

Kutatási zárójelentés

OTKA K100295

Gyógyszeresen befolyásolható patomechanizmusok vizsgálata a mellékvesekéreg, mellékvesevelő és más endokrin szervek daganataiban

Vezető kutató: Dr. Igaz Péter

A K100295 kutatási terv fő kutatási iránya gyógyszeresen befolyásolható patogenetikai útvonalak vizsgálata, és ennek keretében a mellékvese-daganatok gyógyszeres kezelésében felhasználható szerek hatásainak vizsgálata volt. A mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében egyetlen mellékvesekéregre specifikus szer, a mitotán ismert, amit több mint 60 éve alkalmazunk a nélkül, hogy pontos hatásmechanizmusát ismernénk. Nagy szükség lenne új, jobb mellékhatás profilú szerekre e rossz prognózisú betegség kezelésében. Korábbi bioinformatikai metaanalízisünk alapján (publikálva *Oncogene*, 2010, IF: 7.414, előző PD72306 OTKA pályázat támogatásával) a retinoid X receptoron keresztül ható **9-cisz retinsav mint új támadáspontú szer alkalmazási lehetősége merült fel, ezért ez volt kutatásunk fő iránya. A reményteli eredmények alapján a 9-cisz retinsav vizsgálatát az OTKA pályázat alatt mindvégig folytattuk.** A 9-cisz retinsav hatásait a sikeres *in vitro* vizsgálatok után xenograft állatmodellben is vizsgáltuk.

A xenograft állatmodellben vizsgált *keringő* mikroRNS-ek adták az ötletet ahhoz, hogy a *keringő* mikroRNS-ek kifejeződését mellékvese-daganatokban szenvedő betegekben is megvizsgáljuk új, diagnosztikában használható biomarkerek kimutatása céljából. Ez az eredeti kutatási tervhez képest eltérést jelent, de a téma forradalmi újdonságára tekintettel nagy jelentőségű, és véleményünk szerint szervesen illeszkedik az eredeti munkatervhez is.

A kísérletes munkák mellett a kutatási tervet követve bioinformatikai, *in silico* vizsgálatok is történtek a mellékvese-daganatok patogenetikai útvonalainak vizsgálatára.

***In vitro* vizsgálatok**

Humán mellékvesekéreg-carcinoma NCI-H295R sejtvonalon az adrenolitikus hatású mitotán, valamint a 9-cisz-retinsav *in vitro* hatásait vizsgáltuk.

A mitotán in vitro vizsgálata

A mitotán esetében célunk az volt, hogy esetleges génexpressziós hatásait vizsgáljuk, mivel erre korábban még nem volt adat. 5×10^{-6} M-os koncentrációt választottuk ki a mitotán génexpressziós hatásainak vizsgálatára, mivel ez még nem okozott számottevő sejtpusztító hatást (flow citometria és MTT festés alapján), ugyanakkor hatékonyan gátolta a hormontermelést (kortizol, androsztendion) és a sejtek szaporodását. Elsőként vizsgáltuk a mitotánkezelés hatását teljes genom génexpressziós microarray vizsgálattal, amihez 4x44 K Agilent microarray lemezeket használtunk 48 és 72 órás mitotán kezelésekből izolált teljes RNS vizsgálatára. 117 szignifikánsan változó gént találtunk, amelyek között a szteroid bioszintézis több génje is megtalálható volt. 7 gént választottunk validálásra valós idejű RT-

PCR-rel, amelyek közül a 3-béta-hidroxiszteroid dehidrogenáz 1-es és 2-es típusának, valamint a 21-hidroxiláz mitotán hatására bekövetkező expressziós csökkenését találtuk. **Mindezek alapján a mitotán mellévesekéreg szteroidhormon bioszintézist gátló hatásaiban nemcsak az eddig ismert közvetlen enzimgátló hatások, hanem genomikus hatások is közrejátszanak.** Több mitotán hatására fokozott expressziót mutató gént is találtunk, amelyek közül négyet validáltunk, azonban ezek mitotán hatásában játszott szerepe nem világos. E munkát ismertető cikkünket a *Pharmacogenomics* folyóiratban közzeltük (2012, IF: 3,857).

9-cisz retinsav (9-cisRA) in vitro vizsgálata

Előkísérleteinkben kimutattuk, hogy a 9-cisRA gátolja az NCI-H295R sejtek szaporodását, hormontermelését (kortizol és dehidroepiandroszteron) dóziszfüggő módon. Két ismert 9-cisRA célgén az ABCA1 és ABCG1 kifejeződését is szignifikánsan, dóziszfüggően serkentette a 9-cisRA kezelés. 24 órás kezelésekből 2.5×10^{-5} , 5×10^{-5} és 7.5×10^{-5} M koncentrációban alkalmazva Agilent microarray platformon vizsgáltuk a génextpressziós változásokat. A kezelések hatására a kontrollhoz képest a három kezelési koncentrációban 699, 2320 és 2303 gén szignifikáns változását követtük. A biológiai szempontból releváns gének kiválasztásához e géncsoportokat összevetettük az irodalomban elérhető, mellévesekéreg adenoma és carcinoma között szignifikánsan különböző gének listáival. Megközelítésünk szerint a 9-cisRA hatásra változó, biológiailag releváns gének ellentétes irányban változnak az adenoma-carcinoma összehasonlításban eltérő génekkel. A 9-cisRA ugyanis feltételezésünk szerint fokozza azon gének kifejeződését, amelyek a carcinomában adenomához képest csökkentek, míg csökkenti azokat, amelyek a carcinomában fokozott kifejeződést mutatnak. Ezzel a megközelítéssel 246 génre tudtuk csökkenteni a szignifikáns gének csoportját. Ingenuity Pathway Analysis útvonalelemzés megközelítésével 4 fő útvonalat azonosítottunk a 9-cisRA hatásában: 1. szteroidhormon bioszintézis, 2. retinsav jelátvitel, 3. sejtciklus befolyásolása, 4. immunológiai hatások. 8 gént választottunk ki validálásra valós idejű PCR-rel és ezek mindegyike sikeresnek bizonyult (CCNE1, GADD45A, HSD3B1, HSD3B2, ILR12, MAP2K6, HMGCR, UHRF1) (közölve *Cell Mol Life Sci* 2014, IF: 5,808).

Állatkísérletek a 9-cisz retinsav in vivo hatásának vizsgálatára

A 9-cisRA *in vitro* hatásai alapján egy előkísérletet végeztünk athymiás hím nude egereken NCI-H295R xenograftok alkalmazásával. 3-3 kontroll ill. 10 mg/kg 9-cisRA-val kezelt egerek összehasonlításával a kezelt egerekben a daganatok mérete és tömege is kisebb volt, bár a kis elemszám miatt nem szignifikáns mértékben. A Ki-67 proliferációs marker immunhisztokémiai vizsgálatával a 9-cisRA kezelt állatokban szignifikánsan ($p < 0.01$) kisebb festődés volt észlelhető, mint a kontroll állatokban.

Ezt az irányt folytatva egy nagy elemszámú, összesen 43 SCID egeret bevonó xenograft vizsgálatban tanulmányoztuk a 9-cisRA (5 mg/kg), a mitotán (200 mg/kg) és e két szer kombinációjának hatását kontrollhoz viszonyítva. A xenograft modellt NCI-H295R sejtek beültetésével állítottuk elő. A szereket kukoricaolajban oldva per os adtuk az egereknek,

melyeket 28 napig követtünk. A kezelés végén a mitotánt és a mitotán+9-cisRA kombinált kezelést kapó csoportban a daganatméret szignifikánsan csökkent. A Ki-67 proliferációs index immunhisztokémiai vizsgálata a 9-cisRA-t és a kombinált kezelést kapó csoportokban csökkent szignifikánsan. mRNS expressziós microarray vizsgálattal (Agilent, 4x44K) szignifikáns génextpressziós eltérést azonban alig találtunk, a hét kiválasztott gén közül az ismert 9-cisRA célgén (*APOA4*), valamint egy foszfodiészteráz gén (*PDE4A*) expressziós változását tudtuk valós idejű PCR-rel validálni. A munkaterv szerint a *c-myc* kifejeződését is vizsgáltuk, de ennek nem találtuk szignifikáns eltérését.

Ezzel szemben az egerek véréből izolált keringő mikroRNS-ek közül a *miR-483-5p* kifejeződése szignifikánsan csökkent valamennyi 9-cisRA kezelést kapó csoportban. Felmerül ez alapján, hogy a *miR-483-5p* a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésének követésére alkalmas biomarker lehet.

Tekintettel arra, hogy génextpressziós szinten csak kevés eltérést találtunk, ugyanakkor a daganatméretben és Ki-67 kifejeződésében egyértelmű csökkenés volt a kombinált kezelés hatására, a hatás háttérének vizsgálata céljából proteomikai vizsgálatokat végeztünk a Szegedi Biológiai Központtal történt együttműködés keretében. Ennek során tömegspektrometriai elemzéssel 47 szignifikánsan változó fehérjét azonosítottunk, amelyek közül ismert daganatbiológiai szerepe alapján a SET fehérjét választottuk ki validálásra. Western-blot vizsgálattal a kombinált mitotán + 9-cis retinsav kezelés hatására a SET fehérje expressziója szignifikánsan lecsökkent. A SET fehérje mellékvesekéreg daganatokban betöltött szerepéről ugyanakkor eddig nem volt ismert adat. Kiszámú humán daganaton megvizsgálva a SET kifejeződését, carcinomákban enyhe kifejeződését, míg jóindulatú adenomákban teljes hiányát észleltük, ami egybecsengeni látszik a xenograft eredményekkel. A SET szerepe mindezek alapján felvethető a mellékvesekéreg daganatok patogenezisében, de ennek további vizsgálata szükséges (közlésre elfogadva ***American Journal of Cancer Research, 2015, IF: 4,165***).

Az *in vitro* és xenograft eredmények alapján a **9-cisz retinsav hatékony alternatívát jelenthet a mellékvesekéreg-carcinoma kezelésében, elsősorban kiegészítő kezelésként mitotánnal kombinálva**. Távlati terveinkben fázis I. klinikai vizsgálat tervezése, ill. kipróbálása is szerepel a 9-cisz retinsav humán hatékonyságának vizsgálatára.

Transzlációs vizsgálatok

Az egerek vérében mért keringő mikroRNS-ek adták az ötletet ahhoz, hogy a keringő mikroRNS-eket mellékvesekéreg-daganatokban szenvedő betegekben is vizsgáljuk ezek diagnosztikai alkalmazhatóságának felmérése céljából. Ez az irány az eredeti kutatási tervhez eltérést jelent, de szervesen illeszkedik az endokrin daganatok molekuláris vizsgálatához. Jó- (n=12) és rosszindulatú (n=13) mellékvesekéreg-daganatokban szenvedő betegek vérplazma mikroRNS mintázatát hasonlítottuk össze mellékvesekéreg-carcinomát jelző biomarkerek azonosítása céljából. Első körben microarray vizsgálatot végeztünk Affymetrix platformon, azonban ezzel nem sikerült szignifikáns különbségeket találnunk. Ezért második lépésben irodalmi adatok alapján választottunk ki 8 keringő mikroRNS-t, amelyek közül 5 (*hsa-miR-*

100, *hsa-miR-181b*, *hsa-miR-184*, *hsa-miR-210*, *hsa-miR-483-5p*) szignifikánsan magasabb kifejeződést mutatott mellékvesekéreg-carcinomában szenvedők vérmintáiban, mint a jóindulatú daganatokban szenvedőkben. A $dCT_{hsa-miR-210} - dCT_{hsa-miR-181b}$ és $dCT_{hsa-miR-100}/dCT_{hsa-miR-181b}$ különbsége mutatta a legmagasabb érzékenységet és fajlagosságot, mint szóbajövő malignitási markerek, azonban ezek az értékek még nem elég magasak ahhoz, hogy a klinikai gyakorlatba jelenleg bevezetésre kerüljenek. Az elemszám bővítése, további vizsgálatok szükségesek ezek megerősítésére (ez a 2015 novemberében indult K115398 OTKA/NKFIH pályázatunk egyik fő témája). A keringő mikroRNS-ek vizsgálatában számos technikai probléma merül fel, így a referencia (housekeeping) gén kérdése is. Vizsgáltuk különböző referencia gének alkalmazási lehetőségét, és megállapítottuk, hogy legjobban a keringő vérben relatíve jelentős mennyiségben jelenlévő *hsa-miR-16* jó referencia gén lehet, de az irodalomban széleskörűen alkalmazott spike-in kontroll *cel-miR-39* is jól alkalmazható, sőt ez a *miR-16*-al kombinálható is. A mikroRNS vizsgálatokban elterjedten használt *RNU6B* azonban nagy változékonyságot mutatott, így ez nem alkalmas referencia génnek a keringő mikroRNS-ek vizsgálatára (közölve **Laboratory Investigation, 2014, IF: 3,676**).

A keringő mikroRNS-ek vizsgálata a jelenleg egyik legintenzívebben tanulmányozott kutatási terület, és **a preoperatíven nehezen vizsgálható mellékvese-daganatok esetében a malignitást jelző keringő mikroRNS-ek klinikai jelentősége különösen jelentős lehet.**

Egy további vizsgálatban azt tanulmányoztuk, hogy a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengely vizsgálatára a klinikai gyakorlatban alkalmazott hormontesztek (ACTH stimulációs (tetracosactid)-teszt és kis dosisú dexamethason szupressziós teszt) hatására változik-e irodalmi adatok alapján kiválasztott keringő mikroRNS-ek kifejeződése *in vivo*. 10-10 beteg vérmintáit vizsgáltuk. A *miR-27a* kifejeződése ACTH-stimulációs teszt során csökkent, míg dexamethasonra növekedett. A dexamethason *in vitro* NCI-H295R sejtvonalon is fokozta a *miR-27a* kifejeződését. A mellékvesekéreg-daganatok diagnosztikájában felmerülő mikroRNS-ek kifejeződése a hormontesztek során nem változott, ami alkalmazhatóságukat erősíti a mellékvese-daganatok preoperatív diagnosztikájában (**Int J Endocrinol, 2015, IF: 1,948**). Ezek az első adatok arra, hogy a keringő mikroRNS-ek kifejeződését a hypothalamus-hypophysis-mellékvesekéreg tengely befolyásolása *in vivo* módosítja emberben.

Egy másik transzlációs irányban, megkíséreltük a munkaterv alapján a korábbi metaanalízisünk alapján a jó- és rosszindulatú mellékvesekéreg-daganatok elkülönítésére alkalmasnak tűnő anillin és CRM1 (exportin) gének validálását mRNS és fehérjeszintű vizsgálatokkal független mintacsoporton, azonban itt nem tudtuk alátámasztani a korábbi bioinformatikai eredményeket.

Bioinformatikai, in silico vizsgálatok

A munkatervet követve *in silico* vizsgálatok keretében velőléc eredetű daganatokat, a mellékvesevelő kiindulású pheochromocytomákra és neuroblastomákra vonatkozó nagyszámú irodalomban közölt tanulmány eredményeit (1784 neuroblastoma és 531 pheochromocytoma minta közölt génexpressziós adatait) hasonlítottuk össze ezek

génexpressziós szintű hasonlóságainak és különbségeinek azonosítása céljából. A phaeochromocytomák és neuroblastomák génexpressziós mintázatát más külső, középső és belső csíralemez eredetű daganatokkal összehasonlítva megállapítottuk, hogy e daganatok jobban hasonlítanak egymásra, mint bármilyen más daganatra. A legfőbb közös jellemzőjük a noradrenalin bioszintézis útvonal volt, míg a phaeochromocytomák és neuroblastomák közötti legfőbb különbségnek a statmin jelátviteli útvonal eltérő kifejeződése bizonyult. A hypoxia útvonallal jellemzett von Hippel-Lindau és szukcinát dehidrogenáz gén mutációk talaján kialakult phaeochromocytomákat a Ras jelátviteli útvonallal jellemzett multiplex endokrin neoplasia 2 és neurofibromatosis 1 talaján kialakult phaeochromocytomákkal összehasonlítva új eredmény, hogy az inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1) jelátvitel szerepet játszhat az utóbbi csoport patogenezisében. Mindezen megfigyelések új molekuláris patomechanizmusok lehetőségét vetik fel e daganatokban, amelyek új diagnosztikus markerként ill. terápiás célpontként is szóba jöhetnek. E munkánk is nemrégiben került közlésre a ***BMC Med Genomics*** folyóiratban (2012, IF: 3,466).

Másik munkánkban a mikroRNS-ek által mellékvesekéreg daganatokban befolyásolt útvonalakat vizsgáltuk az irodalomban elérhető mikroRNS és génexpressziós adatok felhasználásával. 39 olyan mikroRNS-t találtunk, amelyek legalább két tanulmányban egy irányban változtak. Ezek összesen 49817 mRNS célpontot jelöltek ki, amelyek 178 útvonalhoz tartoztak az Ingenuity Pathway útvonalelemzés alapján. 12 útvonalat vizsgáltunk tovább, amelyek a sejtciklus károsodása és retinsav jelátvitel útvonalakhoz tartoztak. Ezek között új, eddig nem vizsgált útvonalak is találhatóak, mint az integrin út, ill. az aril hidrokarbon receptor jelátvitel (***J Endocrinol Invest***, 2013, IF: 1,552).

A két fenti in silico vizsgálat több olyan potenciális patogenetikai utat tárt fel, ami akár gyógyszeresen is befolyásolható utakat jelent, és jövőbeli kezelési lehetőségek célpontjaiként felmerül.

A keringő mikroRNS-ek potenciális biológiai jelentősége nem ismert. Felmerül, hogy a keringő mikroRNS-ek a vérárammal távoli szövetekbe eljutva azok génexpressziós mintázatát befolyásolva mintegy hormonként funkcionálhatnak. Bioinformatikai megközelítés alapján megfigyeltük, hogy a dominálónan tumor szupresszor hatású mikroRNS-ek (pl. *hsa-miR-16*, *hsa-miR-451*, *let-7*) viszonylagosan felül vannak reprezentálva az egészséges egyének keringésében, ami alapján felvetettük egy keringő mikroRNS-ek által közvetített „tumor surveillance” (tumor felügyeleti) aktivitás lehetőségét. Ez alapján felmerül, hogy a keringő mikroRNS-ek a daganatos transzformációt gátolhatják. Mindazonáltal e hipotézis igazolására további kísérletes vizsgálatok lennének szükségesek. Ezt a hipotézist a ***Cell Mol Life Sci***-ban közzeltük (2014, IF: 5,808).

E mellett még két hipotézist közzeltünk a mikroRNS-ek potenciális biológiai jelentőségéről az OTKA/NKFIH támogatásával. Az utóbbi években több olyan megfigyelés látott napvilágot, amelyek szerint a mikroRNS-ek nemcsak az adott egyénen belül, hanem akár egyének, ill. fajok közötti kommunikációban szerepet játszhatnak (pl. anyatej, táplálékban lévő mikroRNS-ek). A mikroRNS gének domináló nem kódoló genomrészekben történt elhelyezkedése alapján felvetettük annak a lehetőségét, hogy a genom nem kódoló

részének szerepe lehet az egyének, ill. fajok közötti epigenetikai kommunikációban (**Med Hypotheses, 2015, 84, 150-154, IF: 1,074**). Több adat támasztja alá, hogy a daganatsejtek által szekretált keringő mikroRNS-ek más daganatsejteket, immunsejteket, endotélsejteket stb. befolyásolhatnak, ami a daganat progressziójában szerepet játszhat. Egy másik hipotézisünk szerint a keringő mikroRNS-ek esetleges daganatnövekedést előidéző hatásának gátat szabhat a mikroRNS-ek szövetspecifikus hatása, aminek révén a mikroRNS-ek különböző szövetekben más hatásokat fejtenek ki, így nagyon kicsi lenne az esélye annak, hogy egy adott szövet által elválasztott növekedést serkentő mikroRNS-ek más szövetekben is ugyanilyen hatásokat fejtenének ki (**Med Hypotheses, 85, 530-533, IF: 1,074**).

További, OTKA támogatásával létrejött publikációk:

A fenti közlemények mellett az OTKA támogatásával jött létre az eddigi mikroRNS vizsgálataink eredményeit bemutató összefoglaló cikk a **Cell Mol Life Sci**-ben (**2015, IF: 5,808**), valamint egy összefoglaló cikk az *Impakt* faktor nélküli *Biomol Concepts* lapban.

További, folyamatban lévő vizsgálatok

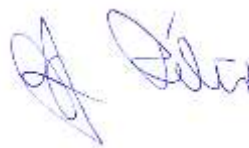
A 9-cisz retinsav további vizsgálatát tervezzük klinikai vizsgálat keretében. A mellékvesén kívül más endokrin szervek daganataiban is történtek bioinformatikai elemzések, ezek egyelőre nem vezettek közölhető eredményekre. A 2015. novemberében indult K115398 sz. OTKA/NKFIH pályázatomban egyik fő témája a keringő mikroRNS-ek vizsgálata lesz.

Az OTKA/NKFIH K100295 pályázat támogatásával az elmúlt négy évben kutatási eredményeink alapján született közlemények összesített Impakt Faktora 38,236.

Ezúton is nagyon köszönjük az OTKA/NKFIH támogatását.

Budapest, 2015. december 31.

Tisztelettel:



Dr. Igaz Péter
az MTA doktora
egyetemi docens
vezető kutató