

1. év (2013.01.01.-2013.12.31.)

A micro-RNS-sel kapcsolatos kutatásomnak az első évben kettős célja volt, egyrészt megteremteni azt a biopsziás arzenált, amin majd az adott micro-RNS-eket vizsgáljuk (Crohn-betegek, colitis ulcerosások, eosinophil-allergiás colitisek, cöliákiasok és kontrollok). Másrészt beállítsuk az új metodikát, és biopsziás mintákon bizonyos konkrét micro-RNS-eket (micro-RNS/MiR 146a, -155) vizsgáltunk Real-time PCR technikával. Dr. Béres Nóra és Dr. Szabó Dolóresz segítségével a fenti 146a és 155 MiR expressziót a paraffinos és a fagyasztott mintákon is sikerült beállítani. 2013 év november-december közötti időszakában elindítottuk a cöliákias mintákon végzett MiRNA meghatározásokat, ami azért lesz nagyon érdekes, mert a Crohn-betegség és a cöliákia is Thelper1 mediált kórkép, de előbbiben az ok ismeretlen, utóbbiban pedig ismert (transzglutamináz modifikált glutén).

Kiemelésre érdemes, hogy 2013 októberében MTA doktori fokozatot szereztem.

Közleménystatisztika a 2013-ban publikált in extenso közlemények (absztrakt nélkül):

2013-ban publikált angol nyelvű közlemények: 12 darab, impakt faktor (IF): 38,97

OTKA támogatással készített angol nyelvű közlemény: 5 darab, IF: 13,27

OTKA támogatással készített magyar nyelvű közlemény: 2 darab

2. év (2014.01.01.-2014.12.31.)

Kutatási projektünk második évének lényegi célja az első évben beállított metodika (mikro-RNS real-time PCR) használata szélesebb körben, különböző gastrointesztinális kórképekben, illetve a metodikák kiterjesztése, új metodikák bevezetése (mRNS real-time PCR, immunhisztokémia, új-generációs szekvenálás, bioinformatikai analízis,

hálózatelemzés). Ebben a folyamatban két PhD hallgató és 2 TDK hallgató végzett méréseket. Az elmúlt év során számos, a további kísérleteinket előkészítő munkát zártunk le sikeresen:

- MiR-146a, -155 és -122 vizsgálata különböző betegcsoportokban makroszkóposan ép és kóros biopsziás minták vizsgálata Crohn-beteg (CD) gyermekekben frissen fagyasztott és formalinban fixált, paraffinba ágyazott minták összehasonlítása alsó és felső endoszkópiás biopsziák mikro-RNS profil vizsgálata Crohn-beteg és Colitis Ulcerosa gyermekek expresszió összehasonlítása.

A klinikánkon diagnosztizált Crohn-beteg gyermekeken kívül coeliákiás és eosinophil colitisben szenvedő betegeket is vizsgáltunk. Kutatásaink legfontosabb eredménye az volt, hogy igazoltuk a Crohn-beteg gyermekek paraffinba ágyazott és friss, fagyasztott colon mintáiban a miR-146a és miR-155 szignifikáns expresszióját a kontroll csoportéhoz képest. Kiemelésre érdemes az is, hogy a miR-146a és miR-155 szignifikánsan magasabb volt a Crohn-beteg gyermekek makroszkóposan gyulladt mukózájában - a makroszkóposan ép területhez viszonyítva. Ismert ezeknek a mikroRNS-eknek a gyulladásos folyamatokban, LPS- és TNF-útvonalban és az endotoxin-toleranciában betöltött szerepük. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy mindezek kifejezett szerepet játszanak a lokális gyulladásos folyamatok kialakításában. Ezen kívül a miR-122 expressziója szignifikánsan emelkedett a Crohn-beteg csoport makroszkóposan ép biopsziás mintáiban, a fagyasztott és paraffinba ágyazott mintákban egyaránt. A miR-122-nek ismert a szerepe a sejtkapcsoló struktúrák szabályozásában.

Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a gasztrointesztinális traktus különböző szakaszaira eltérő mikroRNS mintázat jellemző, továbbá az is ismert, hogy Crohn-betegségben gyakran találkozunk felső gasztrointesztinális manifesztációval. Az ESPHGAN ajánlása alapján Crohn-betegség gyanújában minden esetben javasolt a felső endoszkópia elvégzése. Mindezek miatt vizsgáltuk Crohn-beteg gyermekek felső endoszkópia során vett duodenum, makroszkóposan ép és kóros, illetve kontroll gyermekek paraffinba ágyazott biopsziás mintáit. A MiR-146a és -155 fokozott expresszióját igazoltuk a fekélyes, gyulladt duodenális mukózában is. MiR-122 esetén nem sikerült kimutatni hasonló emelkedést, ill. változást.

Cöliákiás gyermekekben a nemzetközi szakirodalomban felnőttekben már vizsgálat

mikroRNS-eket mértünk. A cöliákias gyermekek duodenalis fagyasztott mintáiban a felnőtteknél alul expresszáldó mir-192-3p magasabb expressziós értéket mutatott a kontroll csoporthoz képest. Ez arra utal, hogy a gyermekkori- és a felnőttkori cöliakia microRNS mintázata különbözik.

- In vitro modell beállítása: HT-29 sejtekben vizsgáltuk ezen mikro-RNS-ek vizsgálatát rekombináns TNF- α inkubálás hatására.

Munkacsoportunk ebben a 2. évben a molekuláris biológiai metodikák terén is jelentős előrelépést tett:

- Kiterjedtebb mikro-RNS mintázatot határoztunk meg új-generációs szekvenálást alkalmazva (Illumina platform, UD-Genomed), melynél Crohn-beteg gyermekek makroszkóposan ép és kóros, kontroll és a nemzetközi kutatásokban ritkaságnak számító allergiás colitist vizsgáltuk. Jelenleg ezeknek az adatoknak a bioinformatikai elemzését, továbbá a szekvenálással kapott eredmények validálását végezzük. Hálózatelemzéssel a kapott eredményeket KEGG adatbázis segítségével jelátviteli útvonalak szerint osztályozzuk, így az általunk vizsgált betegségekre specifikus útvonalakat szabályozó mikro-RNS-ek további vizsgálatát tervezzük génexpressziós és fehérjeszinten.

- Ebben az évben 4 mikro-RNS validálását végeztük el CD és colitis ulcerosus (UC) mintákban (miR-21, -221, -223, -142-3p), melyek kiegészítve az általunk korábban vizsgált mikro-RNS-ekkel a TNF- α és TGF- β jelátviteli útra illeszkednek. CD és UC mintákban megmértük ezek mRNS szintjét. Figyelembe véve az adatbázisokból már ismert direkt mikro-RNS és mRNS kapcsolatokat, tervezzük kifejezetten az általunk vizsgált betegcsoportokban mRNS és fehérjeszinten igazolni ezek jelenlétét, és vizsgálni az IBD pathomechanizmusában betöltött lehetséges szerepüket.

- Szekvenálással 76 mikro-RNS diszregulációját sikerült kimutatni. Validáláshoz a legnagyobb expressziós eltérést mutató (fold change, FC) értékű mikroRNS-ek közül választottunk, figyelembe véve jelátviteli útvonalakra helyezhetőségüket. Továbbiakban a >2 és <-2 FC értékű mikro-RNS-ek validálását terveztük, amelyet a 3. évben végeztünk el.

- További elemzések során a szekvenálással feljött, real-time-PCR-el validált miR-223 és poly(ADP-ribóz)-polimeráz-1 enzim direkt kapcsolata igazolódott a Mirtabase - strong evidence (Western-blot, reporter assay) - adatbázisa alapján, éppen ezért a Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézettel kooperálva fehérjeszinten, immunhisztokémiás módszerrel vizsgáltuk a lokális poly(ADP-ribóz)-polimeráz aktivitást Crohn-beteg gyermekekben, és párhuzamba állítottuk a miR-223 expresszióval.

- In vitro modell kísérletünk folytatásaként tervezzük LPS kezelt HT-29 epitél sejteknek a mikro-RNS-expressziójának vizsgálatát, összevetve a TNF- α inkubált sejtekkel kapott eredményekkel, így feltérképezve CD-ben fontos kiváltó tényezőket. Célunk transzfektálni az általunk IBD-ben igazolt mikro-RNS-eket, és ezek koexpressziójának hatásait vizsgálni HT-29 epitél sejtekben. Jelenleg ezen útvonalakban fontos fehérjékre specifikus mRNS primerek tervezése van folyamatban.

Közleménystatisztika a 2014-ban publikált in extenso közlemények (absztrakt nélkül):

2014-ban publikált angol nyelvű közlemények: 10 darab, impakt faktor (IF): 48,14

OTKA támogatással készített angol nyelvű közlemény: 5 darab, IF: 21,32

OTKA támogatással készített magyar nyelvű közlemény: 2 darab

3. év (2015.01.01.-2015.12.31.)

Az elmúlt évben bemutatott, elkezdett kísérleteinket komplettáltuk, az eredményeket analizáltuk és számos közleményt készítettünk el. Bár az első 2 évben is számos impakt faktorral rendelkező közleményt sikerült publikálni, a legnagyobb eredményt 2015 őszén értünk el, amikor a MicroRNS-sal kapcsolatos eredményeinket bemutató közleményünket a témakörben legnevesebb folyóiratban sikerült publikálni (Inflammatory Bowel Disease, IF: 4,46). A folyóirat az Amerikai Gastroenterológiai Társaság IBD-vel kapcsolatos legnagyobb presztizsű lapja, ahol igen nehezen fogadnak el közleményt, ami Kelet-Európából érkezik.

Az elmúlt év során számos, a korábbi években megkezdett munkát zártunk le sikeresen:

1. Kiterjedtebb mikro-RNS mintázatot vizsgálunk:

- Új-generációs szekvenálást alkalmaztunk (Illumina platform, UD-Genomed), melynél CD gyermekek makroszkóposan ép és kóros, kontroll és a nemzetközi kutatásokban ritkaságnak számító allergiás colitist vizsgáltuk. Ezeknek az adatoknak a bioinformatikai elemzését, továbbá a szekvenálással kapott eredmények validálását elvégeztük. Az így kapott mikro-RNS target génjeit a MiRTarBase adatbázis segítségével határoztuk meg. Szekvenálással több mint 150 mikro-RNS diszregulációját sikerült kimutatni.

2. Új-generációs szekvenálás validálása:

- 19 mikro-RNS validálását végeztük el CD és colitis ulcerosus (UC) mintákban (miR-17, -18a, -20a, -21, -31, -99a, -99b, -100, -125a, -126, -141, -142-3p, -142-5p, -146, -150, -185, -204, -221, -223). Validáláshoz a legnagyobb expressziós eltérést mutató (fold change, FC) értékű mikrRNS-ek közül választottunk, figyelembe véve jelátviteli útvonalakra helyezhetőségüket. Továbbiakban a $>1,5$ és $<-1,5$ FC értékű mikro-RNS-ek validálását végeztük.

3. Bioinformatikai analízis, hálózatelemzés:

- A CD-re jellemző mikro-RNS-ek target génjeit összehasonlítottuk a nemzetközileg elérhető CD gyermekek biopsziáiból végzett microarray adatokkal. Az így kapott közös géneket tovább elemeztünk, Gene Ontology (GO) analízist végeztünk, majd az így kapott biológiai csoportokat a "Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery" (DAVID) segítségével tovább elemeztük. Így a kapott mikro-RNS profilt jelátviteli útvonalak szerint osztályozzuk, így az általunk vizsgált betegségekre specifikus útvonalakat szabályozó mikro-RNS-ek további vizsgálatát tervezzük génexpressziós és fehérjeszinten.

4. Target-gén – mikro-RNS vizsgálat:

- A miR-223 és poly(ADP-ribóz)-polimeráz-1 (PARP-1) enzim direkt kapcsolata igazolódott a Mirtarbase - strong evidence (Western-blot, reporter assay) - adatbázisa alapján, éppen ezért fehérjeszinten a lokális PARP-1 aktivitást CD gyermekekben, és párhuzamba állítottuk a miR-223 expreszióval. LPS-el kezelt HT-29 epítél sejtekben vizsgáltunk a miR-223 és a PARP-1 kapcsolatát.

Továbbiakban tervezzük a funkcionális vizsgálataink kiterjesztését, sejtes modellen a vizsgált mikro-RNS-ek transzfekcióját tervezzük, mely további előrelépés a molekuláris biológiai metodikák terén.

Jelenleg a témakörben, OTKA támogatással **4 darab angol nyelven írt közlemény** van készen (az alábbi kettő), ill. készül (az utóbbi kettő), amelyeket reményeink szerint impakt faktoros lapban szeretnénk publikálni:

- Altered mucosal expression of microRNAs in pediatric patients with inflammatory bowel disease.
- Increased expression of miR-146a and -155 in the duodenal mucosa of paediatric patients with Crohn's disease.
- Characteristic microRNAs profile in the duodenal mucosa of pediatric patients with celiac disease.
- Gene sequencing and microRNA profile in colonic mucosa of patients with allergic colitis.

2015-ben elfogadott közlemények statisztikája (absztrakt nélkül)

Angol nyelvű impakt faktoros közlemények, 5darab, összesített impakt faktor: 27,25

OTKA támogatással készült angol nyelvű közlemény 3db, impakt faktor: 10,05

Közleménystatisztika összesítve a 3 évben (2013.01.01.-2015.12.31.) (absztrakt nélkül)

Angol nyelvű impakt faktoros közlemények összesen, 27 darab, összes impakt faktor: 114,36

OTKA támogatással készült angol nyelvű közlemény: 13db, impakt faktor: 44,64

OTKA támogatással készült magyar nyelvű közlemények: 4 darab

A témakörben tartott, OTKA támogatással készült díjazott, vagy angol nyelven tartott előadások:

1. Nóra Judit Béres, Zoltán Kiss, Kriszta Boros, Erna Sziksz, Ádám Vannay, Attila J Szabó, Gábor Veres

Altered mucosal expression of microRNAs in pediatric patients with inflammatory bowel disease.

ACTA MEDICA MARISIENSIS 61:(Supplement 7) p. 37. (2015), 8th Conference of PhD Students. Marosvásárhely, Románia: 2015.12.07 - 2015.12.10.

2. Béres Nóra Judit, Kiss Zoltán, Müller Katalin Eszter, Cseh Áron, Arató András, Sziksz Erna, Veres Gábor

MikroRNS profil meghatározása Crohn-beteg gyermekekben

Magyar Gyermekgasztroenterológiai Társaság Kongresszusa, előadás, 2015

Henri Nestlé díj: I. helyezés

3. Nóra Judit Béres, Gergő Szabó, Rita Benkő, Katalin Borka, Apor Veres-Székely, Szabolcs Heininger, Attila Szabó, Ádám Vannay, Gábor Veres, Eszter M. Horváth

Poly(adp-ribose)polymerase activation in paediatric patients with crohn's disease

ES-PCR, 24th Meeting, 2015.07-19-20, Budapest

4. Béres Nóra J. dr., Szabó Dolóresz dr., Arató András dr., Kiss András dr., Lendvai Gábor dr., Veres Gábor dr.

MicroRNS-ek vizsgálata Crohn-beteg gyermekekben

Magyar Gyermekgasztroenterológiai Társaság Kongresszusa, előadás, 2013.

Henri Nestlé díj: I. helyezés

Magyar Gyermekorvosok Társaságának 2014. évi Jubileumi Nagygyűlése,
2014.05.22

5. Béres Nóra J. dr., Szabó Dolóresz dr., Arató András dr., Kiss András dr., Lendvai Gábor dr., Veres Gábor dr.

Increased expression of miR-122, miR-146a and miR-155 in intestinal mucosa in children with Crohn's disease

ES-PCR: Klinikai Gyermekgyógyászati Kutatások Európai Társasága,
Maribor, 2014

II. helyezés

Összegzés

A hároméves vizsgálatunkban igazoltuk, hogy az epigenetikai faktorok, így a kis, nem kódoló RNS molekulák központi szerepet töltenek be a Crohn-betegség (CD), a colitis ulcerosa (UC), a cöliákia és az allergiás colitis (AC) pathomechanizmusában. Eredményeinket TNF-alfa kezelt HT-29 colon epiteliális sejteken is validáltuk. A gyulladásos bélbetegség két formáján kívül cöliákiában- és AC-ben is meghatároztunk olyan miR mintázatot, amely a kórképek diagnosztikájában is szerepet kaphat. Ennek különösen az utóbbi kórképnél (AC) lehet gyakorlati jelentősége, hiszen a csecsemőkori CD nem különíthető el a korai fázisban az AC-től. Eredményeink a fenti kórképekben nem csak a pathomechanizmus és a diagnosztika területén jelentősek, hanem terápiás konzekvenciával is járhatnak a jövőben. Ennek a mintázatnak a pontos meghatározását szeretnénk a jövőben elvégezni, amelynek az alapját ezen OTKA kutatási támogatás megalapozta.