Szív, tumor és idegsejtek fókuszált miRNS és mRNS expressziós analízise

Ph.D értekezés tézisfüzet

Faragó Nóra

Témavezető: Dr. Puskás László

MTA Szegedi Biológiai Központ, Funkcionális Genomika Laboratórium

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biológia Doktori Iskola

2012

1. BEVEZETÉS

A mikro RNS-ek olyan 17-25 nukleotid hosszúságú molekulák, amelyek nem kódolnak fehérjét, de mRNS kölcsönhatásuk révén hatással vannak a sejtek működésére. Több alapvető sejtélettani folyamatban meghatározó szerepet játszanak, mint például a sejtproliferáció, differenciáció, apoptózis szabályozás. Expressziójuk különböző kórfolyamatok során megváltozhat. Máig számos tumortípus esetében írtak le jellemző miRNS expressziós mintázatot, amely bizonytalan diagnózis esetén jelentősen megkönnyítheti a daganat osztályozását, illetve a betegség kimenetelének előrejelzését. Ezenkívül szakirodalmi adatok igazolják azt is, hogy a miRNS-ek szabályozó szerepet töltenek be a különböző citotoxikus anyagokkal szembeni szenzitivitás/rezisztencia kialakításában. Daganatokban az ép szövethez képest változást mutató expressziójú miRNS-ek a klasszikus onkogén-tumorszupresszor vonal alapján osztályozhatók, azaz a tumorszövetben fokozott expressziót mutató miR-ek onkogén (onkomiR), míg a represszáltak tumorszupresszor tulajdonságúak. Mivel az *in silico* becslések alapján a miRNS-ek egyszerre akár több száz protoonkogén és tumorszupresszor tulajdonságú célmolekulát is szabályozhatnak, így daganatképzésben betöltött szerepük tisztázásához elengedhetetlen célpontjaik és azok biológiai funkciójának azonosítása is.

A többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFA) több élettani funkciót töltenek be az emlős szervezetben. Jelentős hatást gyakorolnak a génexpresszióra, szabályozva a négy transzkripciós faktor családot, továbbá fontos szerepet játszanak gyulladáscsökkentő és antiproliferatív metabolitok generációjában, ezzel modulálva az immunválaszt. A többszörösen telítetlen zsírsavak közül a legjelentősebbek az EPA, a DHA, a DPA és a GLA, melyek élettani hatása többirányú. Közvetlenül hatnak a zsíranyagcserére, részt vesznek a sejtmembránok felépítésében, hormonszerű hatást fejtenek ki, valamint kardioprotektív hatásúak. Bár a többszörösen telítetlen zsírsavakat évek óta alkalmazzák kiegészítő terápiaként különböző gyulladásos, valamint daganatos betegségek esetén, ennek ellenére még mindig nem teljesen ismertek azok a molekuláris mechanizmusok, melyek a pozitív hatás kiváltásában szerepet játszanak.

2. CÉLKITŰZÉS

Munkánk célja olyan miRNS molekulák azonosítása volt, amelyek szerepet játszanak az apoptózis folyamatában, különböző citotoxikus anyagokkal szembeni szenzitivitás/rezisztencia kialakításában, valamint néhány speciális funkciót betöltő idegsejt működésében. Ehhez első lépésben olyan genomikai módszerek optimalizálását tűztük ki célul, amelyek segítségével fibrózus szövetekből is nagy mennyiségű és tiszta miRNS nyerhető ki. Ugyancsak új módszerek kidolgozására volt szükség az „egy sejt" génexpressziós profil meghatározásához is, különös tekintettel a sejtekben található mRNS és miRNS molekulák számának meghatározására.

A vizsgálatokat ezek alapján 4 csoportra osztottuk:

1) Fibrózus szövetekre is alkalmazható miRNS izoláló protokoll fejlesztése

Egyre több olyan kit kapható, amelyek a hagyományos szerves oldószerekkel történő extrahálást kombinálva a szilika-membrán alapú oszlopos technikával alkalmasak tiszta miRNS izolására. Bár ezek a kitek a legtöbb szövettípus esetében kitűnően működnek, egyik sem alkalmas olyan fibrózus szövetekből történő miRNS izolálásra, mint például a szív vagy a tüdőszövet. Célunk elsődlegesen egy olyan miRNS izoláló módszer kidolgozása volt, amely a lehető leggyorsabban, megbízható minőségű és viszonylag nagy mennyiségű mintát képes biztosítani az expressziós vizsgálatokhoz.

2) Többszörösen telítetlen zsírsavakkal kezelt glioblasztóma sejtek miRNS és mRNS expressziós vizsgálata

Annak ellenére, hogy mind *in vitro* kísérletekben, mind klinikai vizsgálatokban sikeresen alkalmaztak többszörösen telítetlen zsírsavakat glioblasztóma kezelésére, még mindig nagyon kevés információ áll rendelkezésre ezen anyagok miRNS és mRNS expresszióra gyakorolt hatásairól. Célunk azon miRNS és az ezek szabályozása alatt álló apoptotikus gének vizsgálata volt, amelyek PUFA kezelés hatására változást mutatnak és a későbbiekben potenciális támadáspontok lehetnek glioblasztóma sejtekben.

3) Többszörösen telítetlen zsírsavakkal etetett patkányokból izolált szív és májszövet miRNS és mRNS exressziós vizsgálata

Számos klinikai vizsgálat igazolta, hogy a PUFA-k jótékony hatást fejtenek kardiovaszkuláris, gyulladásos, illetve daganatos megbetegedések esetén is. Célunk azon génexpressziós változások és biokémiai útvonalak azonosítása volt, amelyek a PUFA kezeléssel összefüggésbe hozhatók. Ehhez 2 héten át, többszörösen telítetlen zsírsavakkal kiegészített étrenden tartott patkányokat használtunk és HTS módszerekkel vizsgáltuk a diéta hatására a szívben és a májban bekövetkező génexpressziós változásokat.

4) Idegsejtek karakterizálása miRNS és mRNS mintázat alapján

Az agykéregben elhelyezkedő gátló interneuronok molekuláris jellemzőiről a mai napig rendkívül kevés információ áll rendelkezésre. Ezek közül is kiemelkedő jelentőségű lehetne a központi szabályozó szerepet betöltő neurogliaform sejtek molekuláris karakterizálása, mivel ez számos klinikailag is releváns folyamat (depresszió, alkoholizmus, epilepszia) megértését segítené. Célunk első lépésben olyan módszerek optimalizálása és validálása volt, amelyek alkalmasak egyetlen sejt molekuláris vizsgálatára. Ezt követően olyan molekuláris markerek azonosítását tűztük ki célul, amelyek segítik a neurogliaform sejtek többi interneurontól való elkülönítését, illetve amelyek kulcsfontosságúak lehetnek ezen speciális sejttípus működése során.

3. MÓDSZEREK

Sejtek tenyésztése és kezelése

Vizsgálatainkhoz három humán glioblasztóma sejtvonalat használtunk (U373, GBM2, GBM5). Ezeket 37 °C-on, 5% CO2 és 100% relatív páratartalom mellett penicillinnel, streptomycinnel és 10% FCS-sel kiegészített DMEM és RPMI tápoldatban tenyésztettük. A tumorsejteket 24 órán keresztül kezeltük többszörösen telítetlen zsírsavak (AA, DHA, GLA) különböző koncentrációival (50 μM, 75 μM, 100, 150 μM). Pozitív kontrollként temozolomidot használtunk (50, 100 μM), ami klinikai gyakorlatban a legszélesebb körben használt citosztatikum glioblasztóma kezelésére.

Holografikus mikroszkóp

A tumorsejtek túlélését a kezelések után 24 órával HoloMonitor™ M3 holografikus mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A HoloMonitor ötvözi a hagyományos fáziskontraszt mikroszópos technikát a flow citometria előnyeivel. A készülék képes elkülöníteni a sejteket alakujuk és méretük szerint, illetve meghatározható vele az élő és halott sejtek aránya. Alkalmazása során valós-idejű információkat nyerhetünk a sejtek számáról, proliferációs és életképességéről, illetve morfológiai tulajdonságaikról, mint például alak, méret, denzitás.

miRNS izoláló protokoll fejlesztése szívszövetre

Az általunk optimalizált módszer alapja a miRNS izolálásra széles körben használt High Pure miRNA Isolation Kit (Roche). A standard protokoll hátránya, hogy fibrózus szövetek esetében egyáltalán nem alkalmazható, így ebbe újabb lépéseket beiktatva tettük szív és tüdőszövet vizsgálatára alkalmassá. A módszer lényege, hogy a tiszítási lépés mintánként 3 RNS izoláló oszloppal, a felkötőpuffer összetételét oszloponként változtatva történik ami biztosítja a kisméretű RNS molekulák tökéletes elválasztását.

miRNS expresszió meghatározása nanokapilláris QRT-PCR technikával

Az OpenArray™ nanokapilláris kvantitatív valósidejű PCR analízis ötvözi a microarray technológia nagy áteresztőképességét és érzékenységét a kvantitatív valós idejű PCR (QRT-PCR) specifikusságával. A nanokapilláris QRT-PCR során egy reakció 33 nl térfogatban zajlik le. Egy chipen összesen 3200 reakciótér található meg, így egyszerre 3200 QRT-PCR reakció futtatható. Minden chip 48 almátrixra osztható és almátrixonként 64 assay vizsgálható egyszerre, így ez a módszer egyedülálló lehetőséget biztosít nagyszámú minta elemzésére. A miRNS expressziós vizsgálatokhoz saját paneleket állítottunk össze, melyek egyenként 112 fluoreszcens festékkel (FAM) jelölt miRNS TaqMan próbát tartalmaztak, így egy chipen 24 minta párhuzamos analízisét tudtuk elvégezni.

Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (QRT-PCR)

A OpenArray chipek eredményeinek validálása, valamint a változást mutató miRNS-ek targetjeinek azonsítása TaqMan alapú QRT-PCR technikával történt. A miRNS QPCR-hez tiszta miRNS-ből speciális, hurkolt szerkezetű miRNS primerek alkalmazásával cDNS-t állítottunk elő TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit-tel. Ezt követően a második lépésben valós idejű PCR amplifikáció történt TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), valamint miRNS specifikus TaqMan próbák alkalmazásával.

Génexpresszió vizsgálat dPCR technikával

A neuronok molekuláris karakterizálását dPCR technikával végeztük el. A digitális polimeráz láncrekció (dPCR) a hagyományos PCR technika egy továbbfejlesztett formája, amely alkalmas a nagyon kis mennyiségű minta előamplifikáció nélküli kvantitálására. A hagyományos eljárással ellenben itt az egyes reakciók egymástól elszeparálva, külön reakciótérben zajlanak, ami sokkal szenzitívebbé teszi a mérést. A dPCR során minden egyes minta egy külön cellába kerül, ami még további alcellákra osztható, melyekben így pontonként meghatározható a vizsgált nukleinsav mennyisége. A minták ilyen formában való elkülönítésének köszönhető, hogy a vizsgált molekulák a Poisson-eloszlás alapján helyezkednek el. Minden egyes vizsgált pontban 0 vagy 1 molekula helyezkedik el, azaz a detektált fluoreszcencia mindig pozitív vagy negatív választ ad, így a dPCR amplifikációt követően ezek a pozitív találatok könnyen összeszámolhatóak. A hagyományos PCR esetében a kezdeti kópiaszámra, csak a reakció során mért Ct értékekből tudunk következtetni. Ezzel szemben a dPCR esetében a reakció kezdetén minden pontban maximum egy található meg a vizsgálni kívánt molekulából, így a detektált pozitív-negatív válasz független az amplifikáció ciklusszámától, ami abszolút kvantifikációt tesz lehetővé, ezzel tovább növelve a módszer megbízhatóságát.

Elektrofiziológia – whole cell patch clamp technika

Az interneuronok vizsgálatához a mintákat Dr. Tamás Gábor és csoportja biztosította. A kísérletekhez fiatal (18-25 napos) Wistar patkányokat használtak. Az állatokból kipreparált agyakból 300 µm vastag metszeket készítettek. Az elektrofiziológiai vizsgálatokhoz a szeleteket 37°C-os elvezető kamrába helyezték, amelyen mesterséges cerebrospinális folyadékot áramoltattak át.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

A miRNS expressziós profilt TaqMan alapú HTS-nanokapilláris QRT-PCR technikával határoztuk meg. A prediktált célpontok listáját a párhuzamosan elvégzett miRNS-mRNS expressziós vizsgálatok eredményeinek integratív elemzésével, szövet, illetve sejtvonal-specifikus target predikciós megközelítéssel szűkítettük. A legszembetűnöbb változásokat olyan miRNS-ek esetében tapasztaltuk, amelyek az apoptózis szabályozásában játszanak kulcsszerepet. Ilyen például a mindhárom sejtvonal esetében változást mutató *miR-*

34, miR-25, miR-17, miR-26a, miR-29c, miR-31, miR-200a és a *miR-206*. A temozolomid kezelés hatására bekövetkező változások közül a *miR-182* overexpressziója és a *miR-16*, illetve a *miR-183* repressziója a legjelentősebb, míg a többszörösen telítetlen zsírsavakkal történő kezelés esetében elsősorban a *miR-143* szint csökkenését és a *miR-20b* indukcióját figyeltük meg. A kezelésekre adott válaszok különbözősége mellett, különbségeket tapasztaltunk az egyes sejtvonalak között is. Ezek az eltérések a különböző glioblasztóma sejtvonalakban eltérően működő szignalizációs útvonalaknak köszönhetőek. Ilyen sejtvonal specifikus választ mutatott a *miR-125b* a GBM5 sejtvonalakban, illetve a *miR-197* az U373 sejtek esetében. A *miR-145* expresszió-változása minden esetben jelentős volt, ám amíg a GBM sejtekben körülbelül ötszörös csökkenést, addig az U373 sejteknél minden esetben növekvő expressziót tapasztaltunk. Ugyancsak szignifikáns expresszió-változást tapasztaltunk a *miR-140, a miR-323* és a *miR-133b* esetében is azonban ezt csak az U373 sejtek esetében észleltük. A mRNS expressziós mérések során 9 olyan apoptotikus gént sikerült detektálni, melyek expresszió-változása ellentétes irányú a szabályozó miR esetében észlelt változással. Ezek a következők: *irs1, irs2, cox2, ccnd1, sirt1, tp53inp1, itgb3, kras* és a *bcl2*. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavakkal történő kezelés hatására számos olyan miRNS és mRNS expressziója megváltozik, amelyeket valamely apoptotikus útvonal szereplőjeként már korábban azonosítottak. Bebizonyítottuk azt is, hogy az általunk alkalmazott többszörösen telítetlen zsírsavak a temozolomidhoz hasonló hatást fejtenek ki, azaz olyan génexpressziós változásokat indukálnak glioblasztóma sejtekben, amelyek azok pusztulásához vezetnek.

A PUFA-tartalmú étrenden tartott állatok esetében a szívszövetben 5 (*miR-126, miR-133b, miR-148a, miR-150, miR-200a*), a májszövetben pedig 7 (*miR-21, miR-107, miR-126, miR-133b, miR-148a, miR-200a, miR-205)* miRNS szignifikáns expressziós eltéréseit találtuk. A miRNS expressziós eredmények megerősítéséhez olyan gének vizsgálatát is elvégeztük, amelyek a kísérleteink során változást mutató miR-ek targetjeiként ismertek. Ezek közül a legjelentősebb változást a következők esetében észleltük: *apoa5, irs1, tnf, fas, vegfa, itgb3, sele, selp, ppara, cxcl12, abca1, acox1, pafah1b1, lypla3.* A szívben detektált változások az egyik legjelentősebb az *apoa5*, amely meghatározó szerepet játszik a plaza triglicerid szintjének szabályozásában, ezáltal rendellenes működése növeli a koronáriabetegségek kialakulásának kockázatát. Eredményeink alapján a többszörösen telítetlen zsírsavakban gazdag diéta nagymértékben csökkenti termelődését. Szignifikáns változást tapasztaltunk az E-selectin esetében is, amely kizárólag endothél sejtekben expresszálódik és elsősorban gyulladásos folyamatokban játszik szerepet. Ezenkívül a szérumban mért koncentrációja

alapján markerként használható atherosclerosis, magas vérnyomás, illetve koronáriabetegségek kimenetelének előrejelzésére. A PUFA diéta hatására tapasztalt pozitív változások közé sorolható a májban a *selp* repressziója, mivel ennek terméke normális körümények között csak igen kis mennyiségben mutatható ki a vérlemezkék felszínén. Megnövekedett expressziója általában valamilyen gyulladásos folyamatra, cirrózisra vagy daganatra utal.

Az idegsejteken végzett vizsgálatok első lépéseként sikeresen optimalizáltunk olyan protokollokat, amelyek alkalmasak egyetlen sejtből történő mRNS és miRNS izolálására, egyetlen sejt RNS tartalmának direkt vagy indirekt reverz transzkripciójára, illetve az átírt cDNS preamplifikálására. Ezt követően olyan digitális és valós idejű PCR protokollokat optimalizáltunk, amelyek segítségével egyetlen sejten párhuzamosan akár 10 gén analízise is elvégezhető. Céljaink közt szerepelt a kiemelkedő jelentőségű neurogliaform interneuron molekuláris karakterizálása, illetve génexpressziós mintázatának összehasonlítása piramissejtekkel. Digitális PCR alkalmazásával mindkét sejttípusban meghatároztuk 3 miRNS és 4 mRNS molekula kópiaszámát. A mRNS szinten végzett vizsgálatok eredményei alapján a *hprt* idegsejtek esetében nem alkalmazható kontrollgénként, mivel expressziója jelentősen eltér az egyes sejttípusok között, így eredményeink normalizálásához *rps18* gént használtunk. Az általunk vizsgált gének közül a *gabrd* és a *miR-204* esetében tapasztaltunk olyan mértékű expresszió különbséget, amely alapján ezek markerként használhatók a neurogliaform sejtek elkülönítése során, míg a miR-132 és a miR-7 kontrollgénként használhatók az idegsejtek molekuláris karakterizálása során.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

(*az értekezéshez szorosan kapcsolódó publikációk)

*1. **Faragó N**, Fehér LZ, Kitajka K, Das UN, Puskás LG. MicroRNA profile of polyunsaturated fatty acid treated glioma cells reveal apoptosis-specific expression changes. Lipids Health Dis. 2011 Sep 30;10:173.

2. Fabian G, **Farago N**, Feher LZ, Nagy LI, Kulin S, Kitajka K, Bito T, Tubak V, Katona RL, Tiszlavicz L, Puskas LG. High-Density Real-Time PCR-Based in Vivo Toxicogenomic Screen to Predict Organ-Specific Toxicity. Int J Mol Sci. 2011;12(9):6116-34.

3. **Faragó N**, Kocsis GF, Fehér LZ, Csont T, Hackler L Jr, Varga-Orvos Z, Csonka C, Kelemen JZ, Ferdinandy P, Puskás LG. Gene and protein expression changes in response to normoxic perfusion in mouse hearts. J Pharmacol Toxicol Methods. 2008 Mar-Apr;57(2):145-54.

*4. **Faragó N**, Zvara A, Varga Z, Ferdinandy P, Puskás LG. Purification of high-quality micro RNA from the heart tissue. Acta Biol Hung. 2011 Dec;62:413-25.

*5. **Nóra Faragó**, Ágnes K. Kocsis, Sándor Lovas, Gábor Molnár, Eszter Boldog, Lajos I. Nagy, Gábor Tamás, László G. Puskás. Digital PCR to determine the number of transcripts from single neurons after patch-clamp recording. Submitted in 2012.

*6. Gábor Molnár, **Nóra Faragó**, Ágnes K. Kocsis, Márton Rózsa, Sándor Lovas, Eszter Boldog, Éva Csajbók, János Gardi, László G. Puskás and Gábor Tamás. An identified local source of insulin in the cerebral cortex. Submitted in 2011 (co-first-author).

POSZTEREK

Effects of AC907, a new thalidomide analog on glioblastoma cells. /Debrecen, 2008
Nóra Faragó, Liliána Z. Fehér, Iván Kanizsai, Ferhan Ayaydin, Balázs Hegedűs, and László G. Puskás

Optimization of global gene expression method for profiling of 10-30 cells. /Szeged, 2009
Nóra Faragó, Eszter Boldog, Gábor Tamás, László G. Puskás

Global gene expression profile of identified neurogliaform interneurons in the neocortex. /Budapest, 2010
Eszter Boldog, **Nóra Faragó**, Márton Rózsa, Enikő Vámos, Szabolcs Oláh, Viktor Szemenyei, Sándor Lovas, László Puskás, Gábor Tamás

miRNS expresszióváltozás kimutatása DNS-chip és nanokapilláris QRT-PCR technikával glioblasztóma sejteken. /Budapest, 2010
Faragó Nóra, Ózsvári Béla, Hegedűs Balázs, Puskás László

Alacsony intenzitású, hosszan tartó testmozgás hatása a metabolikus betegség kialakulására ható gének aktivitására. /Pécs, 2010
Faragó Nóra, Puskás László, Ménesi Dalma, Zvara Ágnes, Vári Beáta, Szász András, László Ferenc

Digital PCR to determine the number of transcripts from single neurons after patch-clamp recording. /Szeged, 2012
Nóra Faragó, Ágnes K. Kocsis, Sándor Lovas, Gábor Molnár, Eszter Boldog, Lajos I. Nagy, Gábor Tamás, László G. Puskás

Jelölt neve: Faragó Nóra Katalin
Doktori iskola (Program): SZTE TTIK, Biológia Doktori Iskola
Közlemény címe: Purification of high-quality micro RNA from the heart tissue.
Szerzői: Faragó N, Zvara A, Varga Z, Ferdinandy P, Puskás LG.
Megjelenés helye, ideje: Acta Biologica Hungarica. 2011

Nyilatkozat

Alulírottak kijelentjük, hogy a fenti közleményben megjelent és a Jelölt által a Szegedi Tudományegyetemre benyújtott Ph.D. értekezésben felhasznált tudományos eredmények eddig nem szerepeltek más Ph.D. értekezés tudományos eredményei között. Tudomásul vesszük, hogy a fenti tudományos eredmények a jövőben nem szerepelhetnek más Ph.D. értekezés eredményei között.

Faragó Nóra Katalin (jelölt) .....

Dr. Puskás László (témavezető, társszerző) .....

Dr. Ferdinándy Péter (társszerző) .....

Dr. Zvara Ágnes (társszerző) .....

Dr. Varga Zoltán (társszerző) .....

Szeged, 2012, 01.13.

Jelölt neve: Faragó Nóra Katalin
Doktori iskola (Program): SZTE TTIK, Biológia Doktori Iskola
Közlemény címe: MicroRNA profile of polyunsaturated fatty acid treated glioma cells reveal apoptosis-specific expression changes.
Szerzői: Faragó N, Fehér LZ, Kitajka K, Das UN, Puskás LG.
Megjelenés helye, ideje: Lipids in health and disease. 2011.

Nyilatkozat

Alulírottak kijelentjük, hogy a fenti közleményben megjelent és a Jelölt által a Szegedi Tudományegyetemre benyújtott Ph.D. értekezésben felhasznált tudományos eredmények eddig nem szerepeltek más Ph.D. értekezés tudományos eredményei között. Tudomásul vesszük, hogy a fenti tudományos eredmények a jövőben nem szerepelhetnek más Ph.D. értekezés eredményei között.

Faragó Nóra Katalin (jelölt) .....

Dr. Puskás László (témavezető, társszerző) .....

Dr. Kitajka Klára (társszerző) .....

Dr. Fehér Liliána (társszerző) .....

Szeged, 2012, 01.13.