

EGYETEMI DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Eltérő expressziós szintet mutató mikroRNS-ek és a miR-126 antiproliferatív hatása a
kissejtes tüdőrákban**

Miko Edit

Témavezető: Dr. Scholtz Beáta



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2011

**Eltérő expressziós szintet mutató mikroRNS-ek és a miR-126
antiproliferatív hatása a kissejtes tüdőrákban**

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta:
Miko Edit
okleveles biológus

Készült a
Debreceni Egyetem
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia
doktori iskolája keretében

Témavezető: Dr. Scholtz Beáta

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
Dr. Széll Márta, az MTA doktora

A doktori szigorlat időpontja:

2011. október 28. 11:00

Az értekezés bírálói:

Dr. Silhavy Dániel, Ph.D.
Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus
tagok: Dr. Silhavy Dániel, Ph.D.
Dr. Antal-Szalmás Péter, Ph.D.
Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
Dr. Széll Márta, az MTA doktora

Az értekezés védésének időpontja:

2011. október 28. 13:00

I. sz. Belgyógyászati Klinika tanterme

1. Bevezetés

1.1. A kissejtes tüdőrák.

A rákos megbetegedések között világszerte a tüdőrák okozta mortalitás a legmagasabb. A tüdő neuroendokrin tumorjai 4 altípusba sorolhatóak: tipikus és atipikus karcinoid tumorok, nagysejtes neuroendokrin tumorok (LCNEC) és kissejtes tüdőrák (SCLC). Ez a 4 altípus morfológiai és immunhisztokémiai jellemzőik, illetve jellegzetes kromoszóma-aberrációik alapján különböztethető meg. A globális génexpressziós mintázat viszont csak 2 prognosztikailag különböző altípust azonosított, a karcinoid tumorokat és a magas kockázatú neuroendokrin tumorokat (HGNT); ez utóbbiak közé tartoznak a nagysejtes neuroendokrin tumorok és a kissejtes tüdőrák is.

Az SCLC a tüdődaganatok 20 %-át teszi ki, gyors progresszióval és korai metasztatizáló képességgel jellemezhető tumor. A tumorsejtek proliferációját számos aberránsan aktiválódott pro-proliferatív szignálút vonal, valamint a tumor által termelt neuropeptidok autokrin és parakrin módon stimulálják. A legfontosabb rizikó faktor az SCLC kialakulásában a dohányzás - a dohányzóknál 20-30-szor magasabb az esély az SCLC kialakulására, mint a nemdohányzóknál.

A SCLC érzékeny a kezdeti kemoterápiára, viszont a legtöbb beteg gyors visszaesést mutat és rezisztensé válik bármilyen terápiás alkalmazással szemben. A kemoterápiás és radioterápiás kezelések együttes alkalmazása ellenére is az 5 éves túlélés is csupán 5 % körül mozog. A rossz túlélési mutatókhoz az is hozzájárul, hogy az SCLC-t majdnem minden esetben késői stádiumú tumorként diagnosztizálják.

1.2. Génmutációk és aberráns szignálútvonalak a kissejtes tüdőrákban.

Az SCLC sejtek számos neuroendokrin markert fejeznek ki; ezek közül a NCAM1 sejt felszíni protein, neuronspecifikus enzimek és neuropeptid hormonok az SCLC tumorok szinte 100%-ában kimutatható, összehasonlítva az NSCLC-vel (nem kissejtes tüdőrák), ahol ezek a markerek nagyon kis százalékban mutathatóak ki (0-20%). Az SCLC-ben leggyakrabban előforduló genetikai aberrációk közé tartozik a retinoblastoma gén inaktivációja, a p53 és FHIT tumor gátló gének mutációi, melyek hozzájárulnak a kontrollálatlan sejtosztódáshoz. Több más genetikai elváltozás is előfordul az SCLC-ben, mint az anti-apoptotikus BCL-2 gén megemelkedett expressziója, a telomeráz enzim

megnövekedett aktivitása, a mátrix metalloproteináz inhibitorok csökkent expressziója, valamint a vaszkuláris növekedési faktorok emelkedett expressziós szintje. A C-MYC gén amplifikációja és az anti-apoptotikus kaszpáz-8 gén hipermetilációja szinte kizárólagosan csak az SCLC-re jellemző.

SCLC-ben számos receptor tirozin kináz magas szintű expresszióját is megfigyelték, mint például a c-Kit, c-Met és GRP receptorok emelkedett expresszióját. Ezek a receptorok ligandjukkal kapcsolódva számos, a sejtek proliferációjában szerepet játszó szignálút vonalat indítanak be, többek között a PI3K/Akt és mTOR út vonalakat. A PI3K–Akt–mTOR út vonal aktiválása elősegítheti a tumorok kialakulását és részt vehet a terápia elleni rezisztencia kialakulásában.

1.3. RNS interferencia.

Az RNS interferencia egy szekvencia-specifikus, poszt-transzkripcionális géncsendesítési mechanizmus, melyben dupla szálú RNS molekulák vesznek részt azáltal, hogy az mRNS-hez kapcsolódva gátolják azok transzlációját, illetve bizonyos esetekben az mRNS degradációját váltják ki. Az RNS interferencia kulcs molekulái a kis szabályozó RNS-ek, mint a mikroRNS-ek (miRNS), melyek egy többlépéses érési folyamat során keletkeznek. Az elmúlt évek kutatásai is bizonyítják hogy a miRNS-ek számos sejtbiológiai folyamatban vesznek részt, mint például a fejlődésben, differenciációban, proliferációban és apoptózisban. Számos ráktípusban kimutatták már a miRNS-ek aberráns expresszióját, valamint azt is, hogy számos tumorgátló gén illetve onkogén szabályozásában is részt vesznek. A miRNS-ek ezen gének expresszióját befolyásolják azáltal, hogy a target mRNS 3' UTR régiójához kapcsolódva gátolják azok transzlációját vagy degradálják az mRNS-t. A tumorbiológiában ma már az RNS interferencia terápia lehetőség is széles körben kutatott terület.

1.4. MikroRNS célgének.

A miRNS-ek pontos funkciójának megértéséhez szükség van a miRNS célgénjeinek azonosítására az adott kísérleti rendszerben. A növényvilágban a miRNS-ek a target mRNS-el teljesen komplementer módon kapcsolódva váltják ki a mRNS-ek degradációját.

Az állatvilágban és az emberben gyakoribb eset az, mikor a miRNS a target mRNS-ről történő fehérjeszintézist gátolja azáltal, hogy a mRNS 3' UTR régiójához kapcsolódik nem teljesen komplementer módon. Egy miRNS-nek több száz különböző célgénje lehet, és egy mRNS

számos különböző miRNS célpontjaként szolgálhat. Ha negatív korreláció figyelhető meg a miRNS és mRNS expressziós szintje között, akkor valószínűsíthető hogy az mRNS célgénje az adott miRNS-nek. A miRNS targetének mRNS és fehérje szinten is szabályozódhatnak, viszont sok esetben előfordul, hogy a célgén csak fehérje szinten mutat hatást. Számos számítógépes program létezik a lehetséges miRNS célgének azonosítására, mint például a TargetScan és PicTar. A lehetséges miRNS célgének száma 100-tól 1000-ig is terjedhet, mely megnehezíti a validálási kísérleteket.

1.5. A mikroRNS-ek szerepe a rákban.

Azok a miRNS-ek, melyek az egyes ráktípusokban alacsony szinten expresszálódnak és célgénjei onkogének, tumorgátló miRNS-ként, míg azok a miRNS-ek melyek magas szinten expresszálódnak és célgénjei a tumorgátló gének, onkogénként funkcionálnak.

A miRNS-ek fontos szerepet töltenek be a tumorbiológiában, ezt alátámasztja az a tény is, hogy az ismert miRNS-ek 50%-a olyan genomi régiókban található, melyek tumorokban amplifikálódnak vagy deletálódnak.

1.5.1. Egy példa a tumor gátló mikroRNS-ekre: A Let-7 miRNS és szerepe a tüdőrákban.

A let-7 miRNS olyan kromoszómális régióban helyezkedik el, mely általában deletált az egyes ráktípusokban. Kísérletek igazolták, hogy a let-7 szabályozza a sejtciklus ellenőrző pontjainak átlépését; számos olyan let-7 célgén azonosítottak, melyek a sejtciklus G1/S illetve G2/M átmenetét segítik elő, mint például a CDK6, CDC25, CCND2 gének.

A let-7 miRNS alacsony szinten expresszálódik a tüdőtumorsejtekben is. Tüdő adenokarcinóma sejtekben megfigyelték, hogy a let-7 expressziójának megemlése gátolta tüdőrák sejtek növekedését in vitro. A sejtciklus szabályozó génjein kívül a let-7 kapcsolódik a RAS gén mRNS-ének 3'UTR régiójához is, és gátolja annak transzlációját. Tüdőtumorsejtekben az alacsony let-7 és magas RAS protein expresszió korrelációja is azt bizonyítja, hogy a let-7 tumorgátló géneként funkcionál a tüdő onkogenézisében.

1.5.2. Egy példa az onkogén mikroRNS-ekre: A miR-17-92 klaszter és szerepe a tüdőrákban.

A miR-17-92 klaszter a C13orf25 gén 3. intronjában, a 13q31.3 kromoszomális régióban helyezkedik el és hét miRNS-t foglal magába: miR-17-5p/3p, miR-18, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 és miR-92. A miR-17-92 klaszter magas szinten expresszálódik a tüdőrákban, főleg az agresszív típusában, az SCLC-ben. A miR-17-5p és miR-20a miRNS-ek gátlása apoptózishoz vezet, míg a miR-17-92 klaszter magas szintű expressziója segíti a tumorsejtek növekedését. Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a miR-17-92 klaszter magas expressziója fontos szerepet játszhat a tüdőrák kialakulásában és proliferációjában.

A miR-17-92 klaszter részt vesz a sejtproliferáció szabályozásában, a C-MYC és E2F géneket magába foglaló útvonalakon keresztül. A C-MYC aktiválhatja az E2F gént és a miR-17-92 klasztert is, míg a miR-17-5p és miR-20a miRNS-ek negatívan szabályozzák az E2F transzlációját. A miR-17-92 klaszter és C-MYC onkogén kapcsolata érdekes lehet SCLC-ben, mivel a MYC géncsalád tagjai gyakran amplifikálódnak és/vagy magas szinten expresszálódnak SCLC-ben.

1.6. A mikroRNS-ek, mint lehetséges biomarkerek és terápiás célpontok a tumorokban.

A miRNS-ek stabilak az egyes szövetmintákban, a szérumban és más testfolyadékban is, összehasonlítva az mRNS-el. Számos tanulmányban meghatározták már a keringésben jelenlevő miRNS-ek mintázatát, melyek a miRNS-ek új biomarkerként való felhasználásának lehetőségét teremthetik meg, akár diagnosztikai, akár prognosztikai céllal.

Tumorerő esetén amennyiben a megváltozott miRNS expressziós mintázat korrelál a malignus fenotípussal, ott diagnosztikai markerként, míg ahol a megváltozott miRNS expresszió a betegség lefolyásával hozható összefüggésbe, mint például a metasztázisok kialakulásával, ott prognosztikai markerként használható.

A miRNS-eket a jövőben esetleg terápiás ágensként is használhatják majd. Olyan esetekben, mikor az adott miRNS alacsony expressziós szintet mutat a tumorsejtekben, a miRNS-mimetikumokat használhatjuk. A miRNS-mimetikumok szintetikus, duplaszálú kis RNS molekulák, melyek szekvenciája teljesen azonos az endogén miRNS-el. Olyan esetekben, mikor az adott miRNS magas expressziós szintet mutat a tumorsejtekben, az antagomiR-eket használhatjuk a miRNS expresszió specifikus blokkolására. Elmén és kollégái kimutatták,

hogy az LNA-antimiR-122 afrikai zöld majmokban csökkentette a májspecifikus miR-122 expresszióját, valamint csökkent a totál plazma koleszterol szintje, májtoxicitás nélkül. Az LNA-antimiR antiszensz oligonukleotidok elég stabilak in vivo, alacsony a toxicitásuk, ezért valószínűleg új terápiás lehetőségként is szolgálhatnak a miRNS-ek gátlására.

A miRNS-ek számos gén expresszióját szabályozhatják, ezért a miRNS terápia lehetséges 'off target' hatása komoly problémát jelent. Ezen probléma kiküszöbölhető lehet olyan rendszer fejlesztésével, mely a szintetikus miRNS oligonukleotidokat specifikusan a tumor szövetbe vagy a rákos sejtekbe szállítja.

2. Célkitűzések

Kísérleteink első célja a kissejtes tüdőrákra jellemző miRNS-ek expressziós mintázatának feltérképezése volt, microarray és qRT-PCR technikák felhasználásával.

Számos miRNS gén olyan kromoszomális régiókban helyezkedik el, melyeknél tumorokban gyakori a genetikai aberráció. Néhány alacsonyán expresszáldó miRNS olyan kromoszóma régióban található, melyeknél SCLC-ben gyakori a heterozigóta deléció. A magas expressziós szintet mutató miRNS-ek viszont általában nem fednek át olyan kromoszóma régiókkal, melyek SCLC-ben gyakran amplifikálódnak. Ezért kísérleteinkben 5 magas expressziós szintet mutató miRNS (miR-17-92, miR-183/96, miR-182, miR-95 és miR-301) kópiaszám változását is megvizsgáltuk SCLC sejtvonalakban és primer SCLC tumorokban.

Kísérleteink második fázisában az SCLC-ben alacsony expressziós szintet mutató miRNS-ek funkcióját tanulmányoztuk. A miR-126 az összes vizsgált SCLC mintában alacsony expressziós szintet mutatott, ezért a miR-126 expressziójának megnövelésével vizsgáltuk annak hatását az SCLC sejtek proliferációjára és a sejtciklusra. A miRNS-ek a génexpresszió szabályozásában vesznek részt azáltal, hogy a target mRNS 3' UTR régiójához kapcsolódva gátolják azok transzlációját vagy az mRNS degradációját okozzák. Kísérleteink célja az volt, hogy azonosítsunk egy új miR-126 célgént, mely hozzájárulhat a miR-126 SCLC sejtek proliferációjára gyakorolt hatásához.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtkultúrák és humán minták

Az SCLC sejtvonalak az ATCC (American Type Culture Collection) laboratóriumából származnak (H69, HTB-172, HTB-173 és HTB-184). A sejtvonalakat 10% hőinaktivált foetális borjúsérumot és 1 % antibiotikumot (penicillin/streptomycin) tartalmazó RPMI 1640 médiumban növesztettük 37 °C állandó hőmérséklet és 5 % CO₂ tartalom mellett.

A normál humán tüdőszövetminták a Debreceni Egyetem II. Sebészeti Klinikájáról származtak. A perifériás vérminták a Debreceni Egyetem Tüdőklinikájáról származtak, egészséges egyénektől. A formalin-fixált és paraffinba ágyazott primer SCLC tumor minták a Debreceni Egyetem Patológiai Intézetéből származtak.

3.2. A formalin-fixált és paraffinba ágyazott primer SCLC tumor minták mikrodisszekciója

A tumor blokkokból 12 sorozatmetszet készült, az első és az utolsó (4 µm) metszeteken hematoxylin-eosin festések készültek. Ezenkívül 5 darab (20 µm) metszet készült mikrodisszekcióra. A Debreceni Egyetem Patológiai Intézetében került sor ezen metszetek mikrodisszekciójára, mely során képzett patológus mikroszkóp alatt elválasztotta a tumoros és normál szöveti régiókat egymástól. A fennmaradó 4 µm-os metszeteket használtuk fel immunhisztokémiára.

3.3. Nukleinsav izolálás

Normál tüdőszövet mintákból és az SCLC sejtvonalakból Trizol reagens (Invitrogen) segítségével totál RNS-t izoláltunk a gyártó ajánlása szerint.

Az SCLC sejtvonalakból és a perifériás vér mononukleáris sejtjeiből genom DNS-t izoláltunk a 'Qiagen Blood and Cell Culture kit' segítségével a gyártó ajánlása szerint.

A formalin-fixált és paraffinba ágyazott mintákból a 'RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit' (Ambion) segítségével nyertük ki a totál RNS-t illetve DNS-t a gyártó ajánlása szerint.

3.4. MikroRNS microarray

Az SCLC sejtvonalak és normál tüdőszövet miRNS expressziós mintázatának microarray analízisét az LC Sciences szolgáltató cég végezte.

(LC Sciences, Houston, TX, <http://www.lcsiences.com>, miRNA dual-color microarray platform, Human V7.1).

Ez a típusú microarray 319 érett miRNS-t vizsgált, melyeket 4 egyéni próba reprezentált a chip-eken. A normál tüdőszövet RNS 6 független minta összekeverésével készült, a sejtvonal RNS-eket pedig egyedileg három chip-en vizsgáltuk. Normalizálás után a relatív miRNS expressziós szintek (SCLC sejtvonalak a normál tüdőszövethez viszonyítva) a 3 SCLC sejtvonal microarray átlagértékéből és a 3 normál tüdőszövet microarray átlagértékéből származtak. Az adatok normalizálására a miR-342 miRNS-t használtuk és az adatokat a GeneSpring 7.3 szoftverrel elemeztük ki.

3.5. MikroRNS real-time kvantitatív RT-PCR analízis

A microarray kísérlet alapján azonosítottunk több olyan miRNS-t, melyek az SCLC sejtvonalakban és normál tüdőszövetben eltérő expressziós szintet mutattak. Ezeket a továbbiakban qRT-PCR analízissel vizsgáltuk, 'TaqMan MicroRNA Assays Early Access Kit' és egyedi miRNS qRT-PCR assay-k (Applied Biosystems) segítségével a gyártó ajánlása szerint.

Az első kísérletekben 62 miRNS expressziós szintjét vizsgáltuk az alábbi mintákon: formalin-fixált és paraffinba ágyazott primer SCLC tumor mintákon, SCLC sejtvonalakon és a megfelelő normál mintákon. A primer tumormintákból származó RNS-eket a qRT-PCR előtt 6 mintából kellett összekevernünk, mivel nagyon kis mennyiségű RNS-t sikerült kinyerni a formalin-fixált és paraffinba ágyazott primer SCLC tumor mintákból.

A további kísérletekben már kevesebb miRNS expressziós változását követtük nyomon (7 alacsony és 8 magas szinten expresszálódó miRNS) 17 egyedi tumor mintában. Ezekből a mintákból elegendő RNS-t sikerült kinyerni a mérésekhez, így az RNS-ek keverésére nem volt szükség.

A kvantitatív PCR mérést ABI 7900 HT készüléken végeztük. A relatív miRNS expressziós szintek (tumor minta a normál mintához képest) számításához a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszert használtuk.

3.6. Kópiaszám analízis

Öt primerpárt terveztük 5 miRNS (miR-183, miR-182, miR-95, miR-301 és miR-17-92 klaszter) genom kópiaszám meghatározásához az SCLC sejtvonalakban (H69, HTB-172, HTB-173, HTB-184), 4 formalin-fixált paraffinba ágyazott primer SCLC tumor mintában és a megfelelő normál mintákban.

A PBMC genom DNS öt tumor mentes egyén DNS keverékéből származott. A relatív génkópiaszámok számításához szintén a 2^{-ddCt} módszert alkalmaztuk. Megfelelő normalizáló géneknek ebben a kísérleti rendszerben a PP1A, TBP és H19 gének bizonyultak.

Az 5 miRNS genom régiójának kópiaszám méréséhez illetve a TBP és H19 normalizáló gének expressziójának méréséhez SYBR Green I kvantitatív PCR analízist használtunk, míg PP1A gén expressziójának méréséhez TaqMan qPCR-t alkalmaztunk.

A kapott Ct értékek mind a miRNS-ek, mind a normalizáló gének esetében 3 vagy 5 különböző kvantitatív PCR mérésből származtak, minden mintát duplikátumban mértünk minden PCR reakcióban. A statisztikai analízishez 'paired two tailed t-tesztet' használtunk, CI 95%.

3.7. Reagensok és transzfekció

A hsa-miR-126 Precursor miRNS Molekula (PM12841) és a Pre-miR Negatív Kontroll \neq 1(AM17110) az Ambion cégtől származott. Az SLC7A5 siRNS (s15653), PLK2 siRNS (s64) és Silencer Select Negatív Kontroll \neq 1 siRNS (4390843) az Applied Biosystems cég termékei. Minden kísérletben tranziens transzfekcióval vittük be a sejtekbe a pre-miR-126 prekursor molekulát, SLC7A5, PLK2 siRNS-eket és a megfelelő kontrollokat, 50 nM végkoncentrációban, Lipofectamine 2000 transzfekciós reagens (Invitrogen) segítségével. A sejteket a transzfekciós komplexszel 6 órán keresztül inkubáltuk, majd a sejteken naponta cseréltünk médiumot.

3.8. Sejtnövekedés vizsgálata

A sejteket (1.2×10^6 sejt/well) 6 lyukú plate-n tenyésztettük és transzfektáltuk miRNS prekursor molekulákkal. 48 órával a transzfekciót követően a sejtek egytized részét növesztettük tovább 24-lyukú plate-n. A transzfekciót követően különböző időpontokban (48,

72, 96 órával a transzfekció után) tripánkékes sejtszámolást végeztünk. Az eredmények 3 független kísérletből származnak.

3.9. Sejtciklus analízis

A sejteket (1.2×10^6 sejt/well) 6 lyukú plate-n tenyésztettük és transzfektáltuk miRNS prekursor molekulákkal és siRNS-ekkel. 48 órával a transzfekciót követően a sejtek egyötöd részét növesztettük tovább új 6-lyukú plate-n. A sejteket 72 és 96 órával a transzfekciót követően összegyűjtöttük, mostuk PBS-el és fixáltuk hideg 95 % metanolban $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. A fixált sejteket mostuk PBS-ben, majd 0.5 ml PBS-ben vettük fel sejteket, mely propidium jodidot (50 ug/ml) és RNase A-t (200 ug/ml) tartalmazott. A sejteket 4°C -on egy éjszakán át festettük.

A méréseket FACSArray készüléken végeztük el, mely egy 96-well plate formátumú áramlási citometria bioanalizátor (Becton Dickinson). A DNS festéket 532 nm lézerrel gerjesztettük és a fénykibocsátást a sárga csatornatartományban mértük lineáris módban 585/42 nm 'bandpass' filterrel. A sejtklaszterek FSC-A/SSC-A (Area) és FSC-W/SSC-W (Width) 2D-histogramokat használva kapuzva. A fluoreszcencia intenzitás értékeket a Modfit LT 3.0 szoftverrel elemeztük (Verity Software House), automatikus egy ciklus diploidmodellel, autotörmelék kompenzációval (AutoDebris Compensation) illetve auto-aggregátum kompenzációval (AutoAggregate Compensation).

A mérésekben szereplő G1-G2 lineáris arány értékek 1.92 körül voltak, az R.C.S. (reduced chi-square, a measure of goodness of fit) értékek 5-nél kisebbek voltak. Minden minta triplikátumban készült minden mérés esetén, és 50.000 sejtet vizsgáltunk minden mintában.

3.10. QRT-PCR és szemi-kvantitatív PCR analízis

Az mRNS-ek, érett miR-126 és RNU38B kvantitálásához a reverz transzkripció a 'High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit' (Applied Biosystems) segítségével végeztük. A reverz transzkripcióhoz használt primereket a miR126 és RNU38B esetében az Applied Biosystems cégtől rendeltük.

Az mRNS-ek kvantitálásához FastStart SYBR Green Master Mix-et (Roche), forward és reverz primert használtunk $0.3\text{ }\mu\text{M}$ végkoncentrációban. A qPCR mérést ABI 7900 HT készüléken végeztük, a következő PCR programot használva: 95°C 10 perc, majd 40 cikluson

keresztül 95°C 15 másodperc, 60°C 30 másodperc, 72°C 45 másodperc. A HPRT1 gént használtuk referencia géneként.

A szemi-quantitatív PCR reakcióhoz a következő programot használtuk: 95°C 10 perc, majd 15 cikluson keresztül 95°C 15 másodperc és 60°C 60 másodperc. A PCR termékeket agaróz gélelektroforézissel választottuk szét és etídium bromidos festéssel tettük láthatóvá.

3.11. Western blot

A sejteket PBS mosás után 2 x SDS mintafelvívő pufferben lizáltuk. A fehérjéket 10 % SDS poliakrilamid gélen választottuk szét, majd nitrocellulóz membránra vittük át nedves blottolással. A membránokat 2.5 % sovány tejben blokkoltuk, majd inkubáltuk a humán primer antitestekkel: SLC7A5 (3157-1, 1:1000, Epitomics), PLK2 (Snk/H90, sc-25421, 1:100, Santa Cruz Biotechnology) and GAPDH (6C5, sc-32233, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology). A szekunder antitestekkel (1:10,000; anti-mouse or anti-rabbit; Amersham) való inkubálás után a fehérjéket a SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce) segítségével tettük láthatóvá.

3.12. SLC7A5 gén 3' UTR-jének klónozása és a luciferáz reporter assay

A luciferáz reporter assay-hez az SLC7A5 gén 3'UTR régiójából 331 bp-t amplifikáltunk PCR reakcióval - ez a régió tartalmazta miR-126 miRNS kötőhelyét. A reakcióhoz használt primerekhez XhoI és NotI restriktions helyeket kapcsolunk. A PCR reakció templátja a H69 SCLC sejtvonal cDNS-e volt. Az XhoI/NotI-emésztett PCR terméket (vad típusú 3'UTR) beklónoztuk egy XhoI/NotI emésztett psiCHECK2 dual luciferáz vektorba (Promega).

Az SLC7A5 gén 3' UTR régiójából másik két primerpár segítségével kideletáltuk a miR-126 miRNS kötőhelyét. Ezen két primerpárral végzett PCR reakció termékeit összekevertük, néhány perces Pfu polimeráz katalizálta reakcióval kettős szálúvá egészítettük ki, majd megemésztettük XhoI and NotI restriktions enzimekkel, és a 3'UTR fragmenst, ami már nem tartalmazta a miR-126 kötőhelyét, beklónoztuk az XhoI/NotI-emésztett psiCHECK2 vektorba. Mind a vad típusú, mind a deléciós mutáns SLC7A5 3'UTR fragmentek szekvenciáját a klónozás után szekvenálással ellenőriztük. A H69 SCLC sejteket kotranszfektáltuk 500 ng psiCHECK2 konstrukttal (vad típusú-UTR vagy deletált-UTR) és 50 nM pre-miR-126 vagy pre-miR-negatív kontroll molekulákkal. A Firefly és Renilla luciferáz

aktivitását 48 órával mértük a transzfekciót követően egy 'Dual-Glo Luciferase assay system' (Promega) segítségével a 'Perkin Elmer Victor3 V Multilabel Plate Reader' készüléken. A miR-126 target specificitását a Renilla luciferáz/ Firefly luciferáz lumineszcens szignál arány értékéből határoztuk meg.

3.13. Statisztikai analízis

A statisztikai analízishez a GraphPad Prism IV szoftvert használtuk. A p értékek számításához a 'paired' t tesztet alkalmaztuk. p érték < 0.05, szignifikáns különbség.

3.14. Immunhisztokémia

A formalin-fixált paraffinba ágyazott SCLC tumor mintákból 'Tissue microarray' készült. Ezek a tumor minták chromogranin-A/synaptophysin és thyroid-transcription factor-1 (TTF1) pozitív tumoroknak (>70%) bizonyultak a kísérleteinkben.

Hematoxylin-eosin festés és antigén feltárást követően az immunhisztokémiai jelöléshez SLC7A5 (1:300 dilution; Epitomics) monoklonális antitestet használtunk. A jelölés 1 órán át szobahőmérsékleten történt. Envision (biotin-free) peroxidáz-alapú detektáló kitet (Dako, Glostrup, Denmark) használtunk az egér/nyúl antitestekhez piros AEC vagy barna DAB szubsztrát kromogénnel (Vector Labs) és hematoxylin magfestéssel.

Ezen kívül kettős immunfluoreszcens festést is alkalmaztunk, ahol az SLC7A5 antitest egy tormaperoxidáz (HRP)-kapcsolt nyúl elleni IgG(Fab)₂ és tyramide-FITC-el zöld fluoreszcens jelként volt látható, a TTF1 antitest és a biotinált szekunder antitest kezelés (Dako) egy streptavidin-texas red festéssel piros fluoreszcencia jelként volt látható (Vector).

Az antitestek reaktivitását és specificitását (a pozitív sejtek százaléka) egy 3D-Histotech-Zeiss slide-scanner és Mirax-viewer szofter program (3D-Histotech, Budapest, Hungary) segítségével értékeltük.

4. Eredmények

4.1. Az SCLC sejtvonalak és normál tüdőszövet miRNS expressziós mintázatának meghatározása microarray módszerrel.

Egy 'LC Sciences miRNS microarray platform' segítségével, mely 319 érett miRNS-t tartalmazott, meghatároztuk az SCLC-re jellemző miRNS-ek expressziós mintázatát. Ebben a kísérletben 3 SCLC sejtvonal (HTB-184, HTB-172, és H69) és normál tüdőszövet miRNS expressziós mintázatát térképeztük fel. A normál tüdőszövet 6 RNS minta összekeverésével készült, melyeket sebészeti úton eltávolított tüdőszövetből izoláltunk.

MiRNS microarray módszerrel azonosítottunk 19 magas expressziós szintet mutató miRNS-t, melyeknek relatív expressziós változása legalább 10-szer magasabb volt az SCLC sejtvonalakban a normál tüdőszövethez viszonyítva. A miR-9 és miR-7 miRNS-ek relatív expressziós szintje 50-szer, míg a miR-183, miR-182, miR-206 és miR-375 miRNS-ek expressziós szintje 30-szor magasabb volt az SCLC sejtvonalakban a normál tüdőszövethez képest. Ezenkívül azonosítottunk 35 alacsonyan expresszálandó miRNS-t és egy nagy régiót, a 19q13.41-t, mely több mint 30 alacsonyan expresszálandó miRNS-t tartalmaz (miR-512-miR-373).

Megfigyeléseink azt mutatják, hogy számos eltérő expressziós szintet mutató miRNS klaszterekben rendeződve található meg a genomban, mint például a miR-17-92 klaszter, a miR-200b-429 klaszter és a miR-145/143 klaszter. Az egy klaszterben található miRNS-ek azonosan vagy magas, vagy alacsony szinten expresszálandók, mutatva azt, hogy azonos szabályozó egység tagjai. Továbbá megfigyeltük azt is, hogy a különböző kromoszómákon több kópiaszámban jelenlévő miRNS-ek, mint a miR-29b, miR-199a vagy a közeli kapcsolatban álló miRNS-ek, mint a miR-199a/b, miR-200a/b/c, miR-181- c/d, miR-106a-363 és miR-17-92 klaszterek gyakran koordináltan szabályozódnak.

4.2. A mikroRNS expressziós szintek validálása qRT-PCR technikával.

A microarray adatok alapján 21 szignifikánsan magas- vagy alacsony expressziós szintet mutató miRNS-t választottunk ki további validálásra, míg 41 miRNS-t a tumorbiológiában betöltött szerepük miatt választottunk ki további analízisre. qRT-PCR technikával vizsgáltuk a 62 miRNS expressziós szintjét a következő mintákban: 3 SCLC sejtvonalban (kevert RNS minta a H69, HTB-184 és HTB-172 sejtvonalakból), normál

tüdőszövetben (kevert RNS 6 mintából), formalin-fixált paraffinba ágyazott SCLC tumor mintákban (6 mintából izolált kevert RNS) formalin-fixált paraffinba ágyazott normál tüdőszövetben, mely a tumor környékéről származott (6 mintából izolált kevert RNS).

A 6 normál tüdőszövet mintából kevert RNS ugyanaz volt, mint amit a microarray kísérletnél használtunk.

A microarray adatoknak megfelelően sikerült igazolni 16 magas expressziós szintet mutató miRNS-t az összes SCLC mintában a normál mintákhoz képest. A miR-105, miR-301, és miR-17-5p miRNS-ek 40-szer magasabb expressziós szintet mutattak az SCLC sejtvonalakban a normál tüdőszövethez képest, míg a miR-17-5p mutatta a legmagasabb expressziós szintet (16.67-szer magasabb) a primer tumor mintákban.

qRT-PCR analízis igazolta 8 miRNS alacsony expresszió szintjét is az SCLC sejtvonalakban és primer tumor mintákban a normál mintákhoz képest. A miRNS-ek alacsony expressziós szintjét a primer tumor mintákban nehezebb volt kimutatni, mint a sejtvonalakban. Mindez a tumor mintákban maradó normál sejtekből adódhatott, ami csökkentheti számos miRNS esetében a tumor és normál szövet közötti különbségeket. Az átlag relatív expressziós szintbeli változás az SCLC sejtvonalak esetében 0.07-szeres, míg a primer SCLC tumor mintákban 0.23-szoros volt ugyanazon 8 miRNS esetében.

4.3. Néhány mikroRNS expressziós mintázata egyedi kissejtes tüdőrák sejtvonalakban és primer tumor mintákban.

7 alacsonyan és 8 magasan expresszálódó miRNS-t választottunk ki a következő qRT-PCR analízishez, melyeket 17 egyedi SCLC tumor mintán és 3 egyedi SCLC sejtvonalon vizsgáltunk.

A qRT-PCR egyöntetűen igazolta a miR-126 alacsony expressziós szintjét az összes vizsgált SCLC mintában. A miR-150, miR-223, miR-214 és miR-199a szintén alacsony szinten expresszálódott az összes SCLC sejtvonalban, míg a miR-222 expressziós szintje nem változott két SCLC sejtvonalban sem. A miR-150, miR-222 és miR-223 a legtöbb primer SCLC tumor mintában alacsony szinten volt jelen, míg a miR-29a, miR-214 és miR-199a expressziója variábilis volt.

Négy miRNS, a miR-301, miR-183, miR-106a, miR-105 mutatott magas szintű expressziót az összes SCLC sejtvonalban, míg a primer SCLC tumorokban ezek közül csak a miR-301 és miR-183 miRNS-ek expresszálódtak magasabban. A miR-106a, miR-25 és miR-

95 a primer SCLC tumorok nagy többségében magas expressziós szintet mutatott, míg a miR-105, miR-374 és miR-185 miRNS-ek expressziója variábilis volt.

Nem találtunk semmi bizonyítékot arra nézve, hogy a kísérleteinkben tanulmányozott miRNS-ek expressziós szintbeni változása a tumor elhelyezkedésével kapcsolatban lenne (tüdő vagy metasztatikus lokalizáció).

4.4. A génamplifikáció nem egy általános mechanizmus, mely az SCLC tumorokban számos mikroRNS magas szintű expressziójához vezetne.

Számos miRNS tumor-asszociált genomi régiókban helyezkedik el. Néhány alacsonyán expresszálódó miRNS olyan kromoszóma régióban található, melyeknél SCLC-ben gyakori a heterozigóta deléció. A magas expressziós szintet mutató miRNS-ek viszont általában nem fednek át olyan kromoszóma régiókkal, melyeknél gyakori az amplifikáció SCLC-ben. Kísérleteinkben ezért 5 magas expressziós szintet mutató miRNS (miR-17-92, miR-183/96, miR-182, miR-95 and miR-301) kópiaszám változását vizsgáltuk primer SCLC tumorokban és SCLC sejtvonalakban. Az génamplifikáció egyöntetűen kimutatható volt mind az 5 miRNS genom régióiban az SCLC sejtvonalak esetében. Az SCLC primer tumorokban csak a miR-183/96/182 genom régiója, a 7q32.2 régió volt jellemezhető amplifikációval. Annak ellenére, hogy a miR-301 a legmagasabban expresszálódó miRNS az SCLC tumorokban, csak egy mintában volt kimutatható az amplifikációja, míg egy másik mintában a delécióját figyeltük meg.. Nem detektáltunk kópiaszám változást a miR-95 és miR-17-92 klaszter esetében a primer SCLC tumor mintákban.

4.5. A miR-126 a sejtciklus G1 fázisának késleltetésével gátolja az SCLC sejtek proliferációját.

Az előző kísérleteinkben kimutattuk a miR-126 alacsony expressziós szintjét az összes SCLC mintában, így a kísérleteink következő fázisában az SCLC sejtek proliferációjának szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltuk. A H69 sejteket tranziensen transzfektáltuk a miR-126 prekursor molekulával (pre-miR-126) és egy negatív kontroll miRNS-el (NegmiR) Lipofectamine 2000 transzfekciós reagens segítségével. Az élő sejtek számának változását a transzfekciót követő 96 óráig követtük nyomon sejtszámolással, tripánkékes festéssel.

Ahogy azt vártuk is, a pre-miR-126 transzfekciója a H69 sejtekben megnövelte a miR-126 expresszióját, a nem transzfektált és NegmiR kontroll transzfektált sejtekhez

viszonyítva. A miR-126 expressziójának emelése a H69 sejtek proliferációját szignifikánsan csökkentette a transzfekciót követő 72. órától.

A miR-126-nak az SCLC sejtek proliferációjára kifejtett hatását egy másik SCLC sejtvonalon, a HTB-172 sejtvonalon is alátámasztottuk. A miR-126 expressziójának emelése gátolta a HTB-172 sejtek proliferációját is, a H69 sejtekhez hasonlóan.

A sejtciklus analízis a transzfekciót követő 72. és 96. órában kimutatta, hogy a miR-126 transzfektált H69 sejtek magas százalékban vannak jelen a sejtciklus G1 fázisában, amit a G2/M fázisban jelenlévő sejtek alacsony százaléka kísér a negatív kontroll mintához viszonyítva. Mindezen eredmények azt mutatják, hogy a miR-126 expressziójának megemelése késlelteti a H69 sejtek kilépését a sejtciklus G1 fázisából.

4.6. A miR-126 expressziójának megemelése gátolja az SLC7A5 gén expresszióját RNS és fehérje szinten.

A miR-126 lehetséges célgénjeinek azonosítására, melyek szerepet játszhatnak az SCLC sejtek proliferációjának szabályozásában, először *in silico* analízist végeztünk miRNS target predikciós adatbázisok, a TargetScan és PicTar segítségével. Hat lehetséges célgént találtunk, melyek mindkét adatbázisban szerepel (CRK, PLK2, SLC7A5, PTPN9, FBXO33 and RGS3), viszont ezek közül csak a CRK és PLK2 géneket találták valódi miR-126 célgénnek funkcionális kísérletekben. Sem a validált, sem a prediktált gének nem mutatnak magas expressziós szintet SCLC-ben, kivéve az SLC7A5 gént. Az SLC7A5 protein magas szintű expressziója SCLC-ben korrelációt mutat az előzőekben leírt miR-126 alacsony expressziójával. Ezért az SLC7A5 gént választottuk ki a következő vizsgálatainkhoz.

Megvizsgáltuk, hogy a miR-126 expressziós szintjének megemelése hatással van-e az SLC7A5 és PLK2 gének expressziójára. A qRT-PCR analízis az mutatta, hogy a miR-126 a H69 sejtekben az SLC7A5 mRNS szintjét több mint 50%-al csökkentette, míg a PLK2 mRNS expressziójára csekély hatással volt. A western blot analízis azt mutatta, hogy a miR-126 expressziójának megemelése csökkentette az SLC7A5 gén expresszióját fehérje szinten is, viszont a PLK2 fehérje szintje szignifikánsan nem változott.

4.7. Az SLC7A5 gén gátlása RNS interferenciával késlelteti az SCLC sejteknek a sejtciklus G1 fázisából való kilépését.

Ahhoz hogy pontosan megértsük az SLC7A5 gén SCLC sejtek sejtciklusára kifejtett hatását, RNS interferencia alkalmazásával gátoltuk az SLC7A5 gén termelését a H69 sejtekben, majd sejtciklus analízist végeztük a transzfekeciót követő 72. és 96. órában.

Az SLC7A5 specifikus siRNS transzfekeciója a H69 sejtekbe szignifikánsan csökkentette az SLC7A5 gén expresszióját a negatív kontroll siRNS-hez viszonyítva. Hasonlóan a miR-126 hatásához, az SLC7A5 gén expressziójának gátlása megnövelte a transzfekektált sejtek százalékát a sejtciklus G1 fázisában, mindezt a sejtek csökkent százaléka kíséri a sejtciklus G2/M fázisban a negatív kontroll siRNS-hez képest. Ezzel ellentétben, a PLK2 gén expressziójának specifikus gátlása nem volt hatással a H69 sejtek sejtciklus eloszlására.

Ezen eredmények alátámasztják azt a hipotézist, hogy a miR-126 SCLC sejtek proliferációjára és sejtciklusára gyakorolt hatását részben az SLC7A5 gén negatív szabályozásán keresztül éri el.

4.8. Az SLC7A5 valódi célgénje a miR-126-nak.

Annak bizonyítására, hogy az SLC7A5 gén direkt célgénje a miR-126 miRNS-nek, létrehoztunk egy luciferáz reporter vektort, ami tartalmazott az SLC7A5 gén 3'UTR-jéből 331 bázispár részt a lehetséges miR-126 kötőhellyel (vad típus), valamint egy kontroll luciferáz reporter vektort, melynél a miR-126 lehetséges kötőhelyét eltávolítottuk az SLC7A5 gén 3' UTR-jéből (deletált UTR). A H69 sejteket tranziensen transzfekektáltuk a vad típusú és deletált UTR-t tartalmazó luciferáz vektorral és a pre-miR-126 prekursor molekulával. A vad típusú UTR és pre-miR-126 kotranszfekeciója szignifikánsan csökkentette a riporter aktivitását a kontrollhoz képest, míg a miR-126 kötőhely deletálása az SLC7A5 gén 3'UTR-jéből megszüntette a miR-126 ezen hatását.

Ezen adatok azt mutatják, hogy az SLC7A5 gén direkt, funkcionális target génje a miR-126 miRNS-nek a H69- SCLC sejtekben.

4.9. Az SLC7A5 gén és miR-126 expressziós szintje ellentétesen viszonyul egymáshoz a primer SCLC tumorokban.

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogyan viszonyul egymáshoz a miR-126 és SLC7A5 gén expressziós szintje 12 primer SCLC tumor mintában, immunhisztokémia segítségével, SLC7A5 specifikus antitesttel. Az SLC7A5 gén expressziója normál tüdőszövetben nem volt kimutatható, míg az SCLC tumorok magas SLC7A5 fehérje expressziót mutattak.

Dupla immunfluoreszcens festéssel a tumor sejtek többsége TTF1 magfestést (tipikus SCLC – re jellemző fehérje) mutatott, SLC7A5 koexpresszióval. Az immunhisztokémiával analizált tumor minták ugyanazok voltak, mint amelyeken az előzőekben meghatároztuk az aberráns miR-126 expressziót. Mivel mind a 12 vizsgált tumor minta magas szinten expresszálta az SLC7A5 gént és alacsony szinten a miR-126 miRNS-t, így a primer tumorokban igazolódott az a tény, hogy a miRNS és a direkt célgénjének expressziós szintje ellentétesen viszonyul egymáshoz.

5. Megbeszélés

5.1. A különbözőképpen expresszáldó mikroRNS-ek a kissejtes tüdőrákban, és biológiai funkciójuk a normál és tumoros sejtekben.

Kísérleteinkben microarray és qRT-PCR technikák kombinálásával sikerült meghatározni az SCLC-re jellemző miRNS-ek expressziós mintázatát. MiRNS microarray technikával azonosítottunk 19 magasan expresszáldó, és több mint 35 alacsonyan szinten expresszáldó miRNS-t az SCLC sejtvonalakban a normál tüdőszövethez viszonyítva. Ezekből 7 alacsony és 8 magas szinten expresszáldó miRNS-t választottunk ki a további qRT-PCR analízishez, 17 egyedi SCLC tumor mintán és 3 SCLC sejtvonalon. A qRT-PCR egyöntetűen igazolta a miR-126 alacsony, míg a miR-301 és a miR-183 magas expresszióját az összes SCLC mintában, sejtvonalakban és primer tumorokban egyaránt.

Microarray technikával sikerült azonosítani olyan miRNS-eket, mint a miR-374 és miR-506, melyeket még nem hoztak kapcsolatba rákos folyamatokkal, illetve számos miRNS-t, melynek funkciója a tüdőrákban nem ismert, mint például a magas szinten expresszáldó miR-429, miR-128a/b és miR-130b, valamint az alacsony szinten expresszáldó miR-135b, miR-511, miR-190, miR-296, miR-33, miR-502, és miR-325. Ezen miRNS-ek lehetséges szerepét az egyes ráktípusokban már leírták, viszont az aktuális tumor típustól függően szerepük elég variábilis.

Számos bizonyíték támasztja alá, hogy a magas szinten expresszáldó miRNS-ek részt vesznek a normál fejlődésben, differenciációban és a rákos folyamatokban, viszont elég keveset tudunk arról, hogy mi lehet ezeknek a miRNS-eknek a pontos funkciója a tüdőrák kialakulásában. Kimutatták, hogy a miR-182/miR-183/miR-96 miRNS klaszter tagjai számos tumorban magas szinten expresszáldódnak. A miR-183 magas szinten expresszáldódik hepatocelluláris karcinómában és gátolja az apoptózist, a PDCD4 gén gátlásán keresztül. A miR-182 primer tüdőtumorkban magas szinten expresszáldódik és a tumor növekedését szabályozza. Ez a miRNS melanómában is magas szinten expresszáldódik és elősegíti a melanómák metasztázisát. Viszonylag keveset tudunk a miR-301 funkciójáról; fontos onkogén, mely részt vesz az emlőrák proliferációjában és inváziójában; a miR-95 miRNS-el együtt a pankreászrákban is magas szinten expresszáldódik.

Az alacsony expressziós szintet mutató miR-126 miRNS-nek valószínűleg komplex szerepe van a sejtproliferáció szabályozásában. Számos tumor típusban anti-proliferatív hatással bír, mint például az SCLC-ben, NSCLC-ben és a gyomorrákban, a PI3K/AKT szignál útvonal különböző tagjainak szabályozásán keresztül, valamint az emlőrákban az IRS1 célgénen keresztül. A miR-126 szabályozó szerepet tölt be az erek fejlődésében, az endotél sejtekben a SPRED1 és PIK3R2 gének gátlásán keresztül, valamint részt vesz a metasztatikus folyamatokban is.

Mások eredményei és a mi megfigyeléseink is azt mutatják, hogy a különböző kromoszómákon több kópiaszámban jelenlevő miRNS-ek, vagy a közeli kapcsolatban álló miRNS-ek gyakran koordináltan szabályozódnak, mutatva azt, hogy az aberráns transzkripcionális szabályozás fontos szerepet játszik számos miRNS magas- vagy alacsony expressziós szintjének kialakulásában az SCLC-ben.

A kromoszomális aberráció SCLC-ben is gyakori jelenség. Néhány alacsonyan expresszálódó miRNS olyan kromoszóma régióban található, melyeknél SCLC-ben gyakori a heterozigóta deléció. A magas expressziós szintet mutató miRNS-ek viszont általában nem fednek át olyan kromoszóma régiókkal, melyeknél gyakori az amplifikáció SCLC-ben; kivételt képez a miR-200b/200a/429 klaszter, mely az 1p36.33 régióban helyezkedik el, a TNFRSF4 anti-apoptotikus gén közelében, mely gyakran amplifikálódik SCLC-ben. Kísérleteinkben ezért 5 magas expressziós szintet mutató miRNS (miR-17-92, miR-183/96, miR-182, miR-95 és miR-301) kópiaszám változását vizsgáltuk primer SCLC tumorokban. Azonosítottunk egy új SCLC-ben amplifikálódó régiót, a 7q32.2 régiót, mely tartalmazza a miR-183/96/182 klasztert. Az amplifikáció a négy tumor mintából háromban kimutatható volt. A tanulmányozott 3 másik genom régiónál nem volt gyakori az amplifikáció vagy egyáltalán nem mutatott amplifikációt SCLC-ben (miR-17-92, miR-95, and miR-301).

Néhány miRNS hasonló expressziós mintázatot mutat SCLC-ben és NSCLC-ben: a miR-182, miR-375, miR-210, miR-200b és miR-301 magas szinten, míg a miR-143, miR-145 és miR-126 alacsony szinten expresszálódnak mindkét tüdőtumorban. Számos más miRNS viszont ellentétes expressziós mintázatot mutat a két tumor típusban. Például a miR-98, miR-17-5p és miR-106a magas szinten expresszálódik az SCLC sejtekben, NSCLC-ben viszont nem, a normál HBEC (human bronchial epithelial cells) sejtekhez viszonyítva. Hasonlóképpen, a miR-27a és miR-29a/b/c alacsony expressziós szintet mutat SCLC

sejtekben, NSCLC sejtekben viszont nem, a normál HBEC sejtekhez viszonyítva. Ez a különböző expressziós mintázat a két tumortípus között, megteremtheti a miRNS expressziós profil diagnosztikai alkalmazását az SCLC és NSCLC elkülönítésére. A miR-21 onkogén miRNS számos tumorban magas szinten expresszálódik és a tüdő adenokarcinóma betegek köpet mintáiban is kimutatható, ezért biomarkerként való felhasználhatósága a tüdőrák korai detektálására is felmerült. Mások megfigyelései és a mi kísérleteink viszont azt mutatják, hogy a miR-21 nem mutat magas expressziós szintet az SCLC-ben, vagyis alkalmas lehet az NSCLC differenciált diagnózisára.

5.2. A miR-126 gátolja a kissejtes tüdőrák sejtek proliferációját az SLC7A5 génen keresztül.

A továbbiakban az alacsony szinten expresszálódó miR-126 miRNS szerepét vizsgáltuk a SCLC sejtekben. Számos tanulmány foglalkozik a miR-126 funkciójával más tumor típusokban, viszont kísérleteink elején még nagyon keveset lehetett tudni ennek a miRNS-nek a funkciójáról az egyes tumorokban.

A miR-126 tumor gátló és pro-apoptotikus hatással bír számos tumorsejtben. Az NSCLC sejtekben gátolja a sejtek proliferációját *in vitro* és *in vivo*, a VEGF és EGFL7 géneken keresztül; elősegíti az apoptózist, gátolja a tumorsejtek adhézióját, migrációját és invázióját a Crk gén funkciójának szabályozásával. Hasonlóan az NSCLC sejtekhez, a miR-126 tumor gátló funkcióval rendelkezik a gyomorrákban; a sejtek proliferációját és metasztatikus kapacitását befolyásolja, valamint emlőrákban kimutatták, hogy gátolja a metasztázist is.

A miR-126 miRNS magas szintű expresszióját is leírták egyes ráktípusokban, mint például akut myeloid leukémiában, ahol anti-apoptotikus hatással bír. Tehát a miR-126 nem feltétlenül csak egy anti-proliferatív miRNS; úgy tűnik sejttípustól és sejt környezettől függően számos funkciót betölthet. Mivel SCLC-ben alacsony szinten expresszálódik, feltételeztük hogy anti-proliferatív hatása lesz ebben a tumortípusban, amit bizonyítottunk is proliferációs és sejtciklus analízisekkel, a miR-126 expressziós szintjének megemelésével a H69 és HTB-172 sejtekben.

A miR-126 bonyolult funkcióját alátámasztják azok a megfigyelések is, hogy nem az összes validált miR-126 target génre van hatással a miR-126 minden egyes sejt típusban. Például az SCLC sejtekben a miR-126 expressziós szintjének megemelése nem befolyásolja a PLK2 gén expresszióját, annak ellenére hogy a PLK2 bizonyítottan target génje a miR-126-nak akut

myeloid leukémiában, ahol a sejtciklus és DNS károsodás szabályozásában játszhat szerepet. Hasonló megfigyelést tapasztaltak a TOM1 génnel kapcsolatosan is, mely a légúti epithél sejtekben célgénje a miR-126-nak, viszont MCF7 sejtekben nem volt kimutatható a miR-126 és TOM1 gén kapcsolata. Egy másik esetben a SPRED1 a HUVEC sejtekben célgénje a miR-126-nak, míg az akut myeloid leukémia sejtekben nem.

Ma még nem tisztázott, hogy miért tapasztaljuk azt, hogy egyes mRNS-ek célgénjei a miR126-nak egy adott kísérleti rendszerben, míg más kísérleti modellrendszerben nem. A célgén szelektivitás valószínűleg hozzájárul a miR-126 különböző funkcióihoz az egyes tumorokban.

Azonosítottunk egy új miR-126 célgént a kissejtes tüdőrákban, az SLC7A5 gént. Sem a validált, sem a prediktált miR-126 célgénnek nem mutatnak magas szintű expressziót az SCLC-ben, kivéve az SLC7A5 (LAT1) gént. Az SLC7A5 egy L-típusú aminosav transzporter, mely a neutrális aminosavak szállításában vesz részt a plazmamembránon keresztül. Magas szinten expresszálódik a különböző ráktípusokban, így az SCLC-ben is, és szerepet játszik a tumor sejtek növekedésében és túlélésében. Az SLC7A5 gén expressziós szintje összefüggésbe hozható a tumor progressziójával és aggresszív fenotípusával; például NSCLC betegekben prognosztikai faktorként is használható.

Kísérleteinkben kimutattuk, hogy az SCLC sejtekben, más tumorokhoz hasonlóan, az SLC7A5 expressziójának gátlása anti-proliferatív hatással bír. Mind az SLC7A5 expressziójának gátlása, mind a miR-126 expressziójának növelése késleltette az SCLC sejtek kilépését a sejtciklus G1 fázisából. Mindez azt bizonyítja, hogy a miR-126 sejtciklusra kifejtett hatása részben az SLC7A5 fehérje expressziójának gátlásán keresztül megy végbe. Tehát az SLC7A5 magas expressziós szintjének fenntartásához részben a csökkent miR-126 expresszió is hozzájárulhat az SCLC sejtekben, gondoskodva arról, hogy az esszenciális aminosavak a gyorsan proliferáló tumor sejtekbe szállítódjanak.

A miR-126 az SCLC sejtek sejtciklusának egy közvetlenebb szabályozásában is részt vesz. Számos megfigyelés mutatja, hogy az SLC7A5 hatása a sejtproliferációra tápanyagfüggő növekedési útvonalak aktiválásán keresztül is megvalósulhat, mint például a PI3K/Akt/mTOR útvonalon keresztül, melynek szabályozásában a miR-126 is fontos szerepet játszik. A PI3K család leggyakrabban tanulmányozott osztálya a PI3K IA, mely egy szabályozó [p85 (α, β, γ)] és egy katalitikus alegységből [p110(α, β, δ)] áll. Ezen alegységek

közül a p85 β célgénje a miR-126 –nak emlő-és gyomorrákban, valamint endothél sejtekben is.

Az SCLC a tüdőráktípusok 20%-át teszi ki, nagyon agresszív és korán metasztatizáló tumor típus. Számos kísérlet támasztja alá azt a tényt, hogy a tüdő tumorokban magas szinten expresszálódnak azok a szignálútvonalak, melyek a sejtek proliferációjában és a túlélésben vesznek részt, mint a PI3K/Akt/mTOR útvonal. Ezen szignálútvonalak aberráns aktivációja a tumorok növekedéséhez és progressziójához vezethet.

Az aktivált PI3K útvonal segíti az SCLC sejtek növekedését, metasztázisát és a sejtek rezisztenciáját a különböző terápiákkal szemben. Az SCLC tumorokban kimutatható a foszforilált Akt, valamint az mTOR útvonal effektorjainak, mint az S6K1 és S6K2 magas expressziós szintje, melyek hatással vannak a kemorezisztencia kialakulására és az SCLC tumorok túlélését segítik elő. Az SCLC sejteket egy gazdag extracelluláris mátrix környezet veszi körül, mely képes aktiválni a PI3K/Akt útvonalat, a β 1-integrin aktiválódásán keresztül. A PI3K aktivitásának blokkolása vagy az mTOR útvonal gátlása elősegítheti az apoptózist, illetve csökkentheti az SCLC sejtek növekedési folyamatait. Mindez azt mutatja, hogy az mTOR útvonal blokkolása ígéretes módszer lehet az SCLC kezelésében. Az Akt aktiválódhat az EGFR génen keresztül is, ami egy kapcsolódási pontot adhat az mTOR és EGFR szignálútvonalak között. Mindkét útvonal aktív az SCLC-ben, ezért a kettő együttes gátlása egy új stratégia lehetőségét teremtheti meg az SCLC kezelésében.

Kísérleteinkben tehát kimutattuk, hogy a miR-126 miRNS az SCLC sejtek proliferációjának egy fontos negatív regulátora, részben a PI3K/Akt/mTOR szignál útvonalra gyakorolt hatása révén, melyet olyan célgéneken keresztül fejthet ki, mint az SLC7A5. A miR-126 eltávolítása ebből a szabályozó rendszerből növelheti a pozitív visszacsatolást az SLC7A5 és mTOR között, és szignifikánsan hozzájárulhat a tumor sejtek proliferációs potenciáljához. A miR-126 a PIK3R2/p85 β fehérjén keresztül részt vesz a PI3K/Akt útvonal szabályozásában is, pozitív regulátora az angiogenezisnek a normál endothél sejtekben, és valószínű fontos szerepet játszik az immunrendszer szabályozásában is. További vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy megértsük a miR-126 komplex szerepét az SCLC tumorok növekedésében, túlélésében és progressziójában in vivo, és megtudjuk azt is, hogyan lehetne a miR-126 miRNS-t, mint lehetséges anti-tumor ágenszt felhasználni.

6. Összefoglalás

A miRNS-ek rövid, nemkódoló RNS molekulák, melyek a génexpresszió szabályozásában vesznek részt azáltal, hogy a target mRNS-hez kapcsolódva gátolják azok translációját, illetve bizonyos esetekben az mRNS degradációját váltják ki. A tumorbiológiában betöltött szerepüket alátámasztja az a tény is, hogy az ismert miRNS-ek 50%-a olyan genomi régiókban található, melyek tumorokban amplifikálódnak vagy deletálódnak. Az általunk vizsgált tumortípus az SCLC, ami egy neuroendokrin eredetű, gyorsan metasztatizáló tumor.

Kísérleteinkben microarray és qRT-PCR technikák kombinálásával sikerült meghatározni az SCLC-re jellemző miRNS-ek expressziós mintázatát.

MiRNS microarray technikával azonosítottunk 19 magasan expresszálódó miRNS-t (legalább 10-szer magasabb) az SCLC sejtvonalakban a normál tüdőszövethez viszonyítva. Sikerült azonosítani olyan miRNS-et, mint a miR-374 és miR-506, melyeket még nem hoztak kapcsolatba rákos folyamatokkal illetve olyanokat, melyek lehetséges funkcióját már leírták egyes ráktípusokban. Ezenkívül azonosítottunk 35 alacsonyán expresszálódó miRNS-t, és a 19q13.41 régiót, mely több mint 30 alacsonyán expresszálódó miRNS-t tartalmaz (miR-512-miR-373).

A továbbiakban qRT-PCR technikával vizsgáltuk a miRNS-ek expressziós szintjét SCLC sejtvonalakból származó RNS mintában, és kisszámú, mikrodisszekált primer SCLC tumorból származó RNS mintában. A microarray adatoknak megfelelően sikerült igazolni 16 magas és 8 alacsony expressziós szintet mutató miRNS-t az összes SCLC mintában a normál mintákhoz képest. A miR-17-5p mutatta a legmagasabb expressziós szintet a primer SCLC tumorokban (15-ször magasabb), míg az SCLC sejtekben 30-szor magasabb volt a miR-17-5p expressziója a normál tüdőszövethez képest.

A továbbiakban már nagyobb számú primer SCLC tumorban és SCLC sejtvonalakban vizsgáltuk a különbözően expresszálódó miRNS-eket. A qRT-PCR egyöntetűen igazolta a miR-126 alacsony, míg a miR-301 és a miR-183 magas expresszióját az összes SCLC mintában, sejtvonalakban és primer tumorokban egyaránt.

Néhány alacsonyán expresszálódó miRNS olyan kromoszóma régióban található, melyeknél SCLC-ben gyakori a heterozigóta deléció. A magas expressziós szintet mutató miRNS-ek viszont általában nem fednek át olyan kromoszóma régiókkal, melyeknél gyakori az amplifikáció SCLC-ben. Kísérleteinkben ezért 5 magas expressziós szintet mutató miRNS

kópiaszám változását vizsgáltuk primer SCLC tumorokban, és azonosítottunk egy új SCLC-ben amplifikálódó régiót, a 7q32.2-t, mely tartalmazza a miR-183/96/182 klasztert.

További kísérleteinkben az alacsony szinten expresszáldó miR-126 miRNS szerepét vizsgáltuk SCLC sejtekben. Kimutattuk hogy a miR-126 az SCLC sejtek proliferációját gátolja, a sejtciklus G1 fázisból S fázisba való átmenetét lassítva. Azonosítottunk egy új miR-126 célgént a kissejtes tüdőrákban, az SLC7A5 proteint.

Az SLC7A5 egy L-típusú aminosav transzporter, amely magasan expresszáldik a különböző ráktípusokban, így az SCLC-ben is, és szerepet játszik a tumor sejtek növekedésében és túlélésében. Az SCLC sejtekben, más tumorokhoz hasonlóan, az SLC7A5 expressziójának gátlása anti-proliferatív hatással bírt. Mind az SLC7A5 expressziójának gátlása, mind a miR-126 expressziójának növelése késleltette az SCLC sejtek kilépését a sejtciklus G1 fázisából, azt mutatva, hogy a miR-126 sejtciklusra kifejtett hatása részben az SLC7A5 fehérje expressziójának gátlásán keresztül megy végbe. Az SLC7A5 aminosav transzporter gondoskodik az esszenciális aminosavak felvételéről, melyek az mTOR szignál útvonala aktiválásán keresztül szignál molekulaként szolgálnak a tumor sejtek proliferációjához. A miR-126 több fehérjén keresztül vesz részt a PI3K/Akt útvonala szabályozásában, mely az SCLC tumorok nagy részében aberránsan aktív. A miR-126 miRNS tehát az SCLC sejtek növekedésének egy fontos negatív regulátora, részben a PI3K/Akt/mTOR szignál útvonala gyakorolt hatása révén, melyet olyan target géneken keresztül fejthet ki, mint az SLC7A5.

Iktatószám: DEENKÉTK /149/2011.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Miko Edit

Neptun kód: QXTP9E

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Miko, E.**, Margitai, Z., Czimmerer, Z., Várkonyi, I., Dezső, B., Lányi, Á., Bacsó, Z., Scholtz, B.: miR-126 inhibits proliferation of small cell lung cancer cells by targeting SLC7A5. *FEBS Lett.* 585 (8), 1191-1196, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.03.039>
IF:3.541 (2009)
2. **Miko, E.**, Czimmerer, Z., Csánky, E., Boros, G., Buslig, J., Dezső, B., Scholtz, B.: Differentially expressed microRNAs in small cell lung cancer. *Exp. Lung Res.* 35 (8), 646-664, 2009.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3109/01902140902822312>
IF:1.177

További Közlemények

3. Varga, I., Hutóczki, G., Petrás, M., Scholtz, B., **Miko, E.**, Kenyeres, A., Tóth, J., Zahuczky, G., Bognár, L., Hanzély, Z., Klekner, Á.: Expression of Invasion-Related Extracellular Matrix Molecules in Human Glioblastoma Versus Intracerebral Lung Adenocarcinoma Metastasis. *Cen. Eur. Neurosurg.* 71 (04), 173-180, 2010.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0030-1249698>
4. Balogh, A., Paragh jr., G., Juhász, A., Köbling, T., Töröcsik, D., **Miko, E.**, Varga, V., Emri, G., Horkay, I., Scholtz, B., Remenyik, É.: Reference genes for quantitative real time PCR in UVB irradiated keratinocytes.

J. Photochem. Photobiol. B, Biol. 93 (3), 133-139, 2008.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.07.010>
IF:1.838

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2011.06.14

