

## BESZÁMOLÓ ZÁRÓJELENTÉS

Az OTKA által támogatott, **67955.** azonosító számú

### **"Onkogenomikai kutatás melanómában génextpresszió és a nem kódoló microRNS profil meghatározása alapján"**

című kutatásról

Témavezető: Dr. Falus András

**A kutatás lényege:** MikroRNS expresszió vizsgálata melanoma és egészséges megfelelőjüket reprezentáló melanocytá sejtek összehasonlításával

**A kutatás célja:** a melanoma komplex keletkezési és fennmaradási mechanizmusában a miRNS profil felvételével új, melanómában eddig még nem leírt, a normáltól eltérő expresszió -szabályozás keresése, amely a daganat biológiai viselkedésének hátterében állhat genetikai és epigenetikai tényezőként. A talált miRNS-ek génteráóias felhasználásának előkísérlete

### **Bevezetés**

#### **Melanoma malignum**

A melanoma az egyik leginkább agresszív emberi daganattípus. Az invazív növekedésre való hajlam, a terápiás rezisztencia, és a nem eléggé megbízható prognosztikai markerek miatt számos génextpressziós profilozási kísérletet hívott életre az irodalom tanúsága szerint. Sem a malignus transzformáció, sem metasztatizáló képesség megszerzésének teljes molekuláris folyamata nem ismert részleteiben.

A melanóma vagy *melanoma malignum* a bőr pigmenttermelő sejtjeiből (*melanocytá*) kiinduló rosszindulatú tumor. Az utóbbi évtizedekben a *melanoma incidenciája* rohamos növekedést mutatott, 1980 óta világszerte megháromszorozódott, Magyarországon is az növekszik az előfordulása. A súlyos lefolyású daganat kialakulhat már meglévő anyajegyből (az esetek 30%) különösen akkor, ha az állandó károsító ingernek van kitéve (erős UV sugárzás, kémiai és mechanikai ártalom), de megjelenhet anyajegy mentes

bőrfelületen is. Az elsődleges daganatok a bőrben található, fekete-barna pigmentet termelő sejtekből, a melanocitákból fejlődhetnek ki.

A melanoma kezelése a korai időszakban főként a sebészeti eltávolítást jelenti. Ez sok esetben teljes gyógyuláshoz vezet: ha a tumor még nem terjedt át a környezetében lévő nyirokcsomókra, akkor igen jók a beteg gyógyulási esélyei (95%-os túlélési arány 5 évvel a diagnózis után). A távoli szervekbe adott áttétek esetén azonban már jóval alacsonyabbak a betegek túlélési esélyei.

### Mikro RNS

Az elmúlt néhány évben derült fény arra, hogy hírvivő RNS-nél (mRNS) jóval kisebb RNS darabok is keletkeznek, egyrészt a kivágódó szakaszokból, másrészt a gének közötti, ez idáig hasztalannak vélt területekről átíródva. Ezek az átíródó kisebb méretű, mikroRNS-ek szintén kijutnak a sejtmagból, és a megfelelő mRNS-hez kapcsolódva, gátolják azok fehérjévé történő lefordítását (1. ábra). Az, hogy egy mikroRNS melyik fehérje kifejeződését gátolja, attól függ, hogy a bázissorrendje melyik mRNS-ének megfelelő, azzal komplementer. Mivel a kapcsolódó rész rövid, és sok olyan mRNS van, ami tartalmazza az ennek megfeleltethető szakaszt, a mikroRNS-ek egyszerre több fehérje kifejeződését is tudják befolyásolni, a sejt igényeinek megfelelően összehangolva annak működését. Így, az egyes mikroRNS-ek sejten belüli mennyisége információt adhat a sejten belül zajló folyamatokról is. Például, az oxigénhiánynak, a bőrsejteknek, a daganatsejteknek, az adaptív immunválasz szabályozásának is megismerték már a jellemző mikroRNS-mintázatát (6).

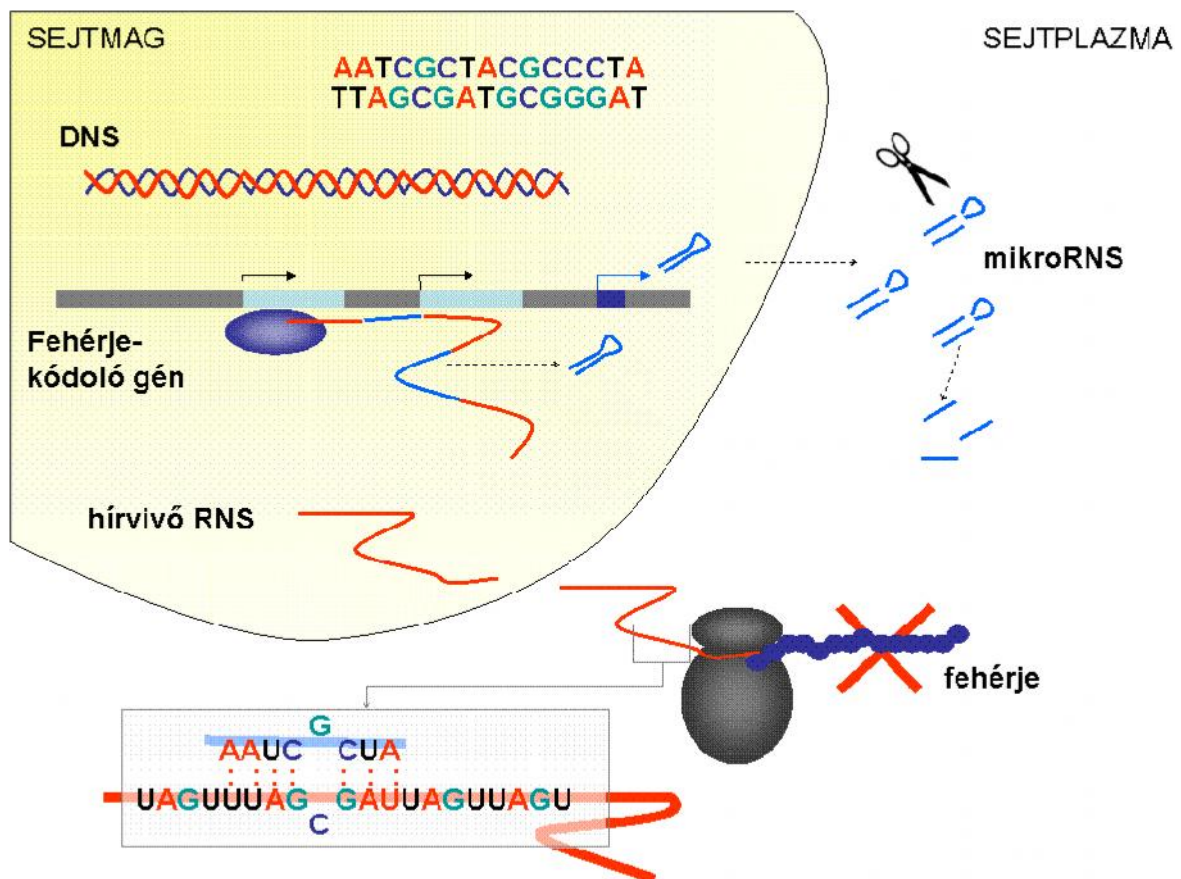
Szemléletformáló az az evolúciós szempontból is izgalmas eredmény, miszerint, nemcsak egy miRNS kapcsolódhat sokféle mRNS-hez, de az mRNS-ek 3' részén akár 5-10 miRNS is "elfér" és a hatások szinergizálnak. Mivel pl. a p53 mRNS esetében is ez a helyzet, a mai onkobiológia egyik nagy "puzzle-je" éppen ennek a komplex szabályozásnak a feltárása.

Az informatikai megközelítés jelenlegi akadályja, hogy még nem rendelkezünk kellő számú adattal a mikroRNS-target kölcsönhatás következményének időbeli jellegzetességeiről.

Ez az újonnan felismert szabályozási szint teljesen új távlatokat nyithat meg az orvostudományban, ezen belül az immunológiában is, ahol az immunsejtek elképesztően összerendezett működéséhez elengedhetetlen az igényeknek megfelelő fehérjék szinkronizált előállításának. Jelenleg a mikroRNS-ek sejten belül betöltött szerepe, illetve a megfelelő mRNS targetek számítógépes predikciója a megismerés fázisában van. Ugyanakkor fontos megjegyezni, hogy a technológia mára már többé-kevésbé adott a

megfelelő mikroRNS-ek sejten belüli mennyiségének mesterséges szabályozására, amely egy teljesen új fejezetét jelentheti a genetikai ismereteken nyugvó terápiának. Szoros kapcsolatban van a miRNS-ekről szóló tudásunk növekedése a génterápiában sikeres géncsendesítés technika (siRNS) alkalmazásával.

### 1. ábra A mikro RNS keletkezése és működése



## Melanoma „microenvironment”, a hízósejtek szerepe a tumor működésében

Régóta tudott, hogy egyes tumorok közvetlen közelében jelentős hízósejt szaporulat figyelhető meg. Több korábbi munkánk igazolta, hogy a hisztamin fokozza a tumor növekedést melanomában (2, 3). Ennek egy közvetlen és egy közvetett hatásmechanizmusát is leírtuk.

--- Közvetlen hatás:

Maga a melanoma szövet jelentős HDC expressziót, tehát hisztamin termelést mutat. Az autokrin és parakrin hatású hisztamin-receptorfüggően- szabályozza a melanoma növekedést. Több közleményben számoltunk be a HDC szenz konstrukcióval transzfektált egér melanoma vonal nagyon jelentős tumorfokozó hatásáról in vivo, a megfelelő kontrollokkal szemben. Kiderült, hogy a hisztamin gátolja a tumorgátló TGF $\beta$  termelődését az IGFR2 blokkolásán át, továbbá, ettől függetlenül az anti-angiogenetikus fibulin-5 kifejeződésének gátlásán át (1, 5).

--- Közvetett hatás:

A hisztamin eltolja a környéki T sejtek polarizációját Th2 irányba, ezáltal is gyengítve az immunrendszer tumorelles hatását.

## Az irodalomban található miRNS-sel kapcsolatos eredmények melanomában

Az irodalomban fellelhető génexpressziós vizsgálatokat jellemzően in vitro rendszerekben készítették (sejtvonal vagy szövetből kultúrába vitt primer sejttenyészet). A valódi szövetekből készült melanoma mintákat általában lézer-disszekcióval nyerték vagy nagyobb mintaszámmal dolgoztak. Kisebb mintaszám esetén megalapozott kérdésfeltevéssel, molekuláris megalapozottságú, fenotípusában és viselkedésében eltérő daganatokat hasonlítottak össze. Ezek között megjelentek a melanoma miRNS-expresszióját feltérképezését célzó kezdeti vizsgálatok is.

A elsődlegesen a melanoma vizsgálatát célzó eddigi miRNS vizsgálatokat az 1. táblázatban soroljuk fel:

## 1. táblázat

- 1: Worley LA, Long MD, Onken MD, Harbour JW.  
Micro-RNAs associated with metastasis in uveal melanoma identified by multiplexed microarray profiling.  
Melanoma Res. 2008 Jun;18(3):184-90.  
PMID: 18477892 [PubMed - in process]
- 2: Felicetti F, Errico MC, Bottero L, Segnalini P, Stoppacciaro A, Biffoni M, Felli N, Mattia G, Petrini M, Colombo MP, Peschle C, Carè A.  
The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms.  
Cancer Res. 2008 Apr 15;68(8):2745-54.  
PMID: 18417445 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 3: Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M.  
MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth.  
Cell Res. 2008 May;18(5):549-57.  
PMID: 18379589 [PubMed - in process]
- 4: Bemis LT, Chen R, Amato CM, Classen EH, Robinson SE, Coffey DG, Erickson PF, Shellman YG, Robinson WA.  
MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines.  
Cancer Res. 2008 Mar 1;68(5):1362-8.  
PMID: 18316599 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- Melanoma-mintát is felhasználó tanulmányok:
- 1: Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA.  
Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines.  
Cancer Res. 2007 Mar 15;67(6):2456-68.  
PMID: 17363563 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- 2: Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G.  
microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 13;103(24):9136-41. Epub 2006 Jun 5.  
PMID: 16754881 [PubMed - indexed for MEDLINE]

### **A pályázatban foglalt kutatás célja:**

A melanoma komplex keletkezési és fennmaradási mechanizmusában a miRNS profil felvételével új, melanomában eddig még nem leírt, a normáltól eltérő expresszió vagy szabályozás keresése, amely a daganat biológiai viselkedésének hátterében állhat genetikai és epigenetikai tényezőként. Egy génterápiás megközelítés (siRNS) előkísérlete.

### **Módszerek**

Klinikai minták gyűjtésének szempontjai

1. Kiindulási anyagként hozzáférhető szövettani blokkokat vagy teljes fagyasztott szövetet használtunk. A betegek teljes demográfiai/klinikai dokumentációja mellett a túlélési adatok is rendelkezésre álltak. A szükséges mintamennyiséget úgy választottuk meg (ha erre lehetőség volt a patológiai dg. veszélyeztetése nélkül), hogy a microarrayre felkerülő mintákon túl maradjon az adatok validálásra is. Tapasztalataink szerint a feltehetően klinikailag és minőségileg is rendkívül heterogén mintagyűjteményből a homogén, egymástól a lehető legjobban eltérő csoportok képzése érdekében (amely különbség hátterében várhatóan molekuláris eltérés sejthető) is legalább ötszörösen túl kellett volna tervezni a mintaszámot. Mindez felhívja a figyelmet a jól dokumentált melanoma biobankok hatalmas jelentőségére. A mennyiségi kérdések mellett lényeges volt a minták minősége is. A későbbiekben, a primer melanoma szöveti sejtek közvetlen vizsgálatára a laser-diszekciós eljárást kell alkalmazni, de az aktuális stroma- illetve a limfoid infiltráció jellemzésére maradna a teljes szövetminta analízise. Eredeti terveinkkel ellentétben végül is nem vettük igénybe nemzetközi biobankok szolgáltatásait. Ennek oka elsősorban az eltérő diagnosztikai rendszerek nem szerencsés összeméréséből származó hibák elkerülésének szándéka volt.

Lehetséges mintacsoportok

- egészséges melanocytá vs. primer melanoma
- Primer vs. metasztatikus melanoma (utóbbi: már metasztázist adott vagy maga a metasztázis, ez esetben laser-disszekcióval el kellene választani a környező szövetből, esetleg bőrmetasztázis esetén izolálható). Erre sajnos technikai és szervezési okokból a pályázat időtartama alatt sajnos nem kerülhetett sor. Most folytatott kutatásunkban már laser-disszekciót alkalmazunk.
- Lokális recidíva vs. primer daganat (ez feltételezi a jól konzervált eltávolított primer léziót)

- Benignus lézió (különböző naevusok) vs. melanoma => itt mint nem malignusan viselkedő tumorok
- Precancerosus lézió (lentigo maligna)

Alkalmazott további módszerek

(rutin immunológiai molekuláris technikák, részletek a közleményekben)

Sejt- és szövettenyésztés

Csontvelő eredetű eger és emberi hízósejtek in vitro differenciáltatása

Citofluorimetria

Microarray (Agilent rendszer)

RNS izolálás, QC, reverz transzkripció, valós idejű PCR

Luciferase assay, transzfekció

Western (immuno)blot

Citokin profil megállapítása ELISA technikával

Informatikai eljárás a miRNS mRNS target predikciójához

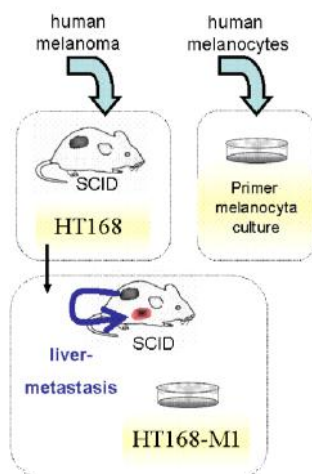
## **Eredmények (1.-5.)**

### **1. Melanomavonalak és melanociták miRNS mintázata**

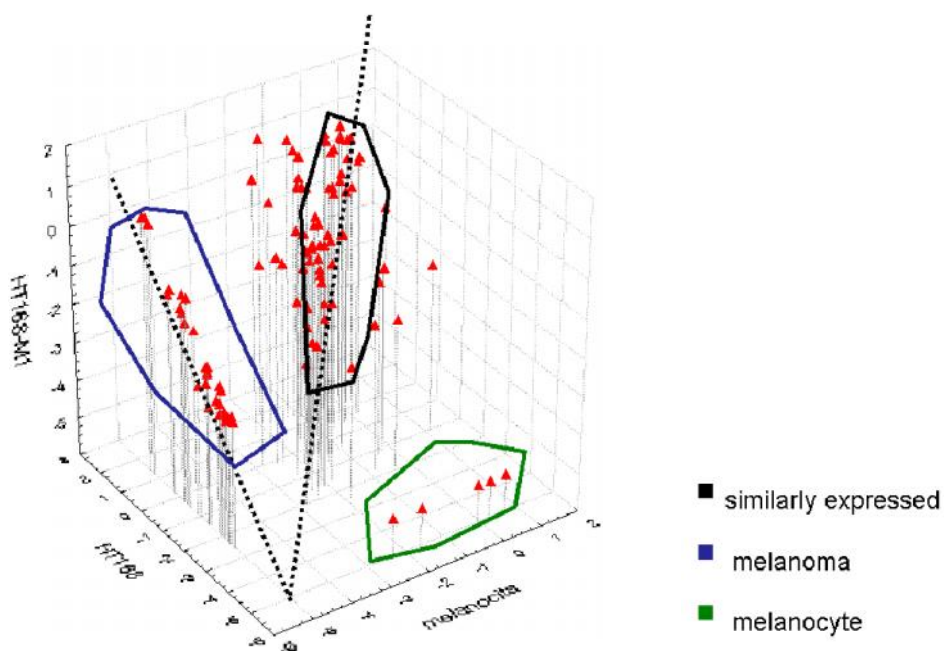
A melanomára jellemző miRNS expressziós mintázat felvételét elsőként két melanoma sejtvonal, illetve két melanocytakultúra (159 miRNS mérésére alkalmas primerkészlet felhasználásával) végeztük el. A kísérletek során minden vizsgált mintában hasonlóan expresszálódó, illetve csak az egészséges, illetve daganatos mintákban mérhető expresszióval jellemezhető miRNS-eket azonosítottunk. Ezek együttesen viszont

jelentősen eltértek a kontroll (egészséges) bőrből származó miRNS mintázattól (2. 3. ábra)

2. ábra A melanoma- és melanocita minták forrása



3. ábra Az expressziós mintázatok melanoma sejtvonalban és melanocitákban





## 2. A miRNS-21 mRNS targetjei

A melanoma sejtvonalak és az egészséges kontrollt reprezentáló melanocita kultúrák alkotta csoportok expressziós értékeinek ismeretében megkíséreltünk egy, a csoportok között jelentős mértékben eltérő miRNS, a miR-21 targetjei közül egyes kiválasztottakat felderíteni. A választás azért esett éppen erre a miRNS-re, mert az irodalom szerint a miR-21 különböző daganattípusokban is következetesen a daganatsejtek javára változott az egészségesekkel szemben, jelezve, hogy általános, a daganatos fenotípussal összefüggő sejtfolyamatokban (mint a sejtosztódás, sejthalál) játszhat szerepet.

A validálásra szánt targetek kiválasztásában szerepet játszott, hogy legalább két target predikciós algoritmus által magasfokon valószínűsített, illetve a vizsgált daganat szempontjából az irodalom szerint releváns legyen. Az Applied Biosystems/Ambion Anti-miR és Pre-miR transzfektáló rendszereinek segítségével kezeltük a HT168-vonalat.

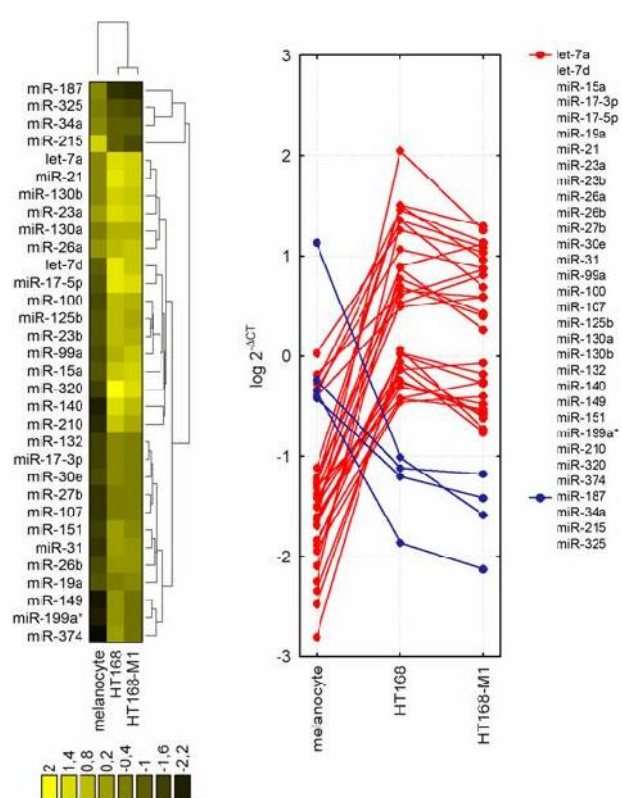
A targetek változását RNS szinten real-time RT-PCR-rel, fehérje szinten Western blottal vizsgáltuk. A Bcl2 megbízhatóan nem detektálhatóan alacsony mértékű expressziót mutatott a vizsgált sejtvonalban. A TPM1 esetében kis mértékű, nem következetes különbséget kaptunk. A PLAG1 esetében többszöri próbálkozásra sem sikerült megfelelően specifikus ellenanyag-reaktivitást kimutatni.

A miR-21 expressziójának módosítását célzó transzfekciós kísérletek során, a kezelt sejtekben sem jelentős proliferációs különbséget (MTT), sem citosztatikus kezeléssel indukálható, megváltozott apoptóziskészséget (CaspACE Assay, Promega) kimutatni nem sikerült.

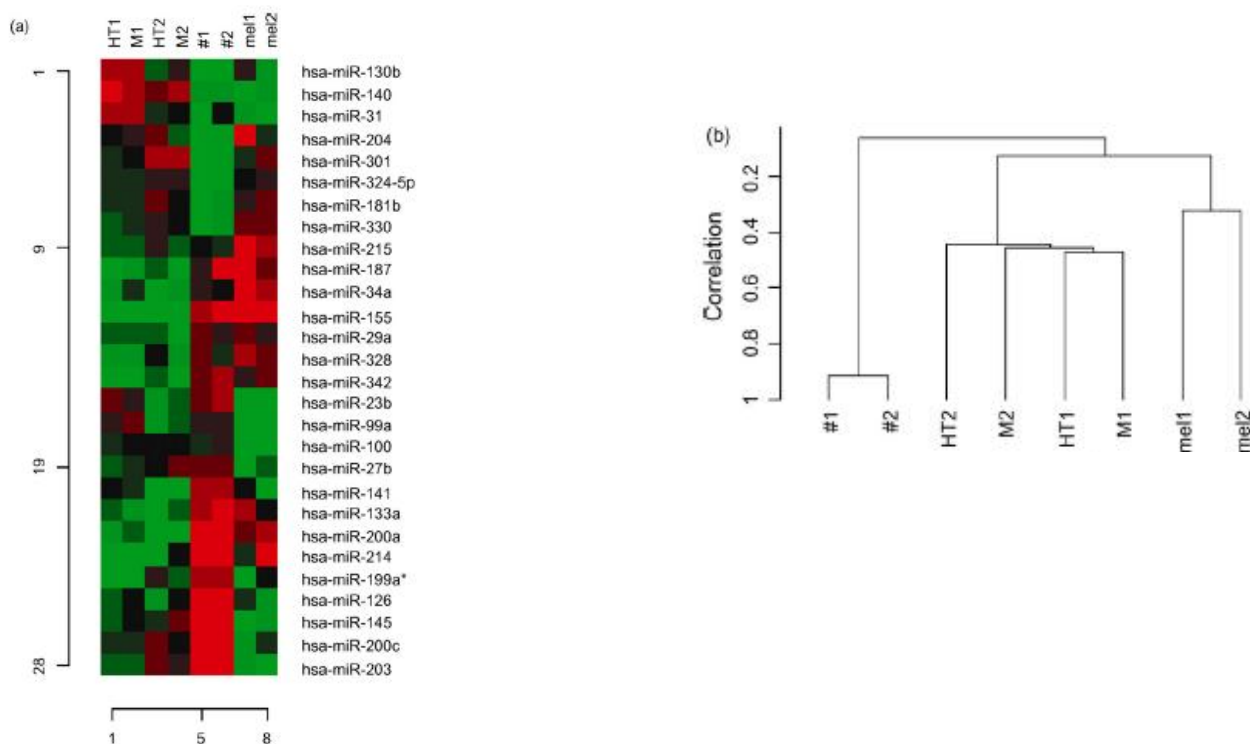
## 3. Melanoma sejtvonalak és klinikai melanoma szövetminták miRNS vizsgálatai

Ezt követően a vizsgálatba bevontunk klinikai melanoma szövetmintákat is. A HT168, HT168-M1 sejtvonalak (HT1, HT2, M1, M2), melanocytakultúrák (mel1 és mel2) és klinikai melanoma szövetminták (#1, #2) között különbözőképpen expresszálódó mikroRNS-eket tartalmazó listát hoztunk létre (4., 5. ábra). A relatív expressziós értékek real-time RT-PCR módszerrel,  $2^{-\Delta CT}$  metódus alkalmazásával, két háztartási génre, az RNU6b és RNU43 snoRNS génekre normalizálva kerültek kiszámításra.

## 4. ábra A melanomavonalakban és a melanocitákban talált miRNS-ek



5.ábra A melanomavonalakban és a melanocitákban talált miRNS-ek kifejeződése (a) és a közöttük talált korrelációk (b)



A klinikai minták olyan miRNS-ek expressziójával jellemezhetők, amelyek jóval alacsonyabb szinten detektálhatók az *in vitro* csoportokban. Ez egyrészt a klinikai minta “teljes szövet” jellegéből adódódik, azaz, hogy a daganatsejteken kívül stromális elemeket (endotelsejtek, gyulladásosejtek stb.) is tartalmaz, másrészt a daganatsejtek maguk is mentesek a sejtvonalak és melanocytakultúrák esetében jelentkező, az *in vitro*, mesterséges körülmények közötti fenntartásból adódó torzulásoktól.

#### 4. Target predikciós algoritmusok használata, útvonalanalízis

Eredeti célkitűzésünk alap gondolata az volt, hogy a melanocyták daganatsejttekké, melanomává való átalakulása, illetve az ennek háttérében álló fenotípusos változás háttérében álló eltérő expressziós mintázat nemcsak a mRNS-pool összetételében, hanem az azok mennyiségi szabályozásában szerepet játszó mikroRNS-ek mennyiségi-minőségi változásában is tetten érhető. Informatikai megközelítés nélkül —tekintettel a valószínű partnerek számára és a kapcsolat jellegére— az ok-okozati viszonyok felderítése elképzelhetetlennek tűnik a szabályozó miRNS-ek és az általuk szabályozott target mRNS-ek között.

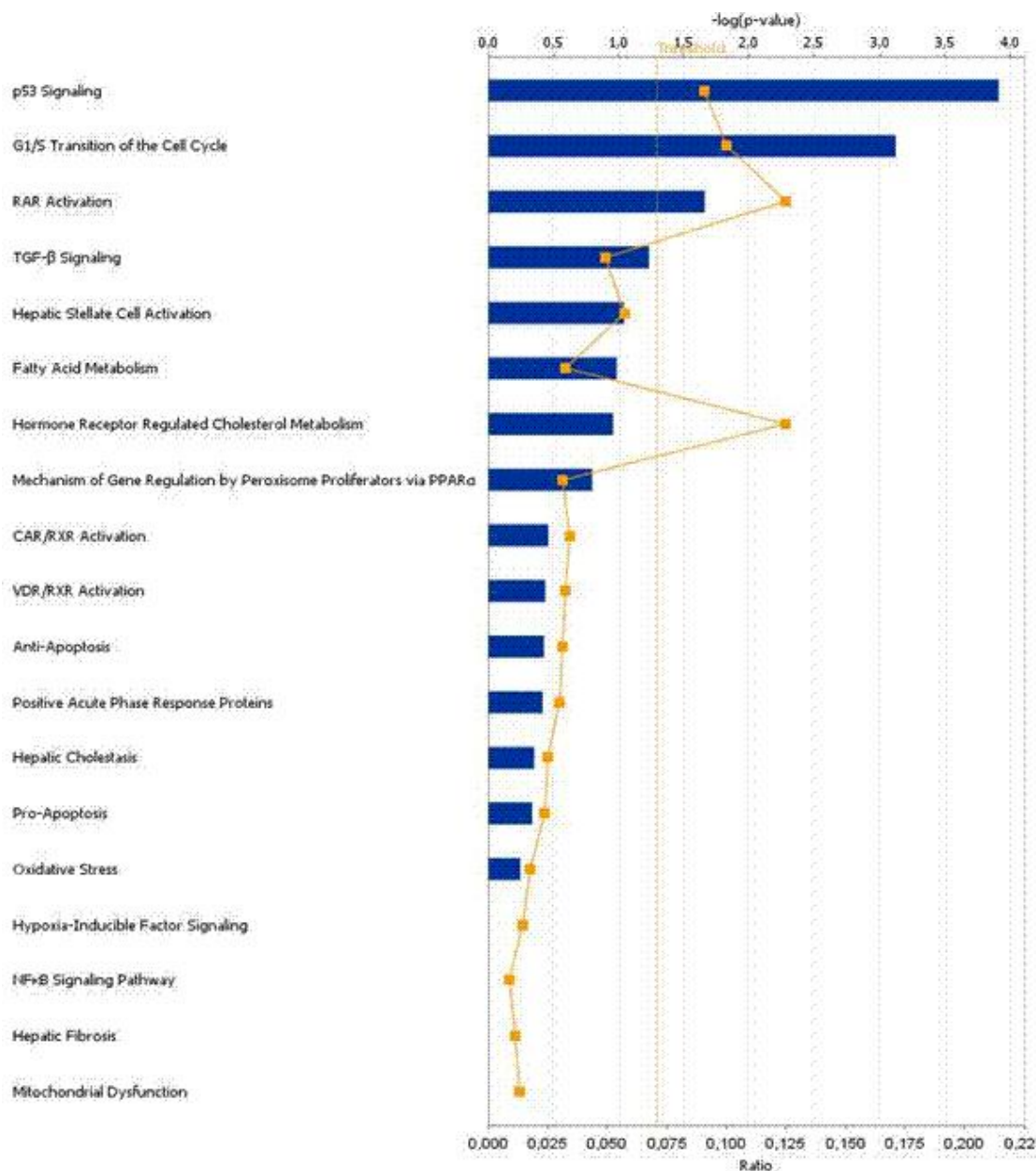
Mivel ebben a kapcsolatban RNS-RNS kölcsönhatásról van szó, amelynek szabályait elsősorban a kapcsolódó egyszálú partnerek báziskomplementaritása határozza meg, számítógép

segítségével is, elfogadható hibával megbecsülhető az adott (ez esetben a melanomára, vagy annak progressziós állapotára jellemző változást mutató) mikroRNS-hez tartozó targetek listája. Több, ingyenesen online hozzáférhető, kisebb nagyobb eredménylistát megadó algoritmus (target predikciós algoritmusok, pl. PicTar, TargetScanS, MirBase stb.) áll rendelkezésre, amelyek összefésülésével (keresztannotációval megadható az eredményhalmazok metszete) nemcsak a robusztusságuk növelhető, hanem a cél-mRNS-ek funkcionális annotációjára is lehetőség nyílik. (A kettő vagy három felhasznált adatbázisban is szereplő targetekhez jellemzően magas score (a kölcsönhatás validitásával arányos valószínűségi érték) tartozik. Érdekes, hogy egy adott jelátviteli úthoz, vagy sejtfolyamathoz tartozó több elem is gyakran targetált egyazon mikroRNS által.)

A PicTar target predikciós program használatával megadhatóak egy kiválasztott mikroRNS, a miR-34a valószínűsített célpontjai. A cél-mRNS és az adott mikroRNS közötti kölcsönhatás valószínűségét a program egy score-értékkal jellemzi, amely felhasználható az Ingenuity útvonal- analizáló szoftverbe való bevétel során. Az említett program segítségével meghatározható az adott mikroRNS által targetált mRNS-ek a különböző sejtfunkciókat jellemző listákban való relatív reprezentáltsága (6. ábra).

Mintegy 19 gén-set target közül a p53 útvonal génjei szerepeltek az első helyen.

6.ábra A miR-34a PicTar által valószínűsített mRNS-célpontjainak reprezentációja:



© 2000-2007 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Az említett algoritmusok segítségével felbecsülhető a mikroRNS-ek által szabályozott targetek különböző folyamatokra, sejtfunkciókra, sejtalkotókra vonatkozó reprezentációja, ami összevethető a melanómára jellemző, irodalomból ismertén változást mutató funkciókkal. Jóllehet osztódásra, illetve apoptózis készségre gyakorolt miRNS hatást nem sikerült kimutatni, más, nehezebben vizsgálható folyamat még bizonyíthatóan miRNS- szabályozás által érintett

lehet. Lehetőség szerint tovább bővíthető a lehetséges szűrők száma, így a miRNS-target közötti kapcsolatra a koexpresszió hiánya miatt esélytelen mRNS-ek kizárásával, továbbá a miRNS-sel ellentétesen változók bevonásával. Az informatikai megközelítés hátránya, hogy még nem kellő adattal rendelkezünk a mikroRNS-target kölcsönhatás következményének időbeli, vagy éppen sztöchiometriai szabályszerűségeiről, továbbá az átfedő kötőhelyekkel a kompetíció vagy a koreguláció felismert jelenségei átláthatatlanul bonyolulttá teszik az ok-okozati viszonyokat ebben a szabályozási formában.

Visszatérve a miR 34a-ra, legújabb eredményünk szerint nagy meglepetésünkre (egy idén-2011-felfrissített PcTar adatbázisban) a targetek között megtalálható a fibulin is, az a fehérje, amelyről korábban éppen a mi munkacsoportunk bizonyította angiogenesis gátló hatását saját in vivo egérmodellünkben. Jelenleg folyik az eredmény validálása két más, független eljárással. Ha sikerül megerősíteni az eredményt, akkor a miR34a hatása melanómában éppen az angiogenezist gátló fibulin gátlásán keresztül fokozza a melanoma terjedését. Távolilag ez potenciális gyógyszer-target lehetőségét vizionálja. Érdekes, hogy adrenocorticális tumorban (egy más kísérletsorozatban) is részben átfedő miRNS mintázatot tudtunk észlelni.

További fejlemény, hogy a korábban más munkánkban elasztin eredetű VGVAPG és VAPG peptidek hatását kezdtük analizálni a melanoma miRNS mintázatára. Ezek a peptidek fokozzák a melanoma invazivitását.

A kísérletes targetvalidálás esetében fókuszáltabb megközelítésre van szükség. A sejtekben lehetőség van egy adott miRNS mennyiségének mesterséges megváltoztatására, és ennek következményei közvetlenül a feltételezett cél-mRNS 3' nem transzlálódó régiójának luciferáz riportter konstrukcióba építésével igazolhatóak. Ennek beállítása és kandidáns targetek említett megközelítéssel történő keresése jelenleg is folyamatban van.

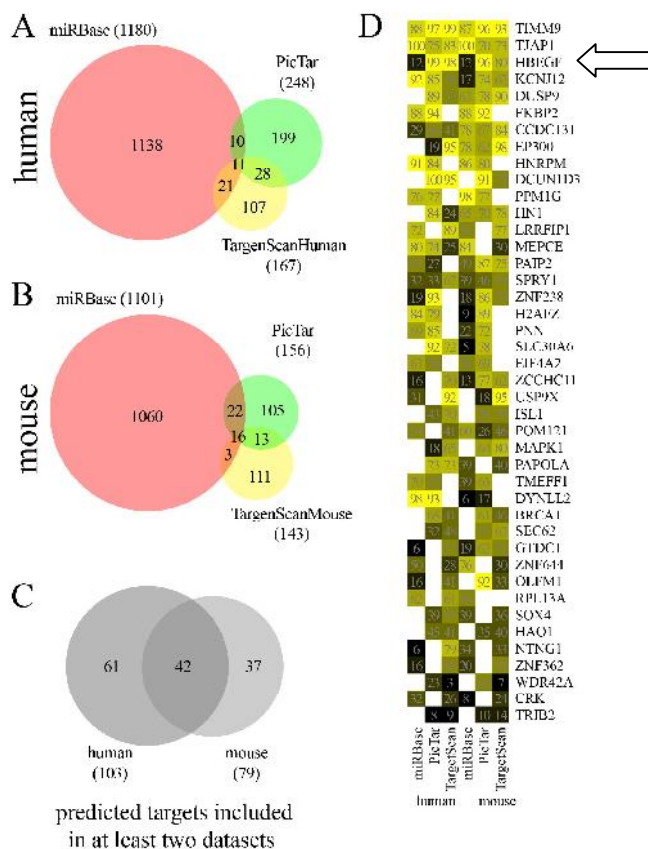
## **5. Melanoma-hízósejt kölcsönhatás, hízósejtek szerepe a tumor „microenvironment” – ben**

A hízósejtek aktivációja során felszabaduló bioaktív molekulák nemcsak a gyulladás effektor szakaszában, hanem az immunrendszer működésének, így az antitumor hatás szabályozásában is fontos szerepet játszanak, mindezek miatt eddig is széleskörű vizsgálatok történtek a hízósejtek aktivációjának gátlását/módosítását célzó új gyógyszer-célpontok felderítésére.

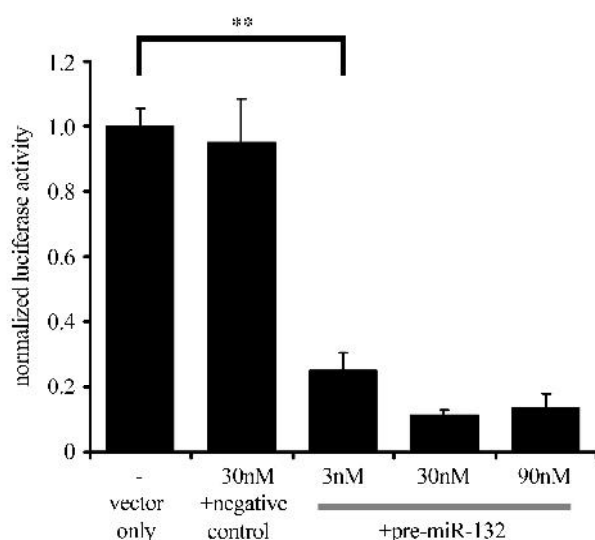
Az a tény, hogy a mikroRNS-ek mennyiségének mesterséges módosítására lehetőség van, és hogy egy adott mikroRNS mennyiségi változása több száz, adott esetben hasonló funkciójú fehérje aktuális sejtbeli mennyiségét meghatározhatja, felveti annak lehetőségét, hogy terápiás célpontokként tekintsük rájuk.

Saját munkánkban 567 miRNS felhasználásával az adatbázisokból kiválasztva (7. ábra) sikerült leírnunk ezek közül egy, a miRNS-132 közvetlen szabályozó hatását a heparin-kötő-epitheliális növekedési faktorra (HB-EGF), amely úgy tűnik a hízósejtaktiváció egyik legfontosabb tényezője emberben és egérben egyaránt. A pre miRNS 132-vel funkcionálisan is sikerült bizonyítani ezen miRNS gátló hatását (8. ábra), ami felveti a továbbiakban a miRNS-132 génterápiás alkalmazásának lehetőségét is.

7.ábra A miRNS-132 target predikciója emberi és egér miRNS adatbázisokban. A további kísérletekhez a nyíllal jelölt HB-EGF-t választottuk.



8.ábra. A pre miRNS 132 gátolja a HB-EGF aktivitást (luciferáz assay)



Bár nem miRNS eredmény és ezért nem is tartozik közvetlenül a most lezárt OTKA kutatáshoz, de a hisztamin-tumor kölcsönhatás teljességének megértéséhez hozzájárulnak legújabban a Nature Medicine-ben közzétett kollaborációs eredményeink is (8). A közvetett és közvetlen mechanizmus eredményeképpen a melanoma szempontjából a hisztamin serkentő hatású. A hatás szövetspecifitására utal, hogy egy más jellegű hatást irtunk le a hisztaminhiányos (hisztidin dekarboxiláz-HDC- knock-out) egerekben a vastagbél- és bőrtumorok vizsgálata kapcsán. Ezen tumoroknál hisztaminhiányában egy hisztaminfüggő, gátló hatású mieloid sejt éretlen változata dominál. Kiderült, hogy maga a tumor hipermetilálja (és ezzel gátolja) a hisztamin szintéziséért felelős enzim, a HDC aktivitását és így maga a tumor éri el az éretlen, tumornövekedés gátolni képtelen mieloid sejt populáció felszaporodását. A tumorok ez az epigenetikai szinten (metiláció) ható gátló hatása a hisztamin termelésére valószínűleg ugyancsak miRNS-ek részvételével zajlik le. Ennek a lehetőségnek a kutatása most kezdődött.

#### **A kutatás főbb eredményeinek értelmezése:**



Az aktuálisan genomszintű (GWAS), az idő szerint ismert és beállítottan mérhető miRNS régiók bevonásával miRNS mintázatok felvételét követően, tekintettel az alacsony esetszámra meglehetősen szigorú minőségkontrollt, majd klaszteranalízist kellett végeztünk. Különösen nehéznek bizonyult a megfelelő háztartási gén kiválasztása (RNU6b és RNU43 kombinált alkalmazása). Több tanulságos következtetést sikerült levonnunk a viszonylag alacsony csoportonkénti elemszám ellenére:

1. A klinikai minták esetében felmerült a nem-tumoros sejtekkel (stróma, limfoid sejtek, endotel) történő kontamináció lehetősége, ugyanakkor a klinikai szövetminták mintázatukat tekintve nagyobb hasonlósággal bírnak, az eltérő genetikai háttér ellenére, mint akár a sejtvonalak. Az utóbbiak azonos in vitro körülményei mellett különösen érdekes a fenti eredmény amellet, hogy ezen vonalak közül az egyik a másik in vivo metasztatizáló képességre szelektált derivátumának tekinthető. A későbbiekben, a primer melanoma szöveti sejtek közvetlen vizsgálatára a laser-diszekciós eljárást kell alkalmazni, de az aktuális stroma- illetve a limfoid infiltráció jellemzésére maradna a teljes szövetminta analízise.

2. A melanociták direkt módon sem vethetők össze ennek megfelelően a klinikai szövetmintákkal, ami a megfelelő kontroll választásának kérdését az irodalommal egybehangzóan nyitva hagyja. Egyébiránt ezek a primer kultúrák mutattak a legalacsonyabb fokú rokonságot, mintázatukat tekintve.

3. Sikerült mindazonáltal egy a csoportokat megkülönböztető, 28 miRNS-ből álló készletet azonosítanunk, néhány rokon genomi struktúrát mutató miRNS ezek között hasonló karakterisztikát mutatott (4).

4. A különböző expressziót mutató miRNS-ek listáját a bármely csoportra specifikusan, annak malignus státuszával vagy biológiai viselkedésével egyértelműen összefüggő marker(ek)re ezidejűleg még nem sikerült leszűkíteni. Ennek oka nem az, hogy nem lennének megfelelő miRNS markerek, ezek egy részét meg is találtuk, hanem az, hogy ezek komplexitása, mintázata jelenthet valós, hasznosítható diagnosztikai értéket(4).

5. A miRNS profilozási kísérletek kapcsán felmerült és az irodalomban más daganatok esetében is azonosított, a malignus viselkedéssel összefüggő expressziót mutató miR-21 mikroRNS-t mimikáló és antagónizáló (pre- és anti-miR-21) oligonukletidok bejuttatásával (mintegy génterápiás modellkísérlet) igyekeztünk felderíteni annak potenciális jelentőségét a melanoma esetében. Három, predikciós adatbázisokból kiválasztott, relevánsnak ígérkező célgén, a bcl-2, a plg2 és a tpm1 következményes változásait próbáltuk kimutatni, sajnos sikertelenül, aminek kettős okát gondoljuk.

A. Informatikai háttér. A háttérben részben a predikciós algoritmusok felhasználhatóságának aktuálisan csekély mértékben kidolgozott voltát feltételezzük, továbbá

azt, hogy egyetlen algoritmus kimenetét használva igyekeztünk az amúgy magas várható (2/3-ra becsült!) fals-pozitív találati arányok mellett használható miR-21 targetet azonosítani.

B. „multiple hit” háttér: A korlátozott hatás okát abban is feltételezzük, hogy a kétségkívül jelentős szerepű miRNS21 mellett, ezzel kombinációban, más miRNS-ekkel együtt lenne hatásos a sejtek kezelése. Ezek a kísérletek több tucat miRNS kombinációjával most folynak.

6. A felmerülő korlátok és buktatók felismerését követően, a miRNS-ek expressziós vizsgálata során megszerzett tapasztalatokat (4) igyekeztünk egy a számos kóreltani folyamatban, így a daganatok közvetlen gyulladáshoz központi szereppel bíró **hízósejtek** működését vizsgáló, in vitro differenciálódási és aktivációs modellben kamatoztatni. Félezernél több egér mikroRNS közül több oldalról is kimutattuk, hogy a hízósejt aktivációs funkcióiban kulcsszerepet játszó heparin-kötő epidermalis növekedési faktort (HB-EGF) a miRNS 132 targetálja (7). Ennek az eredménynek nagy jelentősége lehet a tumor-génterápia jövője szempontjából.

## **Konklúzió**

A kísérletes mRNS target validálás esetében fókuszáltabb (= prekonceptív) megközelítésre van szükség. A sejtekben lehetőség van egy adott mikroRNS mennyiségének mesterséges megváltoztatására, és ennek következményei közvetlenül a feltételezett cél-mRNS 3' nem transzlálódó régiójának luciferáz riportert konstrukcióba építésével igazolhatóak. Ennek beállítása és kandidáns targetek említett megközelítéssel történő keresése jelenleg is folyamatban van. Munkánkban felhasználjuk a korábban in vivo egérmodellre kidolgozott endogén hisztamintermelésében befolyásolt transzfektált egér melanoma mintákat is.

### **A kutatás témájában megjelent közlemények**

1. Pos Z. Safrany G. Muller K. Toth S. Falus A. Hegyesi H. Phenotypic profiling of engineered mouse melanomas with manipulated histamine production identifies histamine H2 receptor and rho-C as histamine-regulated melanoma progression markers. *Cancer Res.* 2005;65 :4458-66.
2. Wiener Z. Kohalmi B. Pocza P. Jeager J. Tolgyesi G. Toth S. Gorbe E. Papp Z. Falus A. TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells. *J Invest Dermatol.* 2006 Nov 9; 127(4):906-14.
3. Pocza P. Süli-Vargha H. Darvas Z. Falus A. Locally generated VGVAPG and VAPG elastin-derived peptides amplify melanoma invasion via the galectin-3 receptor. *Int J Cancer.* 2008 May 1; 122(9):1972-80.
4. Molnar V. Tamasi V. Bakos B. Wiener Z. Falus A. Changes in miRNA expression in solid tumors: An miRNA profiling in melanomas. *Semin Cancer Biol.* 2008 Apr. 18(2):111-22.
5. Pos Z. Wiener Z. Pocza P. Racz M. Toth S. Darvas Z. Molnar V. Hegyesi H. Falus A. Histamine suppresses fibulin-5 and insulin-like growth factor-II receptor expression in melanoma. *Cancer Res.* 2008 Mar 15;68(6):1997-2005
6. Falus A. Molnar V. Closer to the completed unity: Messenger and microRNA profiling *Semin Cancer Biol.* 2008; 18(2):77-8.
7. Molnár V, Ersek B, Wiener Z, Tömböl Z, Szabó PM, Igaz P, Falus A. MicroRNA-132 targets HB-EGF upon IgE-mediated activation in murine and human mast cells. *Cell Mol Life Sci.* 2011 Aug 19. [Epub ahead of print]
8. \*Yang XD, Ai W, Asfaha S, Bhagat G, Friedman RA, Jin G, Park H, Shykind B, Diacovo TG, Falus A, Wang TC. Histamine deficiency promotes inflammation-associated carcinogenesis through reduced myeloid maturation and accumulation of CD11b(+)Ly6G(+) immature myeloid cells. *Nat Med.* 2011 Jan;17(1):87-95

*\* Ez a közlemény csak közvetve kapcsolódik a beszámolóban érintett project témájához, csak a szövegben tett egyik megjegyzésünk (16. oldal alja) alátámasztására szolgál.*

