

# Expresia lncRNA MIAT v neuroblastome súvisí s NMYC amplifikáciou



Feriančíková B., Feglarová T., Eckschlager T., Hraběta J.

Klinika dětské hematologie a onkologie, 2. LF, Univerzita Karlova a FN Motol, Praha, Česká Republika



## Úvod

Neuroblastom (NBL) je zhubný nádor periférneho nervového systému a najčastejší extrakraniálny solídny nádor detí zodpovedný za 11 % úmrtí na nádorové ochorenia u pacientov mladších ako 15 rokov (Brodeur, 2003).

Amplifikácia onkogénu NMYC je známa ako negatívny prognostický marker u NBL. Koreluje s vyššou agresivitou nádoru a rezistenciou na liečbu (Brodeur, 2003).

Funkčné molekuly RNA, ktoré sa počas procesu translácie neprekladajú do proteínov, sa označujú ako nekódujúce RNA (ncRNA). ncRNA hrajú dôležitú úlohu pri vývoji buniek, fyziológii a patogenéze mnohých chorôb. Deregulované hladiny expície dlhých nekódujúcich RNA (lncRNA), ktoré sú typom ncRNA s dĺžkou presahujúcou 200 nukleotidov, boli pozorované pri rôznych chorobách, vrátane zhubných nádorov. Podielajú sa na vzniku a progresii týchto chorôb (Šána et al., 2012). lncRNA „myocardial infarction associated transcript“ (MIAT) vykazuje aberantnú expresiu pri rôznych chorobách (infarkt myokardu, schizofrénia, ischemická mozgová príhoda, diabetické komplikácie, vekovo podmienený katarakta a niektoré druhy nádorov) (Ishii et al., 2006).

## Metódy

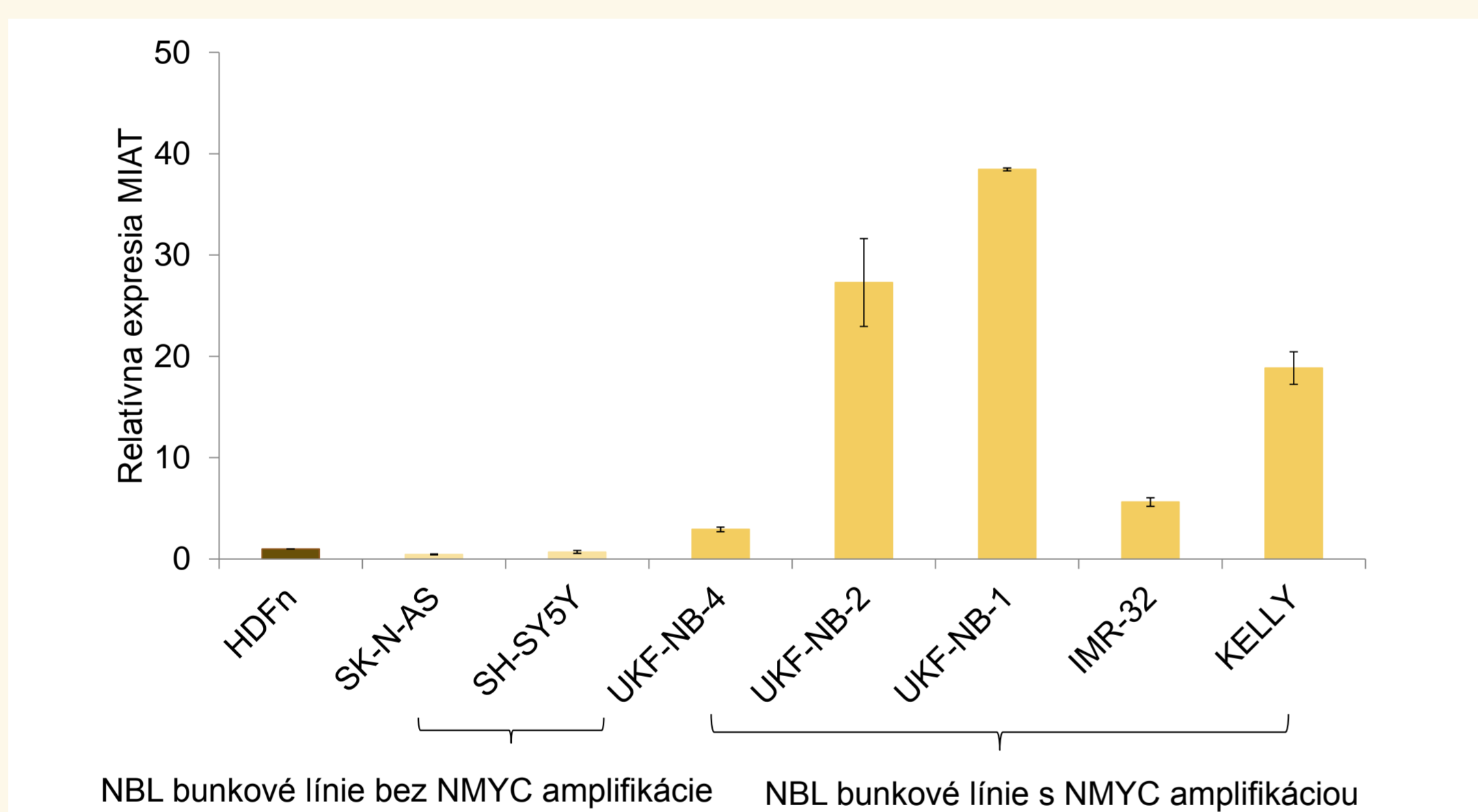
Expresia MIAT sa hodnotila pomocou qRT-PCR (TaqMan sonda). Knockdown MIAT v NBL sme previedli pomocou siRNA MIATa ako kontrolu sme použili nekódujúcu siRNA. Viabilitu a proliferáciu sme stanovili PrestoBlue. Apoptózu (Annexin V/DAPI) a bunkový cyklus sme analyzovali pomocou prietokovej cytometrie. Migrácia buniek bola stanovená „scratch assay“. Metabolizmus mitochondriálnej energie, respiračná funkcia a glykolýza sa merali pomocou Agilent Seahorse XFP „Cell Mito Stress Test“ a „Glycolysis Stress Test“. Expresiu NMYC a c-MYC proteínu sme stanovili western blotom. Expresia MIAT v patientských vzorkách bola detekovaná pomocou RNA ISH (RNA in-situ hybridizácia).

## Záver

- Expresia MIAT je výrazne vyššia u NBL bunkových línii NBL s NMYC amplifikáciou než u NBL línii bez NMYC amplifikácie (obr. 1) ( $p < 0,01$ ).
- Knockdown MIAT znižuje proliferáciu a indukuje bunkovú smrť v línii s NMYC amplifikáciou. U línii bez amplifikácie znižuje iba bunkovú proliferáciu (obr. 2).
- Downregulácia MIAT zastaví bunkový cyklus vo fáze G<sub>0</sub> v bunkovej línii NBL s amplifikáciou NMYC a zníži S fázu (obr. 3) a inhibuje migráciu NBL buniek (obr. 5).
- Knockdown MIAT znižuje glykolytickú aktivitu a bunkovú respiráciu (obr. 4).
- Knockdown MIAT znižuje expresiu NMYC proteínu a mRNA v NBL bunkových línii s NMYC amplifikáciou a c-MYC v línii bez amplifikácie (obr. 6).
- Expresia MIAT je zvýšená u pacientov s NBL (obr. 7).

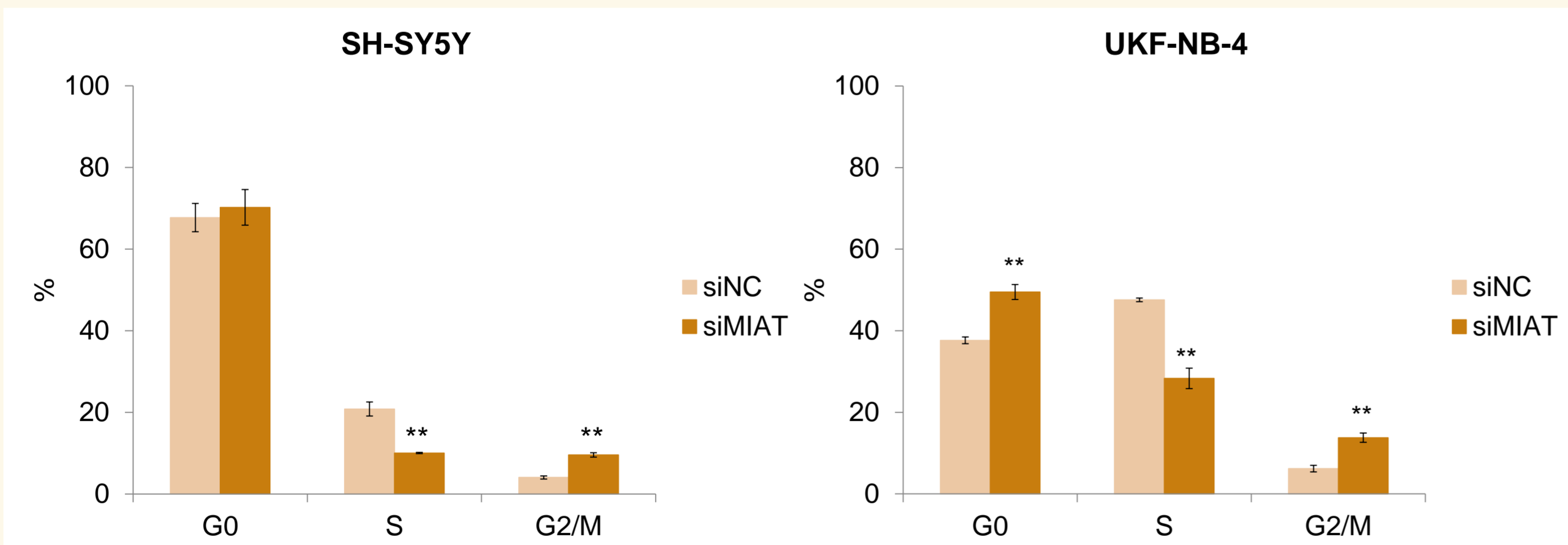
Tieto výsledky ukazujú, že hladiny MIAT sú potenciálne spojené s NBL a NMYC statusom a zdá sa, že sú dôležité pre proliferáciu NBL, najmä pre tie, ktoré majú amplifikáciu NMYC.

### Expresia MIAT v NBL bunkových línii s a bez NMYC amplifikácie



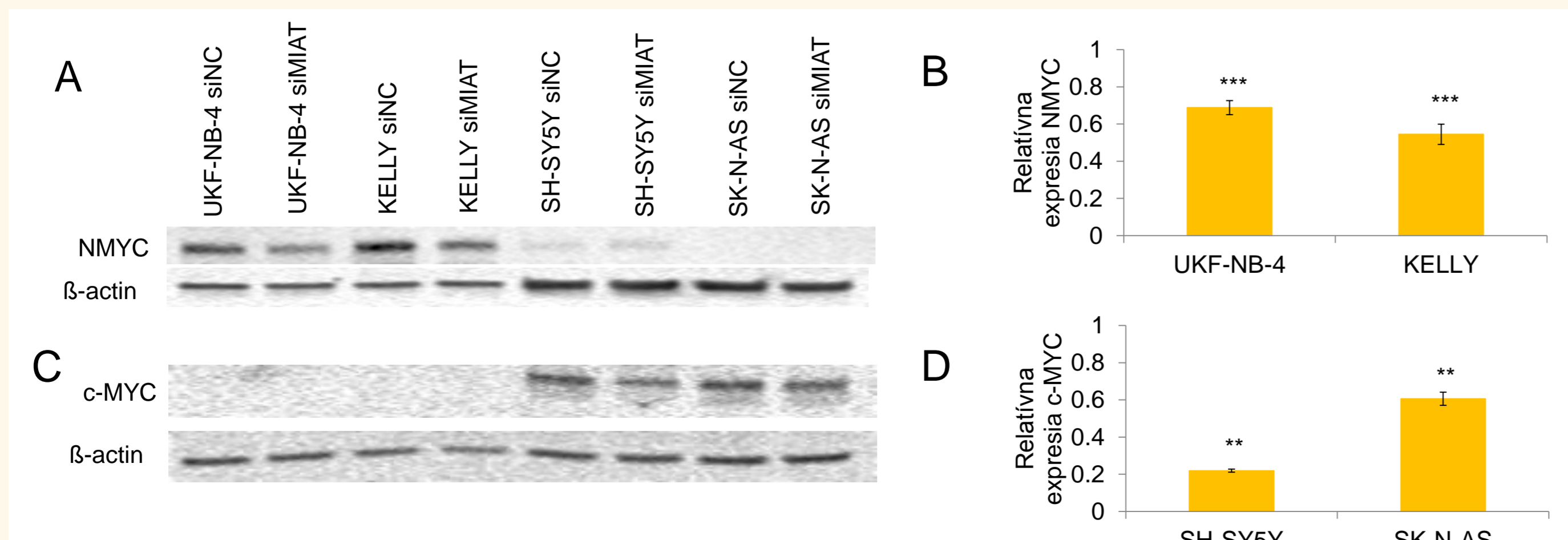
Obrázok 1. Hladiny expície MIAT na paneli bunkových línii NBL s NMYC amplifikáciou (UKF-NB-4, UKF-NB-2, UKF-NB-1, KELLY a IMR-32) a bez NMYC amplifikácie (SK-N-AS, SH-SY5Y). HDFn (normálne ľudské fibroblasty)

### Bunkový cyklus po downregulácii MIAT v bunkovej línii NBL s a bez NMYC amplifikácie



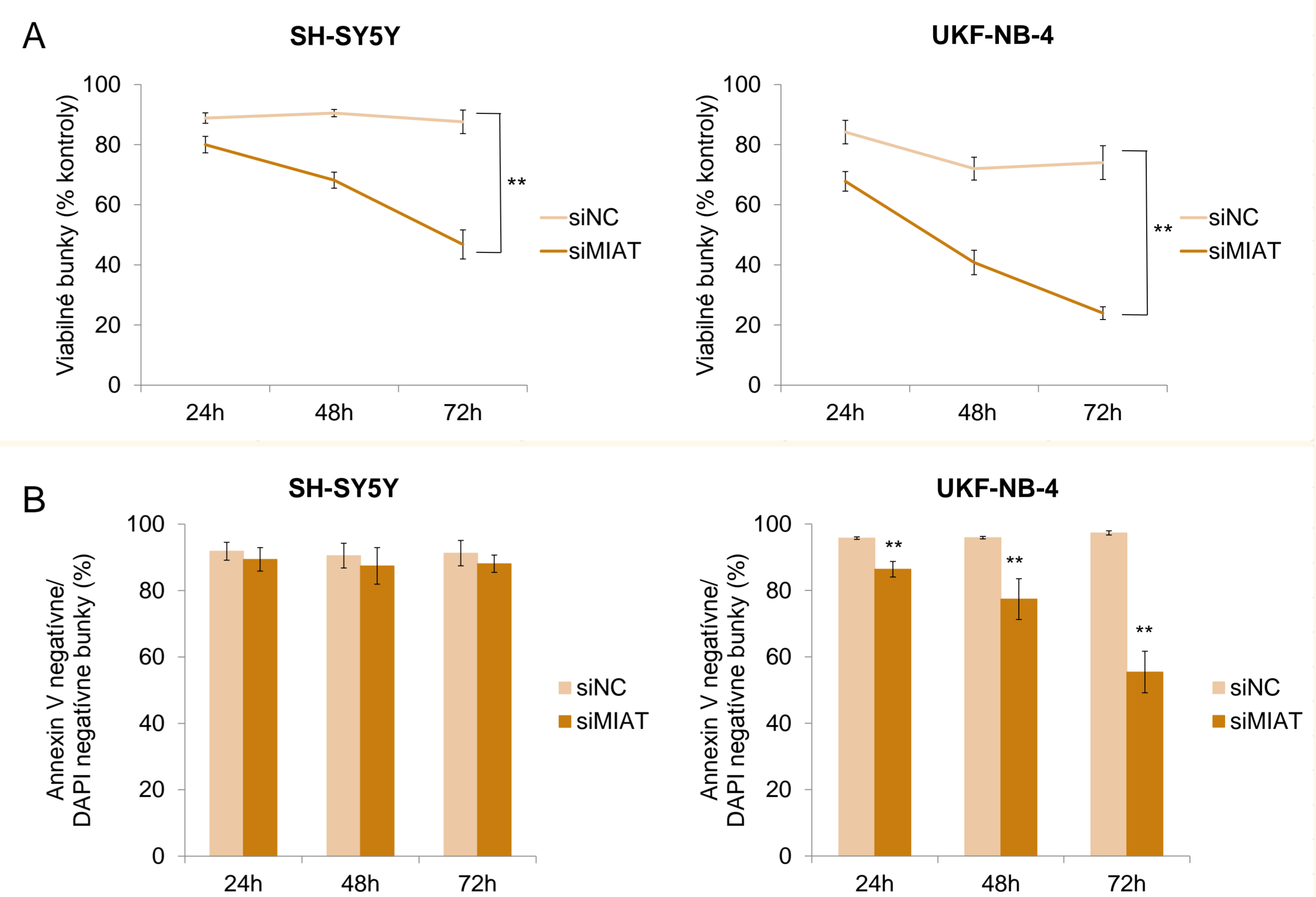
Obrázok 3. Percento fáz bunkového cyklu v bunkách UKF-NB-4 a SH-SY5Y transfekovaných siMIAT a siNC.

### Expresia NMYC a c-MYC proteínu a mRNA po knockdowne MIAT v NBL bunkových línii s a bez NMYC amplifikácie



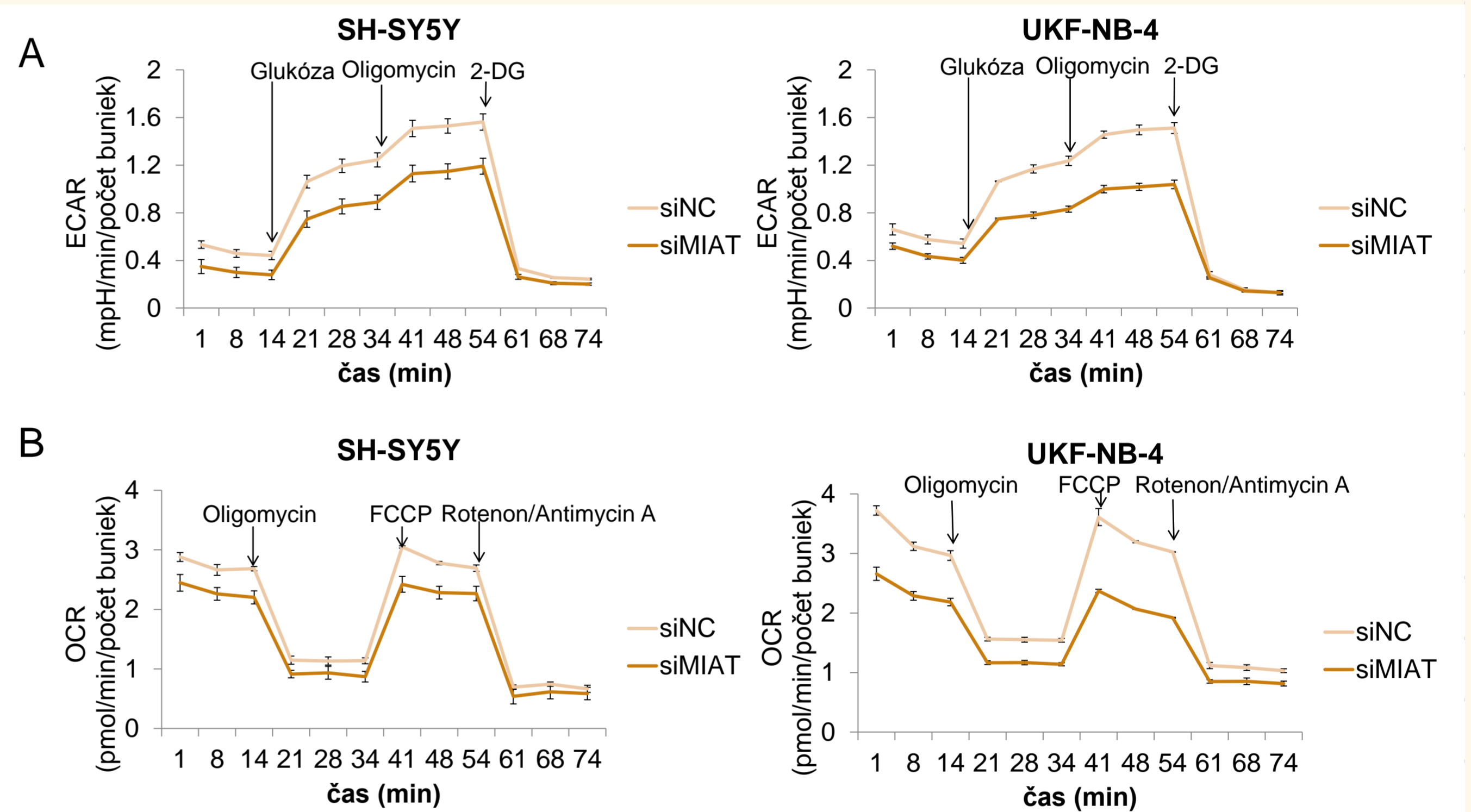
Obrázok 6. Expresia proteínu NMYC (A), c-MYC (C) a mRNA NMYC (B), c-MYC (D) v bunkách UKF-NB-4, KELLY (NMYC amplifikujúce) a SH-SY5Y, SK-N-AS (bez NMYC amplifikácie) po transfekcii MIAT siRNA (siMIAT) alebo nekódujúcej siRNA (siNC).

### Proliferácia a apoptóza buniek po downregulácii MIAT v NBL línii s a bez NMYC amplifikácie



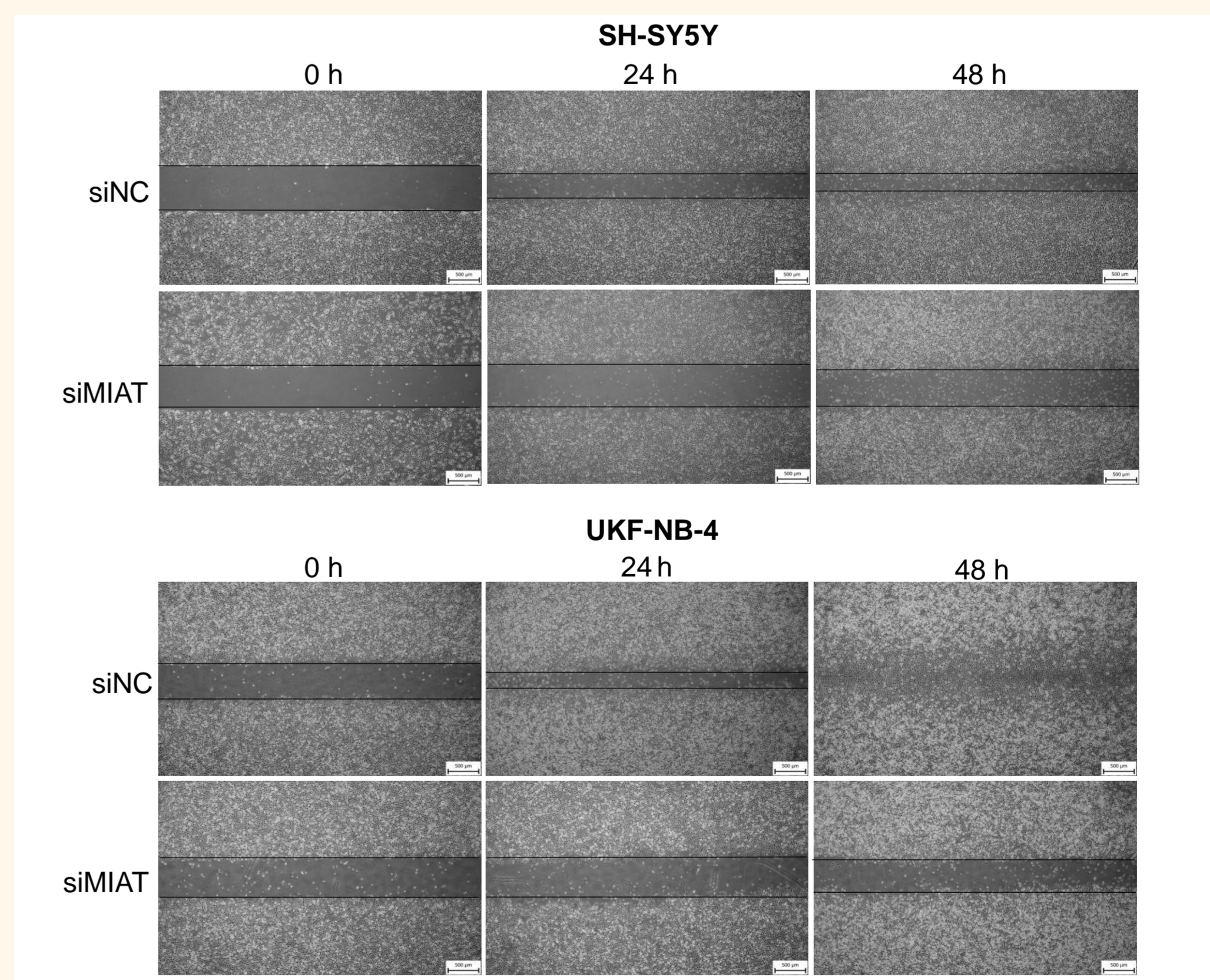
Obrázok 2. Knockdown MIAT v bunkových línii NBL s NMYC amplifikáciou indukoval apoptózu, na rozdiel od línie bez NMYC amplifikácie, kde sme zistili iba inhibíciu proliferácie. Percento viabilných buniek UKF-NB-4 a SH-SY5Y po knockdown MIAT meraná PrestoBlue (A). Apoptóza buniek UKF-NB-4 a SH-SY5Y po knockdown MIAT meraná prietokovou cytometriou (Annexin V/DAPI) (B).

### Metabolické zmeny po downregulácii MIAT



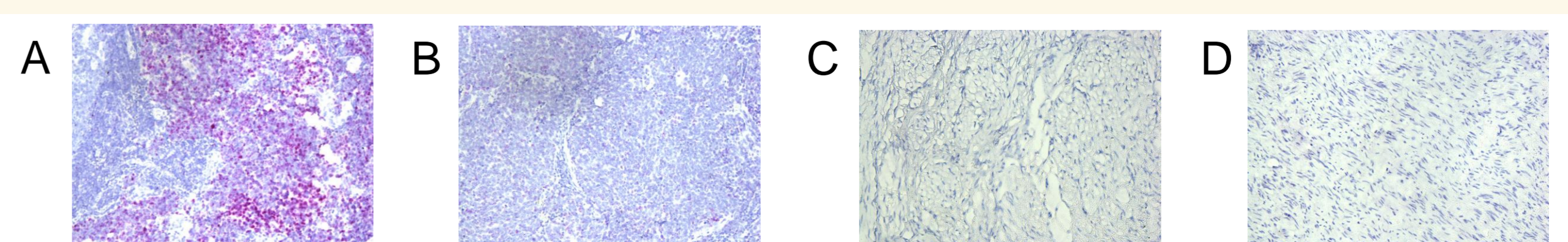
Obrázok 4. Glykolytická aktivita (A) v bunkách UKF-NB-4 a SH-SY5Y bola stanovená v reálnom čase pomocou analyzátoru extracelulárneho toku Seahorse. XFP „Glycolysis Stress Test“ a bunková respirácia (B) pomocou XFP „Cell Mito Stress Test“. Knockdown MIAT znižoval v porovnaní s kontrolami v bunkách UKF-NB-4 a SH-SY5Y glykolytú, glykolytickú kapacitu aj rezervu. Tiež sa znižovala bazálna, ATP-viazaná respirácia aj maximálna respiračná kapacita.

### Migrácia NBL buniek po knockdowne MIAT



Obrázok 5. Scratch assay po 24h a 48h u buniek s NMYC amplifikáciou UKF-NB-4 a bez NMYC amplifikácie SH-SY5Y transfekovaných siMIAT a siNC.

### Expresia MIAT u pacientov s NBL



Obrázok 7. Metódou RNA in-situ hybridizácia, sme preukázali vysokú expresiu MIAT (červené body) u pacienta s NBL s NMYC amplifikáciou (A), nižšiu u pacienta s NBL bez NMYC amplifikácie (B). U ganglioneuroblastomu (C) a ganglioneuromu (D) sme expresiu MIAT nedetekovali.

Brodeur GM, (2003). Nat. Rev. Cancer 3.  
Ishii N, Ozaki K, Sato H et al., (2006). J HumGenet 51(12).  
Šána J, Faltejskova P, Svoboda M, Slaby O, (2012). J Transl Med 10(1).