

Projekt Záró Beszámoló – 2008.04.01.-2011.04.30.
OTKA PD72306

Vezető kutató: Dr. Igaz Péter

Funkcionális genomikai, mikro-RNS és fehérjeszintű vizsgálatok a sporadikus mellékvese daganatok patogenezisének tanulmányozására eddig ismeretlen patomechanizmusok felderítése céljából.

*Az OTKA támogatásával az elmúlt 3 évben összesen 6 impakt faktoros nemzetközi folyóiratban jelent meg (ill. fogadták el) utolsó szerzős cikkem a projekt témájával kapcsolatban, amelyek kumulatív IF-e: $\Sigma IF: 22,502$. Eredményeim alapján a 2010 áprilisában Prágában megrendezett Európai Endokrinológiai Kongresszuson az Oral Communication Highlights szekcióban tartottam előadást és a 2009-es kongresszuson Tömböl Zsófia PhD hallgatóm hazánkban elsőként European Young Investigator Award kitüntetésben részesült. A 2011. ápr. 30-május 4. között Rotterdamban megrendezésre kerülő Európai Endokrinológiai Kongresszuson (ECE2011) szimpózium tartására kértek fel: Symposium 27 – Breaking news in adrenal malignancy: **Igaz P:** Transcriptome analysis and microRNAs in adrenal tumours*

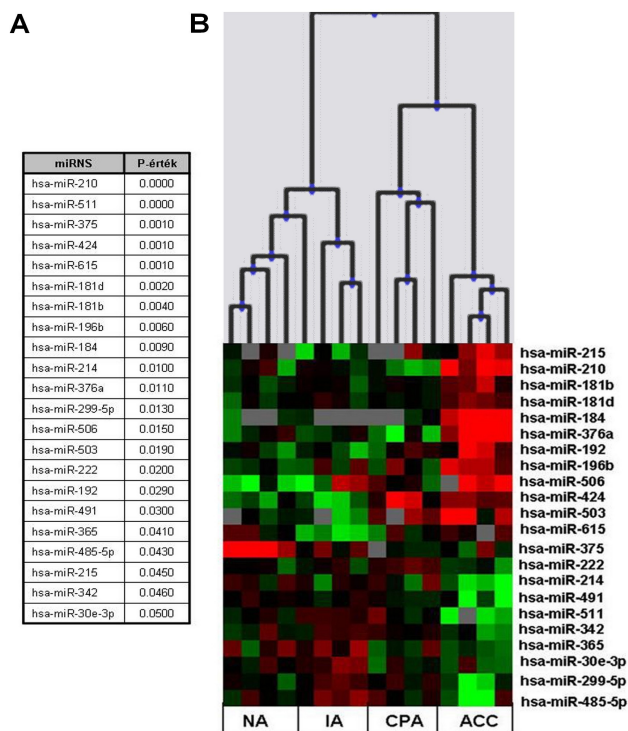
A munkatervben tervezett vizsgálatok döntő részét elvégeztem. Több olyan molekuláris útvonalat azonosítottunk, ami a mellékvesekéreg daganatok patogenezisében szerepet játszhat, és gyógyszeres támadáspontként is szóbajöhet.

Kutatásaimban az eredeti munkaterv szerint haladtam. mRNS, mikroRNS (miRNS) és fehérjeszintű vizsgálatokat végeztem mellékvesekéreg daganatokban, valamint mikroRNS vizsgálatokat pheochromocytomákban. **Elsőként írtuk le a mellékvesekéreg daganatok mikroRNS expressziós mintázatát és az első között a pheochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatát. Elsőként végeztünk bioinformatikai metaanalízist mellékvesekéreg daganatokban. Új szövetspecifikus mikroRNS target predikciós eljárást dolgoztunk ki.**

Az ép mellékvesekéreg szöveteken és mellékvesekéreg daganatokban (jóindulatú hormonálisan inaktív, kortizol- és aldosterontermelő, valamint rosszindulatú daganatok, n=58) végzett mRNS-szintű vizsgálataink alapján merült fel a gyulladáshoz mediátor hisztaminnal kapcsolatos gének és fehérjék (hisztidin dekarboxiláz, hisztamin receptorok) eltérő expressziója. **Eredményeink szerint a rosszindulatú daganatok hisztamintermelő képessége csökkent, és a receptorok szintjén is szignifikáns különbségek észlelhetők mind mRNS, mind fehérje szinten.** A 2-es típusú hisztamin receptor (HRH2) mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt a kortizoltermelő és aldosterontermelő adenomákban minden más vizsgált csoporthoz képest, a kortizoltermelő adenomákban ezek mellett a 4-es típusú receptor (HRH4) expresszió mérhetően alacsony volt az összes mintában. A rosszindulatú daganatokban a 3-as hisztamin receptor (HRH3) fokozott expressziója a malignitás markereként is szóbajöhet. **Elsőként mutattuk ki az ép mellékvesekéreg hisztamintermelő képességét, ami az immun-neuroendokrin kölcsönhatások új aspektusát jelentheti.** (Szabó PM... *Igaz P: Differences in the expression of histamine-related genes and proteins in normal human adrenal cortex and adrenocortical tumors; *Virchows Archiv (IF: 2,305)*.*

További munkámban a mellékvesekéreg daganatok mikroRNS expressziós mintázatának tanulmányozására koncentráltam. A mikroRNS-ek eltérő kifejeződését már számos daganatban leírták, de a mellékvese daganatok vonatkozásában vizsgálataink kezdetekor még nem voltak adatok a mikroRNS-ek expressziójáról. Ép mellékvesekéreg

szövetek, hormonálisan inaktív és kortizoltermelő benignus, valamint malignus mellékvesekéreg daganatok mikroRNS expressziós mintázatát Taqman TLDA kártyákon vizsgáltuk (csoportonként 4-4 minta, n=16). A szignifikáns eltérést mutató mikroRNS-ek eltérő expresszióját real-time PCR-rel validáltuk nagyobb elemszámon (összesen n=36). 22 mikroRNS-t azonosítottunk, amelyek szignifikáns expressziós különbségeket mutattak (1. ábra). Ezek között a miR503 és miR511 expressziós különbsége ($dCT_{hsa-miR-511} - dCT_{hsa-miR-503}$) bizonyult a legjobb markernek a jó- és rosszindulatú daganatok elkülönítése céljából közel 100 %-os szenzitivitás és 97 %-os specificitás értékekkel. Természetesen ennek gyakorlati alkalmazásához további, nagyobb mintaszámon végzendő vizsgálatok szükségesek. Mivel a mellékvesekéreg daganatok malignitásának megállapítása a szövettani vizsgálatok keretében nehéz, az azonosított mikroRNS biomarkereknek nagy klinikai jelentősége lehet. Az azonosított mikroRNS expressziós eltérések patogenetikai jelentőségének megállapítása céljából, új szövetspecifikus megközelítésként, a mikroRNS expresszió mellett párhuzamos mRNS expressziós vizsgálatot is végeztünk ugyanazon mintákon.

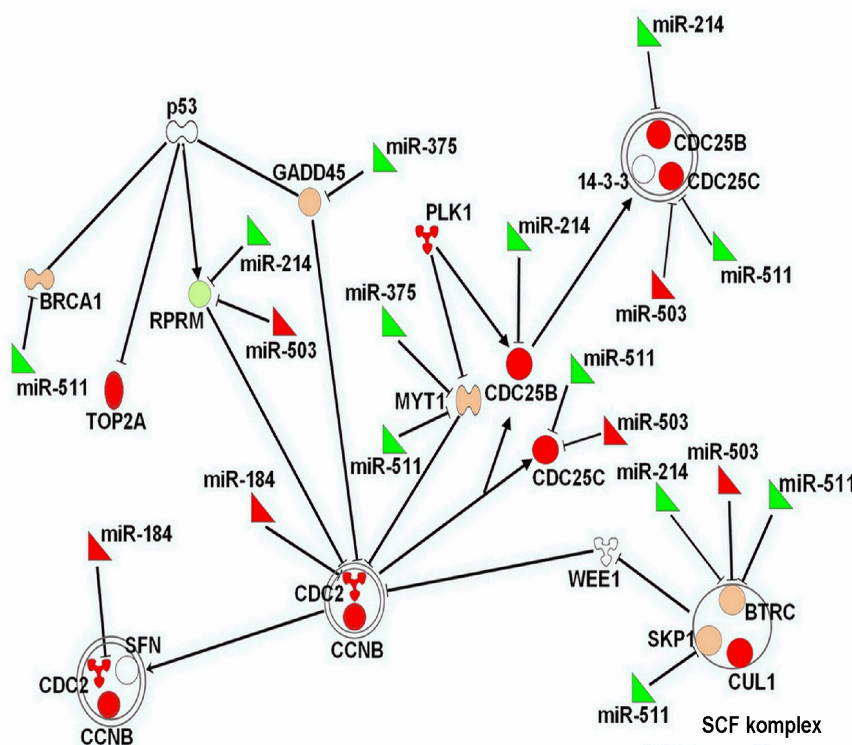


1. ábra
A vizsgálati csoportok között szignifikánsan eltérő kifejeződést mutató mikroRNS-ek listája (A) és expressziós hőtérképe (B).

A 22 szignifikáns expressziós eltérést mutató miRNS-t és a vizsgált 16 (csoportonként 4-4) mintát a normalizált miRNS expressziós eredmények (-dCT) alapján egyaránt hierarchikus klaszter analízisnek vetettük alá. Ennek során az azonos csoportba tartozó minták egymás mellé kerültek. NA: ép mellékvese; IA: inaktív adenoma; CPA: kortizoltermelő adenoma; ACC: kortizoltermelő mellékvesekéreg carcinoma. A piros szín az expresszió fokozódását, a zöld az expresszió csökkenését, a szürke pedig a nem detektálható miRNS-eket jelöli.

A mikroRNS-ek hatásának vizsgálatában az egyik legnagyobb problémát az általuk szabályozott hírvivő mRNS-ek azonosítása képezi. A rendelkezésre álló számítógépes predikciós algoritmusok óriási számú cél mRNS-et azonosítanak, amelyek közül a biológiailag releváns molekulák azonosítása igen nehéz (Szabó PM, ..., *Igaz P: MicroRNA target prediction: problems and possible solutions. Current Bioinformatics IF (2009): 1,688*). E kérdés vizsgálatára egy általunk kidolgozott módszert és számítógépes algoritmust használtunk. A párhuzamosan végzett mRNS expressziós vizsgálatok eredményét felhasználva, a predikciós algoritmusokkal azonosított génlistából kiszűrtük a nem expresszálódó mRNS-eket, mivel ezek nem állhatnak az adott szövetben mikroRNS szabályozás alatt, másrészt olyan mRNS-eket kerestünk, amelyek ellentétesen változnak szabályozó mikroRNS-eikkel. Ily módon a szóbjövő cél mRNS-ek körét jelentősen csökkentettük, majd ezeket útvonalelemzésnek vetettük alá. Útvonalelemzéssel (Ingenuity

Pathway Analysis) a sejtciklus G2-M ellenőrzőpontjának eltéréseit mutattuk ki rosszindulatú daganatokban (2. ábra), ami e rossz prognózisú daganatok kezelésében



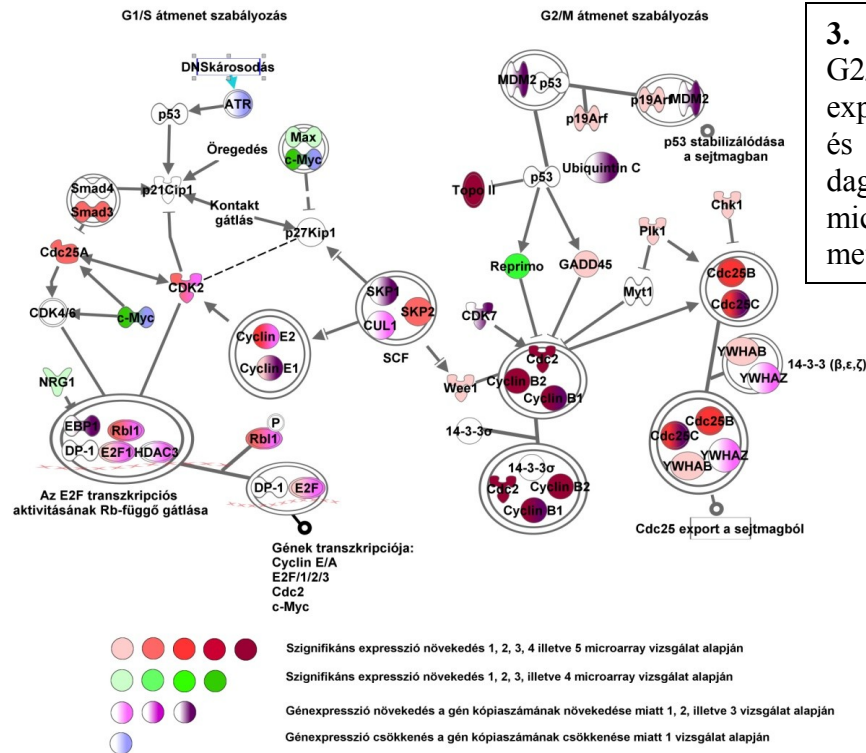
2. ábra: A sejtciklus G2/M ellenőrzőpontjának károsodása mellékvesekéreg carcinomában.

Az egyes fehérjék közötti vonalak és nyilak ismert molekuláris interakciókat mutatnak. A háromszögek a mellékvesekéreg carcinoma és ép mellékvese minták között szignifikáns expressziós eltérést mutató miRNS-eket jelöli. Piros: szignifikáns expresszió növekedés; rózsaszín: nem szignifikáns mértékű expresszió fokozódás; sötétzöld: szignifikáns expresszió csökkenés; világoszöld: nem szignifikáns mértékű expresszió csökkenés.

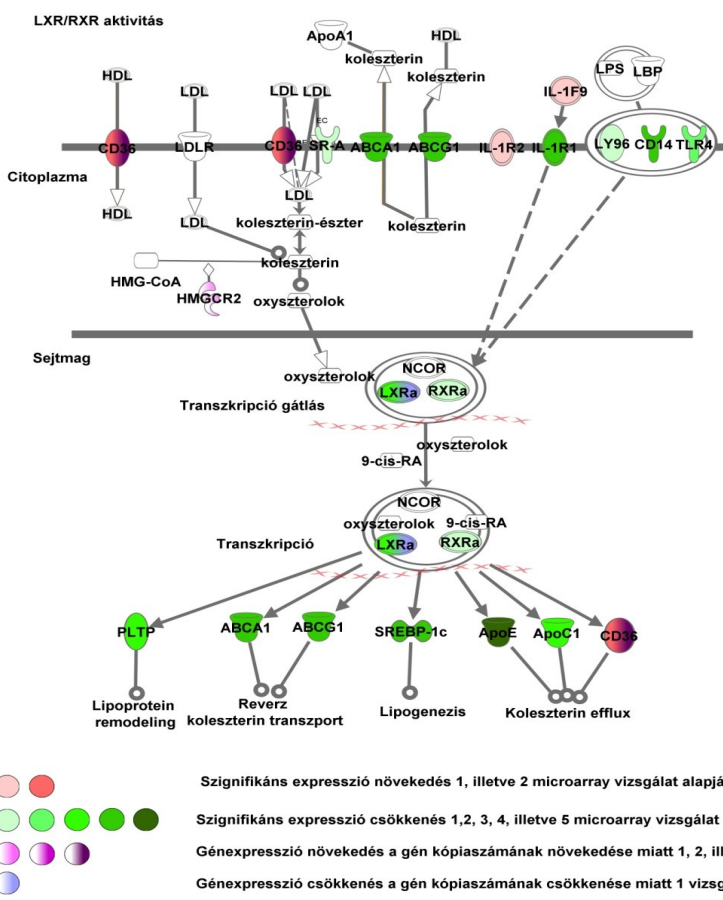
szóabajövő új gyógyszeres támadáspontok azonosítását is lehetővé teszi. (Tömböl Z, ..., *Igaz P: Integrative molecular-bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue specific target prediction and pathway analysis. Endocrine-Related Cancer IF: 4,282*).

További munkánkban a mellékvesekéreg daganatokra eddig közölt funkcionális genomikai vizsgálatok eredményeit (saját eredményeinket is) metaanalízisnek vetettük alá, és ennek keretében az mRNS expressziós vizsgálatok és a CGH (komparatív genom hibridizáció) által kimutatott kromoszómaeltérések párhuzamait kerestük. 10 mintán (3 hormonálisan inaktív, 3 kortizoltermelő benignus, 4 malignus) mi is CGH vizsgálatot végeztünk és ezt ugyanezen mintákon végzett génexpressziós vizsgálatok eredményeivel vetettük össze. Az eredményeket ezt követően útvonalelemzéssel vizsgáltuk.

A vizsgálatok során három fő patogenetikai útvonalat azonosítottunk: **a sejtciklus károsodását (3. ábra), a retinoid jelátvitel eltéréseit (4. ábra) és komplement-immunológiai tényezőket. A retinoidok jelentősége mellékvesekéreg daganatokban teljesen új eredmény.** A mellékvesekéreg carcinomában a retinsav bioszintézis enzimeinek csökkent kifejeződését találtuk. Az immunológiai tényezők szerepe a mellékvesekéreg daganatok és az immun-neuroendokrin interakciók kapcsolatára utal (*Szabó PM,, Igaz P: Meta-analysis of adrenocortical tumor genomics data: novel pathogenic pathways revealed. Oncogene IF (2009): 7,135*). A retinoid jelátvitel befolyásolása új gyógyszeres támadáspontokat is magába foglalhat. Mivel a mellékvesekéreg carcinoma gyógyszeres kezelése nem megoldott, egyetlen hatékony, per os szedhető gyógyszer, a mitotán áll rendelkezésre, ezen útvonal további tanulmányozása terápiás szempontból is nagy jelentőségű lehet.



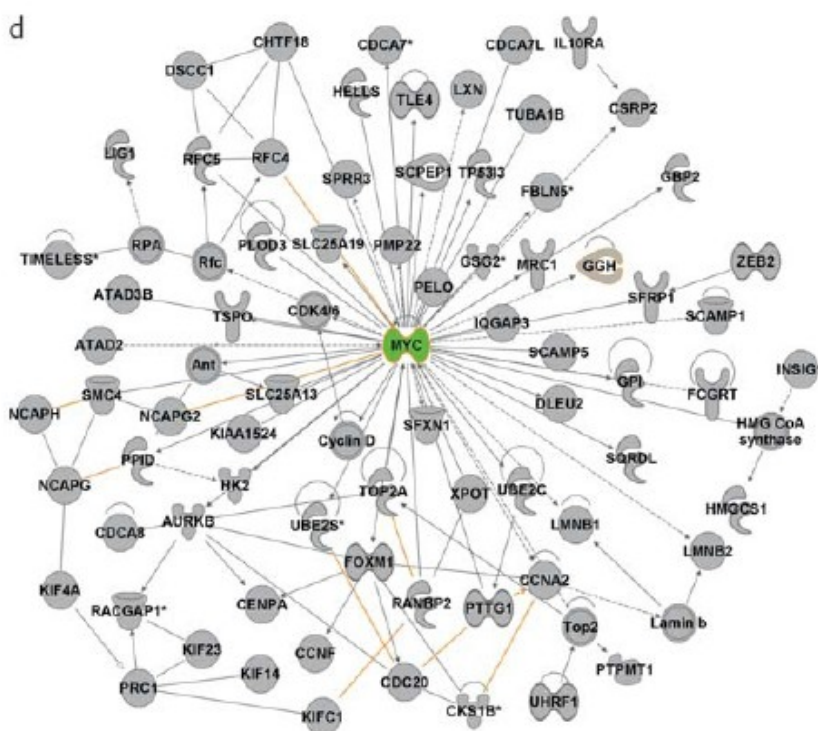
3. ábra: A sejtciklus G1/S és G2/M átmenet tagjainak expressziós változásai a benignus és malignus mellékvesekéreg daganatok között végzett microarray vizsgálatok metaanalízise alapján.



4. ábra A retinsav jelátviteli útvonal tagjainak expressziós változásai a benignus és malignus mellékvesekéreg daganatok között végzett microarray vizsgálatok metaanalízise alapján.

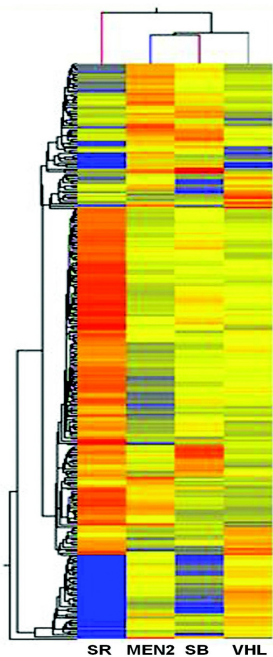
A retinoid jelátvitel vizsgálata során olyan génextpressziós eltéréseket is találtunk, amelyek szerepet játszhatnak annak a klinikopatológiai megfigyelésnek a magyarázatában, hogy a jóindulatú mellékvesekéreg adenomák lipidekben jóval gazdagabbak a rosszindulatú mellékvesekéreg daganatokhoz képest.

A funkcionális genomikai vizsgálatok metaanalízise keretében hálózat-topológiai vizsgálatokat is végeztünk, ami alapján a c-myc protoonkogén csökkent kifejeződését észleltük mellékvesekéreg carcinomában és a c-myc expressziójának csökkenése a hálózatelemzés alapján a patogenezis központi eleme lehet (**5. ábra**). E megfigyelés érdekes, mivel a c-myc kifejeződése rosszindulatú daganatokban általában fokozott. Korábbi kísérletes megfigyelések is a c-myc csökkent kifejeződésére utalnak mellékvesekéreg carcinomában. E munkát ismertető hipotézisünket nemrégiben fogadták el közlésre (Szabó PM, Rácz K, **Igaz P**: *Underexpression of c-myc in adrenocortical cancer: a major pathogenic event? Hormone and Metabolic Research DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1273762> IF (2009): 2,686*)).



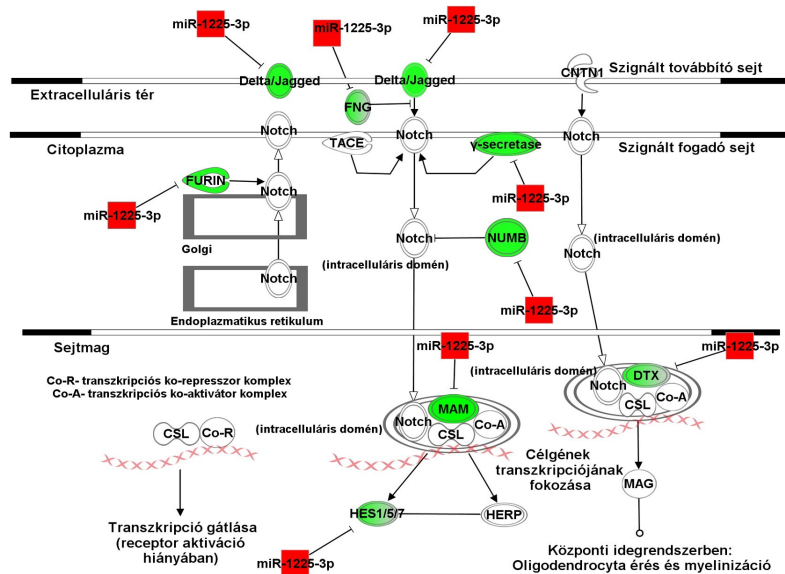
5. ábra: A mellékvesekéreg carcinoma hálózattopológiai elemzésének eredménye. A zölddel jelölt c-myc központi csomópontot jelez.

A mellékvesévelő eredetű pheochromocytomák mikroRNS expressziós mintázatát formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövettani preparátumokból izolált RNS mintákban vizsgáltuk, mivel fagyasztott minta nem állt kellő számban rendelkezésre. Microarray metodikával először igazoltuk, hogy 3-3 paraffinos-fagyasztott mintapár mikroRNS expressziós mintázata jól korreláltak, ami alapján a paraffinos minták a pheochromocytomák mikroRNS mintázatának vizsgálatára alkalmasak. Ezt követően 21 minta mikroRNS microarray vizsgálatát végeztük, majd a szignifikáns mikroRNS-ek validálását és a vizsgálati mintaszám növelését real-time PCR-rel végeztük (n=33). Sporadikus benignus, multiplex endokrin neoplasia 2, von Hippel-Lindau szindróma és neurofibromatosis 1-es típusa talaján kialakult öröklődő benignus és sporadikus recidiváló daganatokat vizsgáltunk. Több szignifikánsan változó expressziót mutató mikroRNS-t észleltünk (**6. ábra**), ezek között a miR-1225-3p-t emelném ki, mivel ez a recidiváló és a nem recidiváló pheochromocytomák elkülönítésére alkalmasnak tűnik. Mivel a pheochromocytomák esetében sem a malignitást,



6. ábra: Különböző típusú phaeochromocytomák miRNS expressziós mintázaton alapuló hierarchikus klaszter analízise.

SR: sporadikus recidiváló; SB: sporadikus benignus; VHL: von Hippel-Lindau-szindrómához társuló; MEN2: multiplex endokrin neoplasia 2-es típusához társuló phaeochromocytoma. A fokozott expressziót piros, a csökkent expressziót kék szín jelöli.



7. ábra: Sporadikus recidiváló phaeochromocytomákban a Notch-jelátviteli útvonal miRNS-ek által regulált poszttranszkripciós gátlását találtuk az egyik legjellemzőbb patogenetikai eltérésnek.

Az egyes fehérjék közötti vonalak és nyilak ismert molekuláris interakciókat mutatnak. A piros négyszögek a sporadikus recidiváló és benignus phaeochromocytoma minták között szignifikáns expressziós eltérést mutató miR-1225-3p-t jelöli. Piros: szignifikáns expresszió növekedés; zöld: a miR-1225-3p potenciálisan gátolt cél mRNS molekulái.

sem a recidivakészséget előrejelző molekuláris marker eddig nem volt ismert, eredményünk nagy gyakorlati jelentőségű lehet. A miR-1225-3p szöbajövő célgénjeinek útvonal elemzése a Notch-jelátviteli út jelentőségét (7. ábra) jelezte a phaeochromocytomák recidivájában (Tömböl Z, ... **Igaz P: MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas. *Modern Pathology, IF (2009): 4,406***). A Notch-jelátvitel befolyásolása a phaeochromocytomák gyógyszeres kezelésének lehetőségét is felveti, ami különösen a gyógyszeres kezelésre refrakter malignus phaeochromocytomák kezelésében nyithat távlatokat.

A fenti patogenetikai útvonalak in vitro validálását már megkezdjük, de ennek eredményei még nem állnak rendelkezésre. E munkát kiterjesztve a továbbiakban terveznénk folytatni, amire egy újabb OTKA pályázatot nyújtottam be (K 100295).

Ez úton is köszönöm az OTKA támogatását.

Tisztelettel:

Dr. Igaz Péter PhD
egyetemi adjunktus