

A CD24 mRNS-expresszió meghatározása kvantitatív valósídejű PCR-módszerrel alacsonyan differenciált szerózus papilláris petefészekrákos szöveti mintákból



Soltész Beáta dr.¹, Lukács János dr.², Márton Éva¹, Szilágyi-Bónizs Melinda dr.¹,
Penyige András dr.¹, Póka Róbert dr.², Nagy Bálint dr.¹

¹Debreceni Egyetem, ÁOK, ¹Humángenetikai Tanszék, Debrecen (Tanszékvezető: Dr. Nagy Bálint)

²Debreceni Egyetem, ÁOK, Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet, Debrecen (igazgató: Dr. Póka Róbert)

Célkitűzés: A CD24 egy kis molekulású sejtfelszíni fehérje, több csoport kutatási eredménye utal arra, hogy alkalmas lehet független prognosztikus tumormarkernek. Munkánk során a CD24-gén expressziójának meghatározását tűztük ki célul petefészekrákos betegek szöveti mintáiból.

Anyagok és módszerek: A vizsgálatokhoz 22 fő alacsonyan differenciált szerózus papilláris petefészekrákos és 6 fő petefészekrákos nem szenvedő személy szöveti mintáit használtuk fel, amelyeket a petefészkek műtéti eltávolítása során nyertünk. Az RNS-t szilika adszorpciós módszerrel izoláltuk ki a szövetekből. Ezt követően cDNS-t szintetizáltunk, majd kvantitatív valósídejű PCR-t végeztünk primer-próba rendszerrel, és meghatároztuk a CD24-gén expresszióját. Háztartási géneként β -globint használtunk fel az eredmények normalizálásához. Az adatok statisztikai kiértékeléséhez Student-féle t-próbát használtunk.

Eredmények: A kontroll- és a betegcsoport (FIGO I, III és IV) CD24 mRNS expressziójában lényeges különbség mutatkozott [$1,1002 \pm 2,6227 \Delta Ct$ vs. $36,5764 \pm 75,0772$ ($p=0,03$)]. Hat beteg esetében (26,8%) a vizsgált szövetek génexpressziója nem tért el lényegesen az egészségesektől. A hálózatokat kutatva a fehérje-fehérje kölcsönhatások között négy kölcsönhatást sikerült kimutatni a LYN, a SELP, a FGR és a NPM1 fehérjékkel. A szabályozó mikroRNS-molekulákat kutatva a miRTargetLink adatbázisa szerint több miRNS van hatással a CD24 expressziójára, ezek közül a legspecifikusabbak a hsa-miR34a-5p és a hsa-miR-373-3p.

Következtetések: A CD24-gén expresszióját vizsgálva magasabb szinteket mutattunk ki petefészektumoros betegek szöveti mintáiban, amely a FIGO-stádiummal is összefüggést jelzett. Hálózatokat kutatva fehérje-fehérje és szabályozó miRNS kölcsönhatásokat is találtunk, amelyek fontos szerepet játszanak a tumor kialakulásában és progressziójában.

Kulcsszavak: mRNS, CD24; génexpresszió, petefészekrák, hálózat

Expression of CD24 with qualitative real-time PCR in low grade serous ovarian cancer patients' samples

Objective: CD24 is a small molecular weight cell-surface protein, the results of independent research groups called the attention for its use as prognostic tumor marker. We decided to determine the CD24 gene expression in ovarian cancer patients' tissue samples.

Materials and methods: We collected tissue samples from 22 low grade serous ovarian cancer patients and from 6 non-ovarian cancer patients. We isolated the RNA by silica adsorption method. We synthesized the cDNA and we performed quantitative real-time PCR. We used beta-globin gene as housekeeping gene for the normalization of the data. We performed Student t-test for the statistical analysis of the data. We checked the CD24 protein-protein and miRNA connections.

Results: There was a significant difference in the CD24 gene expression in the ovarian cancerous and non-cancerous tissue samples [$1.1002 \pm 2.6227 \Delta Ct$ vs. 36.5764 ± 75.0772 ($p=0.03$)]. In the case of six patients (26.8%) the gene expression was low,

Levelezési cím:

Dr. Nagy Bálint, 4032 Debrecen, Egyetem tér 1. E-mail: nagy.balint@med.unideb.hu

similar to the controls. During the network analysis in the protein-protein interactions LYN, SELP, FGR and NPM proteins were associated with CD24. In the miRTargetLink database hsa-miR34a-5p and hsa-miR-373-3p showed connection.

Conclusions: CD24 gene expression was higher in the ovarian cancer patients tissue samples, it showed correlation with FIGO classification. During the network analysis we found four proteins and two miRNAs which showed association with CD24.

Keywords: mRNA, CD24, gene expression, ovarian cancer, network

Bevezetés

A CD24 egy kis molekulású, 27 aminosavból álló, erősen glikolizált, mucinhoz hasonló sejtfelszíni fehérje. Az érett fehérje molekulásúlya 3 kDa, a szövetekből történő izolálás során mérete 20-70 kDa között változhat, ez jelzi, hogy a glikozációja eltérő [1, 2, 3]. Ligandja a P-szelektinnek, segíti a CD24+-sejtek szétszóródását, a sejteken belüli jeladásban vesz részt a tirozin-kinázokhoz való közvetlen kapcsolódással [4, 5].

Kezdetben főleg onkohematológiai megbetegedésekben vizsgálták, majd Kristiansen és munkatársai [6], valamint Schostak és munkatársai [7] prosztatárakos betegek mintáiban, munkacsoportunk is végzett hasonló meghatározásokat régebben [8, 9]. Az eredmények arra utalnak, hogy a CD24 független prognosztikus marker lehet a petefészek, a prosztata és a nem kissejtes tüdődaganatokban [5]. Zhu és munkatársai szerint a CD24 expressziója olyan független faktor, amely összefüggést mutat a tumor-metasztázissal és a túléléssel [10]. Onkogén és metasztatikus molekulaként sorolták be Lee és munkatársai [11] 28 tanulmányt feldolgozó és 2925 beteg adatait kiértékelő munkájukban. Különböző országokból származó, és több fajta tumort felölelő metaanalízisük során emlő, petefészek, gyomor, bőr, tüdő, prosztata és colorectalis daganatokat tárgyaló cikkeket gyűjtöttek össze. Megállapították, hogy a malignus és a benignus daganatok CD24 expressziója lényegesen különbözött, de összefüggés mutatkozott a nyirokmirigy-áttétekkel, a klinikai stádiummal és a kedvezőtlen túléléssel is.

A CD24 pontos hatásmechanizmusa a hormonfüggő szervek esetében (mell és petefészek) nem ismert részleteiben. Annyi tudott, hogy a CD24-et expresszáló sejteknél a P-szelektin ligandja, és úgy funkcionál, mint adhéziós molekula, amely a trombociták aggregációját fokozza. A CD24+ tumorsejtek a metasztázisok kialakulásában játszanak szerepet.

A nőknél a petefészekrák az egyik vezető halálozási ok, az összes tumor kb. 4%-át teszi ki, és az összes halálozás 4,2%-át okozza [12]. A tumor általában későn kerül felismerésre

és nehezen kezelhető. Ezért fontos olyan biomarkerek kutatása, amelyek segíthetik a korai felismerést és a kezelések monitorizálását. Ezért határoztuk el a CD24 expressziójának meghatározását petefészekrákos betegek mintáiból való idejű PCR módszerrel.

Anyagok és módszerek

Betegek és mintavétel

A vizsgálatokhoz 22 alacsonyan differenciált szerózus papilláris petefészekrákos és 6 nem ovárium tumoros személyi szöveti mintáit használtuk fel, ezeket műtéti eltávolítás során nyertük. A két csoport átlagos életkora nem tért el lényegesen (petefészekrákos: $61,3 \pm 11,7$ év; kontroll: $57,8 \pm 10,3$ év) (1. táblázat). A kontrollcsoportba besorolt asszonyok esetében a méh rendellenes elhelyezkedése miatt történt a méh eltávolítása és műtét során a két ovárium is eltávolításra került. A részletes szövettani vizsgálat ezeknél a személyeknél nem mutatott tumoros elváltozást. A vizsgálatokba bevont személyek demográfiai és klinikai adatait az 1. táblázat mutatja, a betegek tájékoztatva lettek a tanulmányról, és beleegyező nyilatkozatot írtak alá. A vizsgálatok elvégzéséhez TUKEB-engedéllyel rendelkezünk.

RNS-izolálás

A szövetekből az RNS-t szilika adszorpciós módszerrel izoláltuk ki NucleoSpin RNS (Macharey Nagel, Düren, Németország) kitjével a gyártó utasítása szerint, 30 mg mennyiségű mintákból.

cDNS-szintézis

cDNS-t szintetizáltunk First Strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, USA) segítségével.

1. táblázat. Petefészekrákos és nem ovárium tumoros nők demográfiai adatai és klinikai besorolása

	Nem ovárium tumoros nők	Petefészekrákos betegek			
		FIGO I-IV	FIGOI	FIGOIII	FIGOIV
Mintaszám	6	22	3	13	4
Átlagos életkor (év)	$61 \pm 12,3$	$55,9 \pm 9,7$	$47,0 \pm 17,0$	$55,1 \pm 5,6$	$64,5 \pm 10,8$
Szignifikanciaszint (p)		0,377	0,292	0,303	0,650

Kvantitatív valósídejű PCR

Kvantitatív valósídejű PCR-t végeztünk primer-próba (TIB MOLBIOL, Berlin, Németország) rendszerrel és meghatároztuk a CD24-gén expresszióját LightCycler 96 készülék alkalmazásával. A CD24 specifikus primer szekvenciák a következők voltak, 5'-TgA AgA ACA TgT gAg Agg TTT GAC-3' sense, 5'-gAA AAC TgA ATC TCC ATT CCA CAA-3' antisense, és a fluoreszcens próbák 5'-ggA TgT TgC CTCF TCC TTC ATC TTg TAC ATg-3'-fluoreszcein, LC-640-AAC TCC AgC AgA TTT AAT ATT ggC ATT CAT CA-PH-3'. A primerekből és a próbákból 5 pmol, a MgCl₂-ből 2 nmol mennyiségeket használtunk fel 10 µl végtérfo-gatban. A kezdeti 10 perces 95 °C-on történő denaturálás után 45 ciklusban denaturációs (95 °C; 10 sec), annealing (58 °C; 15 sec) és extenziós (72 °C; 20 sec) lépések következtek. Az egyes minták közötti esetleges RNS mennyiségi és minőségi különbségek kiküszöbölésére háztartási géneként a β-globint használtuk fel az eredmények normalizálásához (Control kit, Roche, Németország) [8, 9].

Hálózati elemzések

A CD24 hálózati elemzése során megvizsgáltuk a szabályozó miRNS-ek és a fehérje-fehérje kölcsönhatásokat. A miRTargetLink a szabályozó miRNS molekulák, a Biogrid adatbázist a fehérje-fehérje kölcsönhatások felderítésére használtuk (www.mirbase.com).

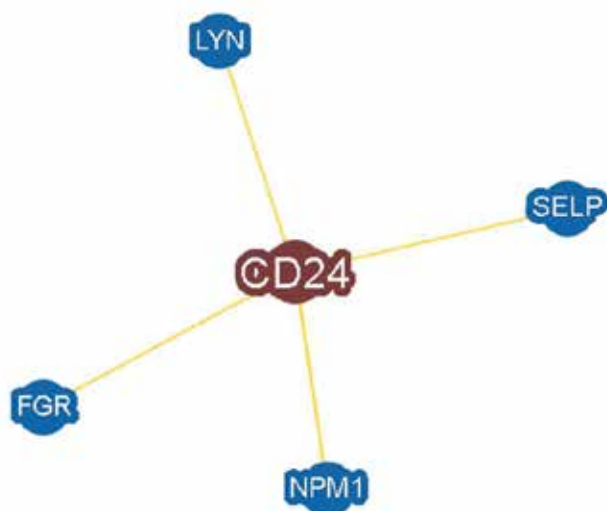
Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai kiértékeléséhez Student-féle t-próbát végeztünk, a szignifikanciát ($p < 0,05$) értékben határoztuk meg.

Eredmények

Az ováriumtumoros betegek 73,92%-ában mutatkozott magas CD24-expresszió, míg 26,08%-ában nem. Összességében szignifikáns különbség mutatkozott a kontroll- és a betegcsoportok (FIGO I, III és IV) mRNS-expressziójában [$1,1002 \pm 2,6227 \Delta Ct$ vs. $36,5764 \pm 75,0772$ ($p = 0,03$)].

A CD24-gén expressziós eredményeket a 2. táblázat mutatja. A FIGO-besorolás szerint lebontva a csoportokat ezek között a különbség szintén jelentős, azonban ez statisztikailag nem szignifikáns (2. táblázat).



1. ábra. A CD24 protein-protein kapcsolatok

Az eredmények a Biogrid adatbázis felhasználásával készültek

A kísérleti eredmények affinitás kromatográfias kísérleteken alapulnak

A hálózatokat kutatva a fehérje-fehérje kölcsönhatások között négy kölcsönhatást sikerült kimutatni LYN, SELP, FGR és NPM1 fehérjékkel (1. ábra).

A miRTargetLink adatbázis szerint több miRNS van hatással a CD24 expressziójára, de ezek közül a legspecifikusabbak a hsa-miR34a-5p és a hsa-miR-373-3p (2. ábra).

Megbeszélés

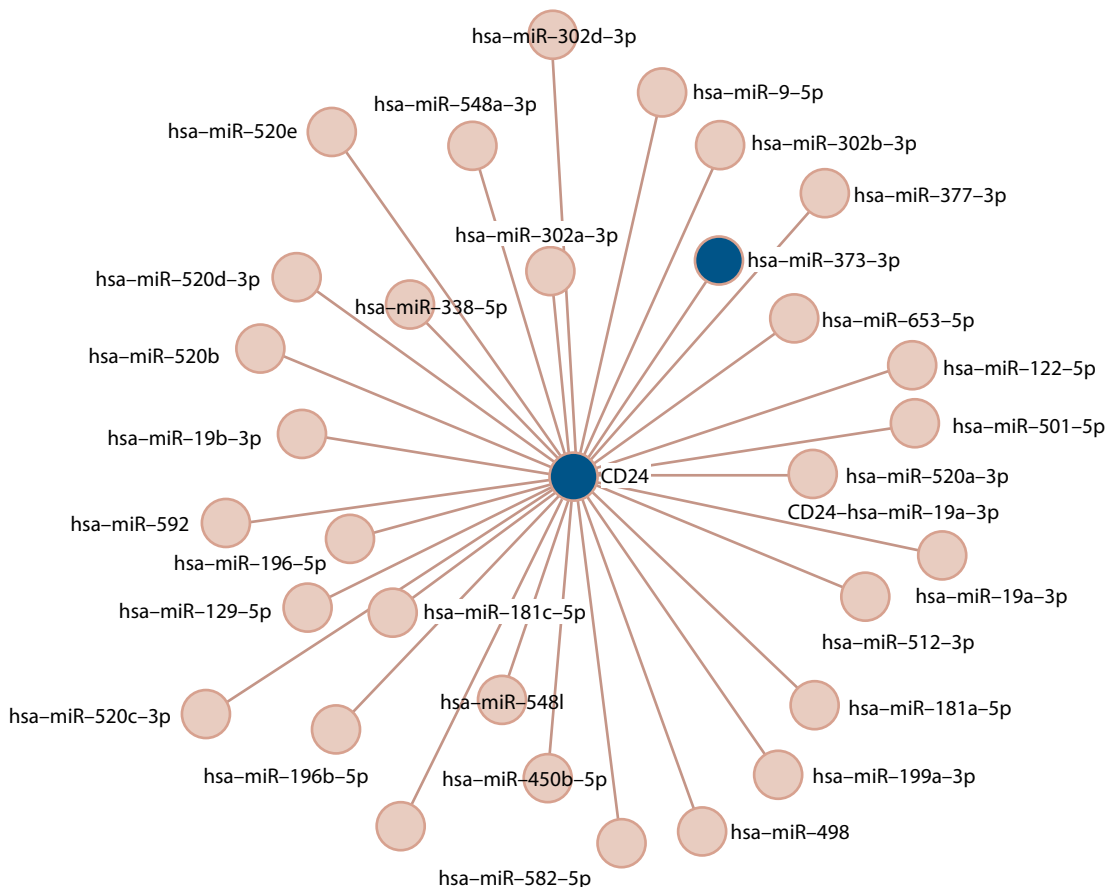
A petefészekrák a leggyakoribb halált okozó nőgyógyászati tumoros betegség. A betegek jelentős részénél (kb. 70%) a tumor csak későn kerül diagnosztizálásra, a nem specifikus, nem egyértelmű tünetek miatt. Ehhez hozzájárul még az is, hogy a napjainkban alkalmazott tumormarkereknek alacsony a specificitása és a szenzitivitása [13, 14]. Független diagnosztikus markerként írta le több szerző a CD24-molekulát, amelynek mRNS-expressziója összefüggést mutatott a tumor előrehaladottságával, a FIGO-besorolással és a tumor progressziójával.

Tanulmányunkban 23 petefészekrákos és 6 kontroll petefészekmentes nő szöveti mintájában a CD24-gén mRNS expresszióját határoztuk meg valósídejű PCR-módszerrel. Az esetleges szöveti mennyiségek eltéréseinek a kiküszöbölésére a béta-globin génexpresszióját is lemértük és ehhez normalizáltuk az eredményeket. A két csoport között lényeges különbséget találtunk a CD24 expressziójában és a FIGO-besorolással is összefüggés mutatkozott.

2. táblázat. A CD24-expresszió meghatározása petefészekrákos betegek és nem-ovárium tumoros nők mintáiban

	Nem-ovárium tumoros nők	Petefészekrákos betegek			
		FIGO I-IV	FIGOI	FIGOIII	FIGOIV
mintaszám	6	22	3	13	4
ΔCt	$1,10 \pm 2,62$	$36,58 \pm 75,08$	$4,74 \pm 8,13$	$31,48 \pm 73,88$	$91,10 \pm 109,31$
szignifikanciaszint (p)	0,038		0,522	0,164	0,198

ΔCt : normalizált ciklus küszöbérték (génexpresszió meghatározása)



2. ábra. A CD24 mikroRNS hálózat

A miRDIP tool segítségével a CD24-miRNA-hálózatból elkészített, NAVIGATOR-programmal szerkesztett ábra. A kékkal jelölt miRNA tekinthető a legspecifikusabb szabályozó elemnek

Davidson és munkatársai a CD24-et specifikus markernek találták a petefészek szerózus karcinóma és a malignus peritoneális mesothelioma differenciáldiagnózisában [15], majd későbbi munkájukban a petefészekrákos és a mellrákos betegek szöveti mintáiban, a petefészekrák esetében érzékeny és specifikus markerként sorolták be [16].

Zeng és munkatársai 97 petefészekrákos beteg mintáit tanulmányozva összefüggést találtak a CD24 expressziója, a klinikai stádiuma és a patológiai besorolása között [17]. A benignus tumorok 25%-a, a malignáns tumorok 81,25%-a bizonyult CD24-pozitívna a munkájuk során.

Nakamura és munkatársai [14] közel 200 beteg mintáit vizsgálva, a mi eredményeinkhez hasonlóan 71,1%-ban mutattak ki CD24-expressziót és független túlélést előrejelző molekulának írták le. Nekünk erre vonatkozóan még nincsenek adataink.

Fontos a génexpressziós vizsgálatok mellett a szabályozó RNS-molekulák és a fehérje-fehérje kölcsönhatások vizsgálata is. Ezért hálózati analízist is végeztünk. A fehérje-fehérje kölcsönhatásokat vizsgálva a LYN, a SELP, a FGR és a NPM1 molekulákkal lép kölcsönhatásba a CD24.

A LYN az Src fehérje család tagja, tirozin-kinázok közé tartozik a sejtek aktiválásában tölt be kulcsszerepet [18].

A SELP, inkább P-szelektin nevén ismert, a sejtek adhézióját szabályozza, az erek belső felszínén helyezkedik el, inak-

tív állapotban Weibel-Palade-testek formájában tárolódik. Zazlawski és munkatársai [19] petefészekrákos betegek kezelésében emelték ki ennek a fehérjének a jelentőségét terápiai szempontból, a ciklooxygenáz-2 expressziójával együtt tanulmányozták.

Az FGR szintén az Scr fehérje család tagja, a kinázok közé tartozik. A sejtek adhéziójának és migrációjának szabályozásában vesz részt. A petefészekrák kezelésében való fontosságát mutatja, hogy egy új készítménnyel az FGR-t vették célba. Jelenleg a klinikai kipróbálás III. fázisában van, ez a Nintedanib nevű készítmény kipróbálása, amely egy orális tirozin-kináz-inhibitor, célmolekulája a VEGF-receptor 1-3, a FGFR 1-3 a PDGFR α és β [20].

Az NPM1 a nukleorális ribonukleoproteinnel kapcsolódik össze, a szimpla, vagy dupla szálú DNS-sel is kapcsolatba tud lépni, előnyben részesíti a G-quadruplex formátumot felvevő nukleinsavakat. A riboszómák biogenezisében is szerepet játszik. Az NPM1 jelentőségét Londero és munkatársai [21] is megfigyelték petefészekrákban, az expressziója összefüggést mutatott a rövidebb túléléssel és a prognózissal.

A hálózatkutató eredményeink megerősítik, hogy a CD24-gyel kapcsolatban lévő fehérjék fontos szerepet játszanak a tumorok kialakulásában, a prognózis meghatározásában.

A mikroRNS-ek közül a has-miR34a-5p és a has-miR-373-3p mutat legszorosabb kapcsolatot a CD24-génnel. Az érett miR-34a-5p a p53 tumorsuppresszor network tagja, így fontos szerepe van különböző tumorok kifejlődésében (www.mirbase.com).

A miR-373-3p az irodalmi adatok szerint a sejtek proliferációjában, az apoptózisban, a sejtek migrációjában, adhéziójában, és a DNS-sérülések kijavításában játszik szerepet. Onkogén és tumorsuppresszor funkciója is van [22].

A mirbase adatok olyan szabályozó mikroRNS-kapcsolatokat mutattak ki, amelyek lényeges szerepet töltenek be a tumorok kialakulásában, ezek további vizsgálata és meghatározása segítheti az új biomarkerek bevezetését és a kezelések monitorizálását.

Mind a hálózatkutatósi, mind a molekuláris genetikai adatok is megerősítik a CD24-expresszió meghatározásának jelentőségét petefészekrákos betegek esetén. Olyan fehérjékkel és szabályozó mikroRNS-molekulákkal van kapcsolatban, amelyek a CD24 fontosságát mutatják a tumorigenezisben. Független rizikófaktorként való bevezetése további vizsgálatokat igényel.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnénk megköszönni Szilágyi Edina segítségét a kísérletes munkánk során.

A szerzőknek nincsenek érdekeltségeik.

IRODALOM

1. Pearce IE, Ammerlaan AW, Opstelten D. Characterization of rat HSA/CD24 protein bearing the B lineage-restricted epitope recognized by MA5 HIS50. *Hybridoma* 1996; 15: 33–42.
2. Rougon G, Alterman AL, Dennis K, et al. The murine heat-stable antigen: a differentiation antigen expressed in both the hemolymphoid and neural cell lineages. *Eur J Immunol* 1991; 21: 1397–1402.
3. Fang X, Zheng P, Tang J, Liu Y. CD24: from A to Z. *Cell Mol Immunol* 2010; 7: 100–103.
4. Garson K, Vanderhyden BC. Epithelial ovarian cancer stem cells: underlying complexity of single paradigm. *Reproduction* 2015; 149: R59–70.
5. Choi YL, Kim SH, Shin YK, et al. Cytoplasmic CD24 expression in advanced ovarian serous borderline tumors. *Gynecol Oncol* 2005; 97: 379–386.
6. Kristiansen G, Pilarsky C, Pervan J, et al. CD24 expression is a significant predictor of PSA relapse and poor prognosis in low grade or organ confined prostate cancer. *The Prostate* 2004; 58: 183–192.
7. Schostak M, Krause H, Miller K, et al. Quantitative real-time RT-PCR of CD24 mRNA in the detection of prostate cancer. *BMC Urol* 2006; 6: 7.
8. Nagy B, Szendrői A, Papp Z, Romics I. CD24 mRNS expresszió meghatározása kvantitatív real-time PCR módszerrel tübiopsziával nyert prosztata mintákból. *URO- Onkológia* 2006; III: 51–54.
9. Nagy B, Szendrői A, Romics I. Overexpression of CD24, c-myc and phospholipase 2A in prostate cancer tissue samples obtained by needle biopsy. *Pathol Oncol Res* 2009; 15: 279–83.
10. Zhu J, Zhang G, Lu H. CD24, COX-2, and p53 in epithelial ovarian cancer and its clinical significance. *Frontiers in Bioscience* 2012; E4: 2645–2651.
11. Lee JH, Kim SH, Lee ES, et al. CD24 overexpression in cancer development and progression: a meta-analysis. *Oncol Rep* 2009; 22: 1149–1156.
12. Klemba A, Purzycka-Olewiczka JK, Wcislo G, et al. Surface markers of cancer stem-like cells of ovarian cancer and their clinical relevance. *Contemp Oncol (Pozn)* 2018; 22: 48–55.
13. Ozols RF. Treatment goals in ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2005; 15: 3–11.
14. Nakamura K, Terai Y, Tanabe A, et al. CD24 expression is a marker for predicting clinical outcome and regulate the epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer via both the Akt and ERK pathways. *Oncol Reports* 2017; 37: 3189–3200.
15. Davidson B, Zhang Z, Kleinberg L, et al. Gene expression signatures differentiate ovarian/peritoneal serous carcinoma from diffuse malignant peritoneal mesothelioma. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5944–5950.
16. Davidson B. CD24 is a highly useful in differentiating high-grade serous carcinoma from benign and malignant mesothelial cells. *Human Pathology* 2016; 58: 123–127.
17. Zeng C, Chen T, Zhang Y, Chen Q. Hedgehog signaling pathway regulates ovarian cancer invasion and migration via adhesion molecule CD24. *J Cancer* 2017; 8: 786–792.
18. Marech I, Patruno R, Zizzo N, Gadaleta C, Introna M, Zito AF, Gadaleta CD, Ranieri G. Masitinib (AB1010), from canine tumor model to human clinical development: where we are? *Crit Rev Oncol Hematol* 2014; 91: 98–111.
19. Zaslowski R, Surowiak P, Zabel M. Classical and novel molecular prognostic factors in ovarian cancers. *Pol Merkur Lekarski* 2005; 19: 823–827.
20. Khaliq S, Banerjee S. Nintedanib in ovarian cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 2017; 26: 1073–1081.
21. Londero AP, Orsaria M, Tell G, Marzinotto S, Capodicasa V, Poletto M, Vascotto C, Sacco C, Mariuzzi L. Expression and prognostic significance of APE1/Ref-1 and NPM1 proteins in high-grade ovarian serous cancer. *Am J Clin Pathol* 2014; 141: 404–414.
22. Wei F, Cao C, Xu X, Wang J. Diverse functions of miR-373 in cancer. *J Transl Med.* 2015; 13: 162.