett formájukban egyláncú, 17-25 nukleotidból álló RNS-molekulák, amelyek a növények és az állatok génjeinek poszttranszkripció szabályozásában vesznek részt. A hírvívő (messenger) RNS-ek (mRNS) 3' nem kódoló végéhez kötődve a cél mRNS-ek translációjának gátlását vagy lebomlását segítik elő, ezáltal a RNS interferencia (RNSi) endogén mediátorainak tekinthetők.

A mikroRNS-t kódoló gének az ismert gének 1-3%-át teszik ki, mindazonáltal ez a szám folyamatos növekedést mutat.

A mikroRNS-ek az összes fehérjét kódoló gén mintegy 30-60 % -ának befolyásolásával számos élettani folyamatban szerepet játszanak, mint a sejtek differenciálódása, migrációja, proliferációja, illetve a programozott sejthalál (apoptózis) szabályozása. Szerepet játszanak ezen kívül az ontogenezis folyamataiban, az intermedier anyagcsere szabályozásában, az immunrendszer működésében, illetve a szervezet homeosztázisának fenntartásában is.

A mikroRNS-ek kifejeződésének megváltozása számos kórkép kialakulásában kulcsfontosságú szerepet

játszik. A daganatképzésben betöltött szerepük a mikroRNS-kutatás egyik legintenzívebb területe. A mikroRNS-ek a karcinogenezis szinte valamennyi állomását befolyásolják (sejtnövekedés, differenciálódás, proliferáció, invázió, apoptózis, angiogenezis és metasztázisképzés). A daganatos szövetben fokozott kifejeződést mutató mikroRNS-eket onkogén (onkomiR), míg a csökkent kifejeződésűeket tumor szupresszor mikroRNS-eknek nevezzük, a klasszikus onkogén-tumor szupresszor megkülönböztetést követve. A daganatok patogenezisében betöltött szerepük mellett azonban a mikroRNS-ek, mint potenciális biomarkerek a daganatok diagnózisában is fontosak, mivel a jó- és rosszindulatú daganatokra eltérő mikroRNS mintázat jellemző.

A szöveti mikroRNS-ek mellett újabb adatok arra utalnak, hogy a mikroRNS-ek a testfolyadékokban is jelen vannak. MikroRNS-ek jelenlétét mutatták ki a vérben, a nyálban, az anyatejben, a spermában, a vizeletben, illetve a székletben is. Az extracelluláris térben található mikroRNS-ek kimutatása, vizsgálata illetve potenciális biomarkerként történő használata napjainkban intenzív kutatás tárgya.

A keringő mikroRNS-ek daganatképződésben betöltött szerepe mellett felmerül annak kérdése is, hogy az egészséges egyéneknél kimutatható keringő mikroRNS-eknek mi lehet az élettani szerepe. Munkám során a keringő mikroRNS-ek lehetséges diagnosztikai-biológiai szerepét vizsgáltam. Első

lépésben az egészséges egyénekben jelenlevő keringő mikroRNS „pool”-t térképeztem fel és esetleges daganatképződést gátló aktivitását elemeztem, míg a munkám második részében arra kerestem a választ, hogy a laboratóriumi diagnosztikában rutinszerűen alkalmazott vizsgálatok közül a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengelyt érintő hormontesztek befolyásolhatják-e a keringő mikroRNS-ek szintjét.

II. CÉLKITŰZÉSEK

1. Egészséges egyének keringő mikroRNS kifejeződési mintázatának elemzése során bioinformatikai és irodalmi eredmények felhasználásával arra kerestem a választ, hogy a keringő tumor szupresszor mikroRNS-eknek lehet-e „tumor surveillance” aktivitása
2. A keringő mikroRNS-ek kifejeződését befolyásolják-e a klinikai gyakorlatban alkalmazott, hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengelyt befolyásoló hormontesztek (Dexametazon szuppresszió és ACTH-stimuláció)? Ezek között a mellékvesekéreg-carcinoma diagnózisában ígéretes keringő mikroRNS-ek kifejeződését is vizsgáltuk, hiszen esetleges változásuk hormonhatásokra alkalmazásuk gátja lehetne.

III. MÓDSZEREK

Egészséges egyének keringő mikroRNS mintázatának bioinformatikai elemzése

Metaanalízis keretében a Gene Expression Omnibus adatbázisból (GEO, www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) 5 adatállományt töltöttünk le összesen 61 egészséges egyén keringő mikroRNS expressziós adataival.

A mikroRNS-eket kifejeződési értékük alapján rangsoroltuk és a 20 legmagasabb kifejeződést mutatót, a 20.-hoz viszonyítva fejeztük ki. A PubMed adatbázisból letöltött irodalmi adatokat is elemeztünk (www.pubmed.org).

Betegek és hormonvizsgálatok

A Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján 10 hirtutizmus, hipertónia ill. mellékvesekéreg incidentalóma miatt vizsgált betegeknél Cushing szindróma gyanúja miatt végeztünk kis dózisú (1 mg) egy éjszakás (overnight) Dexametazon szuppressziós tesztet.

Másik 10 betegnél mellékvesekéreg elégtelenség (Addison kór), illetve kongenitális adrenális hiperplázia (21-hidroxiáz defektus) gyanúja miatt ACTH stimulációs tesztet végeztünk, 250 mikrogramm tetracosactide (Cosyntropin, Sandoz Inc.) adásával. Ezen betegek gyengeség, szekunder oligomenorrhéa, infertilitás vagy hirtutizmus miatt kerültek

vizsgálatra. A vizsgálatok eredményei alapján a hypothalamus-hypophysis-mellékvese tengely funkcionális zavara mind a hús esetében kizárható volt.

RNS izolálás a plazmamintákból

Az RNS izolálás Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH) felhasználásával történt.

Kvantitatív valós idejű reverz transzkripció-polimeráz lánreakció (RT-qPCR)

A RT-qPCR vizsgálatok TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) és TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems) felhasználásával történtek. A mintákat 96-lyukú plate-n, 7500 Fast Real-Time PCR System készüléken amplifikáltuk az előírt hőmérsékletértékek és időtartamok mellett. Minden minta esetén három párhuzamos mérést végeztünk.

A következő próbákat használtuk: *hsa-miR-27a* (000408), *hsa-miR-200b* (002251), ***hsa-miR-214*** (002306), ***hsa-miR-483-5p*** (002338), ***hsa-miR-503*** (001048), referenciagénként a *cel-miR-39-t* (000200) használtuk. A félkövéren kiemelt mikroRNS-eket javasolták mellékvesekéreg-carcinoma markerének.

Sejtvonal és *in vitro* kezelések, és molekuláris vizsgálatok

Az *NCI-H295R* mellékvesekéreg carcinoma sejtvonalat az American Tissue Type Culture Collection-ből szereztük be és az ajánlott közegben tároltuk. A vizsgálathoz hormonmentes magzati marhaszérumot (hormone-free fetal bovine seum, FBS) használtunk.

A teljes RNS-t miRNeasy Kit (Quiagen GmbH, Hilden, Germany) felhasználásával izoláltuk. A Dexametazon kezelést négy alkalommal megismételtük.

A teljes RNS-t a sejtekből és a tenyésztőfolyadékból miRNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével vontuk ki a gyártó előírásainak megfelelően a munkacsoport korábbi munkájának megfelelő módosításokkal. A valós idejű PCR reakciót Taqman miRNA Assays (Applied Biosystems) útján végeztük specifikus primerekkel: *hsa-miR-27a* (000408), és a *cel-miR-39* (000200) itt is referenciagénként szolgált.

Statisztikai módszerek

A szignifikáns kifejeződést mutató mikroRNS-ek azonosításához a Shapiro-Wilks normalitás teszt eredményétől függően Student vagy Mann-Whitney tesztet használtunk munkacsoportunk korábbi munkájának statisztikai elemzését követve. Az RT-qPCR adatok statisztikai analízisét Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) szoftverrel végeztük.

IV. EREDMÉNYEK

Egészségesek mikroRNS-profiljának vizsgálata

Kutatásunk során az egészséges egyének vérmintáiban leggyakrabban előforduló mikroRNS-ek *in silico* analízisét végeztük el. A mikroRNS-eket kifejeződési értékük alapján rangsoroltuk és a 20 legmagasabb kifejeződést mutatót, a 20.-hoz viszonyítva fejeztük ki. Emellett szakirodalmi adatokat tanulmányoztunk.

Egy önkényes határvonalat húzva (a rangsorban 20. leggyakoribb mikroRNS-hez viszonyított legalább 10-szeres kifejeződés) a 20 legmagasabb kifejeződésű mikroRNS-t elemeztük. Ezek közül a *hsa-miR-451* (106-szoros kifejeződés a rangsorbeli 20.-hoz képest), a *hsa-miR-223* (11-338-szoros), *hsa-miR-16* (11-20-szoros) és a *hsa-let-7f* (16-szoros) érdemelnek külön említést. Két további mikroRNS: a *hsa-miR-486-5p* három független tanulmányban szerepelt (28.8-szoros kifejeződéssel), és a *hsa-miR-92*, amely egy tanulmányban csaknem 200-szoros kifejeződést mutatott.

E mikroRNS-ek onkogén-tumor szupresszor funkcióit elemezve egy hipotézist állítottunk fel a keringő mikroRNS-ek lehetséges tumor felügyeleti hatásával kapcsolatban.

Keringő mikroRNS-ek változása a Dexametazon és ACTH-tesztek során

Kutatásunk során a kiválasztott öt mikroRNS közül mindössze egy esetében (*hsa-miR-27a*) tapasztaltuk azt, hogy kifejeződése Dexametazon illetve Tetracosactide hatására szignifikánsan változik. A Dexametazon és a Tetracosactide kezelések hatására a *hsa-miR-27a* kifejeződésében ugyanakkor ellentétes változást tapasztaltunk: amíg a Dexametazon hatására annak szintje nőtt, Tetracosactide hatására csökkent kifejeződést tapasztaltunk.

Annak megerősítésére, hogy a *hsa-miR-27a* keringésben igazolt változása mellékvesekéreg eredetű lehet, *in vitro* kísérleteket végeztünk humán mellékvesekéreg carcinoma *NCI-H295R* sejtvonalon. Dexametazon kezelést követően szignifikánsan nőtt a szekretált *hsa-miR-27a* kifejeződése a *NCI-H295R* sejtek tenyésztőfolyadékában.

V. MEGBESZÉLÉS

Munkám első részében elemeztem egészséges egyének esetében a keringésben jelen lévő mikroRNS-eket saját *in silico* vizsgálatok és a szakirodalmi adatok tanulmányozása révén. Eredményeim alapján ezen mikroRNS-ek között a predominánsan tumor szuppresszív hatású mikroRNS-ek relatív felülreprezentációja áll fenn. Felmerül, hogy a keringő, tumor szupresszor aktivitású mikroRNS-ek a transzformáló sejtekbe jutva, azok szaporodását gátolhatják, illetve apoptózist serkenthetik. Ezek alapján feltehető, hogy ezen mikroRNS-ek a szervezet tumorfelügyeleti rendszerében vehetnek részt a jól ismert immunfelügyeleti rendszert kiegészítve. A keringő mikroRNS-ek által mediált tumorfelügyelet a daganatos transzformáció korai fázisában játszhatna szerepet. E hipotézissel szemben számos ellenérv is felhozható, többek között a mikroRNS-ek kettős, szövetspecifikus hatása, a keringő mikroRNS-ek alacsony koncentrációja, és a sejtekbe jutás kérdései is. Mindazonáltal azt gondoljuk, hogy e hipotézis egy érdekes, új megvilágításba helyezheti a keringő mikroRNS-ek egészségesekben szóbjövő funkcióit. Egy másik hipotézisünk szerint, a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatása szintén szerepet játszhat a szervezet daganatok elleni védekezésében, amelynek révén a

daganatok által szekretált, növekedést elősegítő mikroRNS-ek hatása más szövetekben nem tudna érvényesülni.

Munkám második részében irodalmi adatok alapján kiválasztott, állatmodellekben hormonkezelésekre változó, valamint a mellékvesekéreg-carcinoma diagnózisában használható potenciális biomarker mikroRNS-ekre fókuszáltam. Mivel ezekben a betegekben rutinszerűen alkalmaznak hormonstimulációs tesztek, felvetődött, hogy a mikroRNS-ek vérben mérhető koncentrációját esetleg befolyásolhatják az alkalmazott hormontesztek. Tudomásunk szerint a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengelyt érintő hormonális változások és a keringő mikroRNS-ek közötti összefüggést emberben, *in vivo* munkákat megelőzően még nem vizsgálták.

A vizsgált, irodalmi adatok alapján kiválasztott mikroRNS-ek közül csak a *hsa-miR-27a* expressziója változott, Dexametazon fokozta, Tetracosactid csökkentette kifejeződését. *In vitro* mellékvesekéreg-carcinoma sejtvonalon, a Dexametazon szintén fokozta a *hsa-miR-27a* expressziót a sejtek felülúszójában. Mindezek alapján a *hsa-miR-27a in vivo* változó szintjeinek mellékvesekéreg eredete valószínű. A mellékvesekéreg-carcinoma diagnózisában ígéretes mikroRNS-ek, különösen a *hsa-miR-483-5p* expressziója a hormontesztek hatására nem változott, ami

alátámasztja diagnosztikai alkalmazhatóságát ebben a betegcsoportban.

VI. KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeinket az alábbi főbb pontokban foglalhatjuk össze:

1. Az egészséges egyének vérében keringő mikroRNS-ek vizsgálata kapcsán a tumor szupresszor mikroRNS-ek, relatív túlsúlyát figyeltük meg, és ezek alapján felvetettük, hogy ezen mikroRNS-ek az epigenetikai információ közvetítésével a sejtek malignus átalakulását gátolják, ezáltal részt vehetnek a szervezet tumor felügyeleti rendszerében (tumor surveillance).
2. A mikroRNS-ek szövetspecifikus hatása szintén a daganatképződést gátló védelmi mechanizmus részét képezheti.
3. A hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengelyt érintő hormonvizsgálatok (ACTH és Dexametazon) során igazoltuk a keringő *hsa-miR-27a* kifejeződésének megváltozását *in vivo* emberben.
4. A Dexametazon *in vitro* is fokozta a szekretált *hsa-miR-27a* szintjét mellékvesekéreg-carcinoma sejtek felülúszójában.

5. A mellékvesekéreg rosszindulatú daganatában jelenleg legígéretesebb keringő mikroRNS marker a *hsa-miR-483-5p* szintjét a hormonkezelések nem befolyásolták, ami annak potenciális biomarkerként történő használhatóságát alátámasztja.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Igaz I**, Igaz P. (2014) Tumor surveillance by circulating microRNAs: a hypothesis. *Cell Mol Life Sci*,71:4081-4087. **IF (2014): 5,808**
2. **Igaz I**, Nyíró G, Nagy Z, Butz H, Nagy Z, Perge P, Sahin P, Tóth M, Rácz K, Igaz P, Patócs A. (2015) Analysis of circulating microRNAs in vivo following administration of dexamethasone and adrenocorticotropin. *Int J Endocrinol*, 2015: 589230. doi: 10.1155/2015/589230. **IF (2014): 1,948**
3. **Igaz I**, Igaz P. (2015) Possible role for microRNAs as inter-species mediators of epigenetic information in disease pathogenesis: is the non-coding dark matter of the genome responsible for epigenetic interindividual or interspecies communication? *Med Hypotheses*, 84: 150-154. **IF (2014): 1,074**
4. **Igaz I**, Igaz P. (2015) Why is microRNA action tissue specific? A putative defense mechanism against growth disorders, tumor development or progression mediated by circulating microRNA? *Med Hypotheses*, 85: 530-533. **IF (2014): 1.074**

5. Perge P, Nagy Z, **Igaz I**, Igaz P. (2015): Suggested roles for microRNA in tumors. *Biomol Concepts*, 6: 149-155.

6. Igaz P, **Igaz I**, Nagy Z, Nyíró G, Szabó PM, Falus A, Patócs A, Rácz K. (2015) MicroRNAs in adrenal tumors: relevance for pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Cell Mol Life Sci*, 72: 417-428. **IF (2014): 5,808**

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMÁJÁHOZ SZOROSAN NEM KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. **Igaz I**, Szőnyi M, Varga P, Topa L. (2014) A mikro-RNS-ek szerepe a gyulladásoos bélbetegségek diagnosztikájában. Orv Hetil, 155: 487-491.
2. **Igaz I**, Topa L. (2014) A testválnadékok mikro-RNS-kifejeződésoének jelentősége a gyomor-bél rendszeri tumorok diagnosztikájában. Orv Hetil, 155: 11-15.
3. Igaz P, **Igaz I**, RácZ K, Tulassay Z. (2006) Az endokrin pancreas öröklődő daganatai. Orv Hetil, 147: 195-200.
4. Igaz P, Müllner K, Hargitai B, **Igaz I**, Tömböl Z, RácZ K, Tulassay Z. (2007) Marked chromogranin A elevation in a patient with bilateral adrenal incidentalomas, and its rapid normalization after discontinuation of proton pump inhibitor therapy. [Letter to the Editor] Clin Endocrinol, 67: 805-806.