

MikroRNS-ek jelentősége gyermekkori Crohn-betegségben

Doktori tézisek

Szűcs Dániel

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Veres Gábor, DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Glasz Tibor, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Németh István Balázs, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsgabizottság elnöke: Dr. Vásárhelyi Barna, DSc.,
egyetemi tanár

Komplex vizsgabizottság tagjai: Dr. Tory Kálmán, Ph.D.,
egyetemi adjunktus
Dr. Szabó László, Ph.D.,
osztályvezető főorvos

Budapest
2018

Bevezetés

A gyermekkori Crohn-betegség (CD) a gyulladásoz bélbetegség (Inflammatory Bowel Disease: IBD) csoportjába tartozó, krónikus, akár a teljes tápcsatornát érintő, változó lefolyású, immunmediált gyulladásoz kórképe. A gyermekkori kezdetű CD már a diagnózis felállításakor gyakrabban kiterjedt, felső tápcsatornai érintettséggel járó, lefolyását tekintve agresszívebb. Felnőtt korban a cardia területén észlelt „bamboo-joint” elváltozás a sztenotizáló vagy penetráló betegségforma prognosztikai jele.

Az elmúlt években ugrásszerűen megnőtt az érdeklődés az epigenetikai faktorok, köztük a rövid, nem kódoló RNS-ek egy csoportjának, a mikro-RNS-ek (miR) a gyulladásoz folyamat patofiziológiájában betöltött szerepével kapcsolatban. Azonban az eddigi tudományos közlemények között nincs adat a gyermekkori CD felső tápcsatornai miR mintázatáról.

Kutatásom alapját munkacsoportunk korábbi vizsgálatai képezik, amely során emelkedett miR-122, -146a és -155 mintázatot igazoltunk gyermekkori CD gyulladt vastagbél nyálkahártya biopsziás mintáiban.

Kutatásom elsődleges célja a miR-146a, -155 és -122 expressziójának meghatározása volt CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyából származó biopsziás mintáiban. A kapott eredményeket összehasonlítottam a korábbi, colon biopsziás mintákban mért miR expressziós értékekkel. Tekintettel az anti-inflammatorikus transzformáló növekedési faktor (TGF)- β gyulladásoz folyamatokban betöltött szerepére, további célom volt a rekombinás humán (rh)TGF- β ezen miR-ekre kifejtett hatásának vizsgálata vékonybél epitél és duodenum fibroblaszt sejteken.

Bár a felső endoszkópia elvégzése alapvetően szükséges a CD diagnózisának felállításához, jelenleg nem áll rendelkezésre olyan specifikus marker, amely segítségünkre lenne a betegség differenciálásában egyéb fekélyes (*Helicobacter pylori* fertőzés, peptikus fekélybetegség, eosinophil gastritis) vagy granuloma

képződéssel járó (sarcoidosis, Mycobacterium tuberculosis) megbetegedések között. Eredményeink jó alapot képeznek a kiválasztott miR-ek további vizsgálatához, amely alapján lehetségessé válhat a jövőben potenciális diagnosztikus markerként vagy terápiás targetként történő felhasználásuk.

Célkitűzések

- 1.: A miR-146a, -155 és -122 expressziójának meghatározása Crohn-beteg gyermekek duodenum nyálkahártyájából származó biopsziás mintáiban. Gyermekkorban felső gastrointestinalis (GI) traktusból származó mintákból korábban ilyen vizsgálat még nem történt.
- 2.: A kapott eredményeket összehasonlítottam a korábbi, colon biopsziás mintákban mért miR expressziós értékekkel.
- 3.: További céloom volt a rhTGF- β ezen miR-ekre kifejtett hatásának vizsgálata vékonybél epitél és duodenum fibroblaszt sejteken.

Módszerek

Betegek

A kutatásban szereplő szövetminták a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján vizsgált és gondozott betegek biopsziáiból származnak. A vizsgálat a Semmelweis Egyetem Egészségügyi Tudományos Tanácsa által engedélyezett (TUKEB No.: 10408/2012). A vizsgálat megkezdése előtt az érintett gyermekek szülei írásos beleegyező nyilatkozatot tettek.

A CD diagnózisának felállítása a „Portói” kritériumoknak megfelelően történt. A betegség aktivitásának megítélésre „Pediatric Crohn’s Disease Activity Index” (PCDAI)-et használtunk. A kontroll biopsziák makroszkóposan és szövettanilag is ép nyálkahártyából származtak. A mintákat visszatérő hasfájás, valamint organikus betegség kizárására végzett endoszkópos vizsgálaton átesett betegekből származtak.

Vizsgálatainkat CD-s (CD; n=20) gyermekek makroszkóposan ép (CD ép; n=10) és kóros (CD kóros; n=10), valamint kontrollként egészséges (K; n=10) gyermekek biopsziáin végeztük. A mintavétel után a szövetdarabokat azonnal pufferelt formaldehidben fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk.

Vékonybél epitél és duodenum fibroblaszt sejtek kezelése rhTGF- β -val

Normál vékonybél epitél (CCL-241) sejteket 10%-os borjú savóval, 30 ng/mL epidermális növekedési faktoral, és 1%-os Penicillin és Streptomycin keverékkel kiegészített HybriCare táptalajon tenyésztettünk. A folyamat standard körülmények között (37°C, párasított, 5% CO₂/95% levegő összetételű légkör) történt.

A primer fibroblaszt sejtek egészséges gyermekek duodenum nyálkahártyájából a Seymour és mtsai. által leírt módon kerültek izolálásra. A mintákat foszfát-alapú pufferrel (PBS) mostuk, majd

1mg/mL kollagenáz tartalmú PBS-sel homogenizáltuk. A sejteket 1%-os FBS-sel és 1% Penicillin-Streptomycin keverékkel kiegészített Dulbecco's Modified Eagle Medium táptalajon tenyésztettük. A folyamatot itt is standard körülmények között (37°C, pársított, 5% CO₂/95% levegő összetételű légkör) végeztük. A tenyésztés alatt 24 óránként a különálló sejteket eltávolítottuk egybefüggő sejtréteg kialakulásáig.

A sejt kultúrák elkészülte után az epitél és primer fibroblaszt sejteket 6-lyukú lemezekre osztottuk szét, 5x10⁵ sejt/lyuk sűrűségben, majd rhTGF-β-val (1nM, 24 óra), illetve a kontroll csoport esetében vehikulummal (24 óra) kezeltük.

RNS izolálás

A formalinban-fixált, paraffinba ágyazott mintákból RNeasy Minikittel izoláltunk teljes RNS-t. A paraffin eltávolítása a gyártó utasításainak megfelelően történt. A szennyezőanyagok kimosása után DNase-t használtunk a DNS enzimatiszta emésztéssel történő eltávolításához. Végül a koncentrált RNS-t RNeasy MinElute spin oszlopokkal, 30 μL vízzel eluáltuk.

A vékonybél epitél és fibroblaszt sejtekből Quick-RNA MiniPrep isolation kit-tel, a gyártó utasításainak megfelelően izoláltuk a teljes RNS-t. RNA Lysis Buffer-t és Zymo-Spin oszlopot használtunk az RNS tisztítására. A szennyezőanyagok kimosása után (RNA Prep és Wash Buffer) DNase-sal távolítottuk el a DNS-t. Az RNS-t 30 μL vízzel eluáltuk, majd egyből felhasználtuk.

Reverz transzkripció és valós idejű polimeráz láncreakció

Az izolálás során kapott RNS reverz transzkripciójához TaqMan MicroRNA Reverse Transcription kit-et használtunk.

Az egyes miR-ek mennyiségét valós idejű reverz transzkripcióval és valós idejű polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) TaqMan MicroRNA Assay felhasználásával, LightCycler 480 műszeren végeztük. A

mérések háromszorozva (triplikátumokban) történtek. A vizsgált miR-ek relatív expresszióját $2\Delta Cq$ módszert használva, standardként U6-hoz viszonyítva határoztuk meg.

Statisztika

A statisztikai vizsgálatokhoz a Graphpad statistical software csomagot használtuk. Shapiro-Wilk normalitás tesztet végeztünk. Az adatokat Mann-Whitney U-teszttel, Kruskal-Wallis, Analysis of variance (ANOVA) és Dunn's Post-Hoc teszttel elemeztük. Szignifikáns eltérésnek $p \leq 0,05$ vettük.

Eredmények

A miR-146a expressziója CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában

A miR-146a expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a makroszkóposan kóros duodenum nyálkahártyájú betegek mintáiban az ép mukózából származó CD-s biopsziákhoz (CD kóros: $3,21 \pm 0,50$ vs. CD ép: $0,62 \pm 0,26$, $p \leq 0,01$) és a kontroll mintákhoz (CD kóros: $3,21 \pm 0,50$ vs. Kontroll: $1,00 \pm 0,33$, $p \leq 0,05$) képest. Nem volt különbség az ép CD-s és kontroll minták miR-146a expressziója között (CD ép vs. Kontroll: $p = \text{N.S.}$).

Összehasonlítva a korábbi vizsgálati eredményeinkkel, a colonból származó mintákban a miR-146a szintje magasabb volt a makroszkóposan kóros CD-s mintákban a makroszkóposan ép és kontroll csoporthoz képest (CD kóros: $6,66 \pm 1,52$ vs. Kontroll: $1 \pm 0,23$, $p < 0,001$, CD kóros $6,66 \pm 1,52$ vs. CD ép: $1,79 \pm 0,45$, $p < 0,05$). Nem volt különbség a kontroll és CD-s ép minták miR-146a expressziójában a colon nyálkahártya esetében sem (CD ép vs. Kontroll: $p = \text{N.S.}$).

A miR-155 expressziója CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában

A miR-155 expressziója szignifikánsan magasabb volt a makroszkóposan kóros duodenum nyálkahártyájú betegek mintáiban a kontrollokhoz képest (CD kóros: $4,87 \pm 1,02$ vs. Kontroll: $1,00 \pm 0,40$, $p \leq 0,001$). Nem volt különbség a CD ép és kontroll minták miR-155 expressziója között (CD ép: $2,50 \pm 0,38$ vs. Kontroll: $1,00 \pm 0,40$, $p = \text{N.S.}$).

Összehasonlítva a korábbi vizsgálati eredményeinkkel, a colonból származó minták miR-155 expressziója emelkedett volt a makroszkóposan gyulladt CD-s biopsziákban a makroszkóposan ép és kontroll biopsziákhoz képest (CD kóros: $8,52 \pm 1,90$ vs. Kontroll:

1±0,21, p<0,001, CD kóros: 8,52±1,90 vs. CD ép: 1,73±0,38, p<0,05), az ép és kontroll csoport között nem volt különbség.

A miR-122 expressziója CD-s gyermekek duodenum nyálkahártyájában

Nem volt különbség a CD-s és kontroll duodenum nyálkahártya minták miR-122 expressziója között (CD kóros: 0,86±0,25, CD ép: 0,96±0,14, Kontroll: 1,00±0,28, p=N.S).

Összehasonlítva a korábbi vizsgálati eredményeinkkel, a colonból származó mintákban a miR-122 expressziója magasabb volt a CD-s gyermekek makroszkóposan ép biopsziás mintáiban a kontroll csoporthoz képest (CD ép: 3,12±0,71 vs. Kontroll: 1±0,17, p<0,05).

A miR-146a, -155 és -122 expressziója rhTGF-β-val kezelt vékonybél epitel sejtekben

A rhTGF-β nem befolyásolta a miR-146a expresszióját (p=N.S.), azonban csökkentette a miR-155 expresszióját a CCL-241 vékonybél epitel sejteken (rhTGF-β: 0,7±0,083 vs. Kontroll: 1±0,09, p≤0,05). Nem volt mérhető mennyiségű miR-122 a vékonybél epitel sejtekben.

A miR-146a, -155 és -122 expressziója rhTGF-β-val kezelt duodenum fibroblasztokban

A rhTGF-β csökkentette a miR-146a (rhTGF-β: 0,67±0,04 vs. Kontroll: 1±0,15, p≤0,01) és miR-155 (rhTGF-β: 0,72±0,09 vs. Kontroll: 1±0,06, p≤0,05) expresszióját a duodenum fibroblasztokon a vehikulummal kezelt kontroll sejtekhez képest. A rhTGF-β kezelés nem befolyásolta a miR-122 expresszióját (p=N.S.).

Következtetések

Vizsgálataink alapján az alábbi új megállapításokat tehetjük:

1. A miR-146a és -155 expressziója emelkedett a Crohn-beteg gyermekek gyulladt duodenum nyálkahártyájában.
2. Ezen eredmények megegyeznek a korábbi vizsgálati eredményünkkel, ahol a gyulladt colon nyálkahártyában igazoltunk emelkedett miR-146a és -155 szintet.
3. Előző (colon) kutatási eredményünkkel ellentétben a duodenum biopsziás mintákban nem találtam eltérő miR-122 expressziót a vizsgálati csoportok között.
4. A gyermekkori Crohn-betegek gyulladt bélnyálkahártyájában mérhető emelkedett miR-146a és -155 expresszió a gyulladásos folyamat patomechanizmusában betöltött gyulladás-specifikus szerepüket igazolja.
5. A miR-146a és -155 a gyulladás lokalizációjától független, a miR-122 ettől függő expressziót mutat.
6. Az anti-inflammatorikus rhTGF- β a miR-155 negatív regulátora duodenum fibroblaszt és vékonybél epitél sejteken, miR-146a esetében az előbbi sejtenyészetben.
7. Ezen eredmények jó alapot képeznek a kiválasztott miR-ek további vizsgálatához, amely lehetővé teszi, hogy a jövőben potenciális diagnosztikus markerként vagy terápiás targetként kerüljenek felhasználásra.

Saját publikációk jegyzéke

1. **Dániel Szűcs**, Nóra J. Béres, Réka Rokonay, Kriszta Boros, Katalin Borka, Zoltán Kiss, András Arató, Attila J. Szabó, Ádám Vannay, Erna Sziksz, Csaba Berecki and Gábor Veres. (2016) Increased duodenal expression of miR-146a and -155 in pediatric Crohn's disease. *World J Gastroenterol*, 22: 6027–6035. IF: 3,365 (JCR, 2016)
2. Nóra Judit Béres, Dolóresz Szabó, Dorottya Kocsis, **Dániel Szűcs**, Zoltán Kiss, Katalin Eszter Müller, Gábor Lendvai, András Kiss, András Arató, Erna Sziksz, Ádám Vannay, Attila J. Szabó, Gábor Veres. (2016) Role of altered expression of miR-146a, miR-155 and miR-122 in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Disease*, 22:327-35. IF: 4,525 (JCR, 2016)
3. **Szűcs Dániel**, Várkonyi Ágnes, Béres Nóra Judit, Szabó Dolóresz, Boros Kriszta Katinka, Arató András, Veres Gábor. (2014) Mikro-RNS-ek diagnosztikai jelentősége gyulladásos bélbetegségben. *Gyermekgyógyászat*, 65:160-165.
4. **Szűcs Dániel**. (2013) A széklet calprotectin-vizsgálat jelentősége gyermekkorban. *Gyermekgyógyászati Továbbképző Szemle*, 18:13-15.

Egyéb publikációk

1. Kovács M, Müller KE, Arató A, Várkonyi Á, Dezsőfi A, **Szűcs D**, Tomsits E, Tóth G, a Magyar Gyermekek IBD regiszter résztvevői Veres G. (2010) A felső endoszkópia jelentősége a gyermekkori gyulladáscsökkentő bélbetegségben (IBD) szenvedő gyermekekben. *Gyermekgyógyászat* 61:98-104.
2. Szakál O, Király A, **Szűcs D**, Katona M, Boda D, Tálosi GJ. (2012) Measurement of gastric-to-end-tidal carbon dioxide difference in neonates requiring intensive care. *Mat Fet Neonat Med*, 25: 1791–1795
3. Marta Kovacs, Katalin Eszter Muller, Andras Arato, Peter Laszlo Lakatos, Judit B. Kovacs, Agnes Varkonyi, Eniko Solyom, Marianne Polgar, Eva Nemes, Ildiko Guthy, Istvan Tokodi, Gergely Toth, Agnes Horvath, Andras Tarnok, Erika Tomsits, Noemi Csozanszky, Marta Balogh, Noemi Vass, Piroska Bodi, Antal Dezsofi, Laszlo Gardos, Eva Micskey, Maria Papp, **Daniel Szucs**, Aron Cseh, Kriszta Molnar, Doloresz Szabo, Gabor Veres on behalf of the Hungarian IBD Registry Group (HUPIR). (2012) Diagnostic yield of upper endoscopy in paediatric patients with Crohn's disease and ulcerative colitis. Subanalysis of the HUPIR registry. *J. Crohn's Colitis*, 6: 86–94.
4. Katalin E. Müller, Péter L. Lakatos, András Arató, Judit B. Kovács, Ágnes Várkonyi, **Dániel Szűcs**, Erzsébet Szakos, Enikő Sólyom, Márta Kovács, Marianne Polgár, Éva Nemes, Ildikó Guthy, István Tokodi, Gergely Tóth, Ágnes Horváth, András Tárnok, Noémi Csozanszki, Márta Balogh, Noémi Vass, Piroska Bódi, Antal Dezsőfi, László Gárdos, Éva Micskey, Mária Papp, Áron Cseh, Dolóresz Szabó, Péter Vörös, Hungarian IBD Registry Group (HUPIR), and Gábor Veres. (2013) Incidence, Paris classification, and follow-up

in a nationwide incident cohort of pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 57:576-82

5. Dolóresz Szabó, Éva Hosszú, András Arató, Katalin Eszter Müller, Nóra Béres, Péter László Lakatos, Mária Papp, Antal Dezsőfi, Attila J Szabó, Dániel Szűcs, Gabor Veres. (2015) Seasonal variability of vitamin D and bone metabolism in infliximab-treated paediatric Crohn's disease. *Dig Liver Dis*, 47:652-7
6. Müller KE, Lakatos PL, Kovacs JB, Arato A, Varkonyi A, Nemes E, Tarnok A, Toth G, Papp M, Solyom E, Horvath A, Guthy I, Kovacs M, Hungarian IBD Registry Group (HUPIR): Arato A, Dezsöfi A, Cseh A, Voros P, Szabo D, Polgar M, Balogh M, Bodi P, Czelecz J, Szigeti K, Csoszanszki N, Tomsits E, Gardos L, Tomcsa G, Harangi F, Schultz K, Kis I, Micskey E, Pollak E, Rosta I, Szakos E, Szabados K, Szathmari E, Tamas K, Tokodi I, Toth A, Vajdovich E, Szucs D, Vass N, Veres G. (2016) Baseline characteristics and disease phenotype in inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 62: 50-55