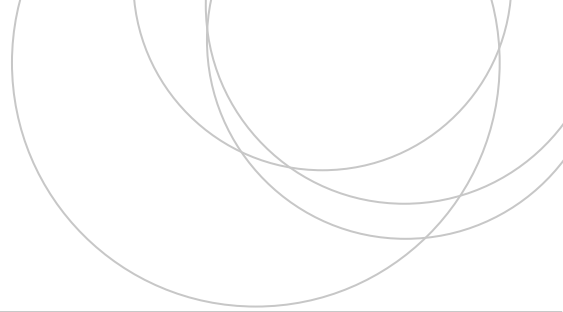




Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ZIENTZIA
ETA TEKNOLOGIA
FAKULTATEA
FACULTAD
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

MiR-301a-ren erregulazioa eta itu geneen identifikazioa laringeko zelula ezkatatsuen kartzinometan

Egilea:
Amaia Elicegui Aguirre

Zuzendariak:
Lorea Manterola Kareaga
Ana Zubiaga Elordieta

© 2018, Amaia Elicegui Aguirre

Leioa, 2018ko ekainaren 22a

AURKIBIDEA

1. SARRERA	
1.1 Laringeko minbizia (LSCC)	3
1.2 miRNA-k eta minbizia	3
1.2.1 miR-301a eta LSCC	4
2. HELBURUAK	5
3. MATERIALA ETA METODOAK	
3.1 SCC-38 eta SCC-42B zelula lerroen hazkuntzak	5
3.2 Zelulen hazkuntzak	5
3.3 MiR-301a-ren inhibizioa eta gainadierazpena	6
a) MiR-301a-ren inhibizailearen transfekzioa	6
b) Lentivirusen bidezko miR-301a-ren gainadierazpena	6
3.4 RNA erauzketak	7
3.5 MiR-301a-ren itu posibleen azterketa adierazpen array-en bidez	7
3.6 Erretrotranskripzioa (RT)	7
3.7 Adierazpenaren azterketa qPCR bidez	8
a) miR-301a-ren adierazpenaren kuantifikazioa	8
b) Geneen adierazpenaren kuantifikazioa	8
3.8 Adierazpen datuen analisia	9
3.9 Luciferasa saioak	9
a) Zelulen transfekzioa	9
b) Luciferasaren neurketa	10
4. EMAITZAK	
4.1 MiR-301a-ren inhibizioa RNA osagarriaren transfekzioaren bidez	10
4.2 MiR-301a-ren inhibizioak eragina dauka zelulen hazkuntzan	11
4.3 MiR-301a-ren inhibizioak eragina du NF- κ B seinaleztapen bidezidorean.....	11
a) Adierazpen array-aren balioztatzea	12
b) NF- κ B-ak erregulatzen dituen geneen adierazpena	13
4.4 NF- κ B seinaleztapen bidearen inplikazioaren azterketa luciferasa saioen bidez.....	13
5. EZTABAIDA	14
6. ONDORIOAK	16
7. ESKER ONAK	16
8. BIBLIOGRAFIA	16

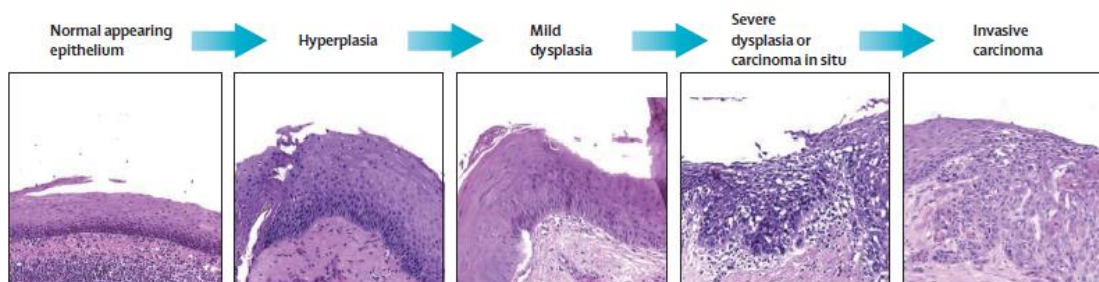
1. SARRERA

1.1 Laringeko minbizia (LSCC)

Laringeko minbizia edo laringeko zelula ezkatatsuen kartzinoma (LSCC) buru eta lepoko minbizien artean bigarren ohikoena da ⁽¹⁾, zelula ezkatatsuen kartzinomen (Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) kasuen %5,7-7,6 direlarik. LSCC-ren diagnostiko eta tratamenduan aurrera pausua eman diren arren, gaixoen pronostikoa ez da aldatu azken 20 urteetan ⁽²⁾ eta bost urteetako biziraupen maila izan ohi dute, tumoreen berragerpena eta nodulu linfatiko lokalen metastasia nahiko ohikoa izaten baita ⁽³⁾.

Teknika molekularren bidez asaldura genetiko eta epigenetikoak identifikatzea lortu da gaitzaren fase ezberdinetan, gaixotasunaren progresioaren eskema bat irudikatzea ahalbidetuz ⁽⁴⁾ (1. Irudia). Garapenean zehar epitelioko mukosaren egiturak aldaketak jasaten ditu. Aldaketa horiek medio, hasierako hiperplasia/hiperkeratosi batetik displasia (gradu altu edo baxukoa) garatuko da, *in situ* kartzinoma bilakatuz jarraian, eta azkenik kartzinoma inbaditzaile ^(4, 5) (1. Irudia). Aitzitik, displasia guztiak ez dira kartzinoma bihurtzen; gradu baxukoetan %10-ak eta gradu altuko %30-ak jasaten du transformazioa ⁽⁶⁾.

LSSC-aren progresioa aldaketa genomikoen (kromosoma zatien galera edo anplifikazioak, esaterako) ondorio da ⁽⁵⁾, baita aldaketa genetiko (mutazioak, adibidez) eta epigenetikoak (miRNA adierazpen aldaketak, kasu) pilaketan ondorio ere.



1. Irudia: HNSCC kartzinogenesiaren garapen fenotipikoa. Eboluzio histologikoa eosina eta hematosilina tindaketarekin adierazita dago (x200).

1.2 miRNA-k eta minbizia

Giza zelula bakoitzak milaka miRNA ezberdin ekoizten ditu eta prozesu biologiko anitzetan hartzen dute parte. Prozesu horietako batzuk dira, besteak beste, garapena, zelulen proliferazioa eta desberdintzapena zein apoptosia ⁽⁷⁾.

Minbiziaren oinarria zelulen identitate galera eta ezohiko proliferazioa dira. miRNA-k minbiziarekin 2002an erlazionatu ziren lehen aldiz, ⁽⁸⁾ eta horien adierazpen aldaketak detektatu izan dira hainbat minbizitan ⁽⁹⁾. Ikerketak aurrera egin ahala ikusi da miRNA molekulek onkogene zein tumore supresore modura joka dezaketela, zelulen proliferazio masiboak eraginez hazkuntza supresoreak saihestuz, suntsipen immunea ekidinez, erreplikazioa aktibatuz, tumoreek eragiten dituzten inflamazioak bultzatuz, inbasioa eta metastasia bultzatuz, angiogenesisia indusituz, zelulen heriotza saihestuz eta zelulen oreka energetikoa hondatuz, eta ondorioz, minbizien eragile dira.

Gainontzeko minbizietan bezala, LSCC-an ere hainbat miRNA deskribatu dira, funtzio ezberdinekin erlazionatu direnak. Horien artean aipagarriak dira EMT prozesuan parte hartu eta inbasio eta migrazioarekin bultzatzen duten miR-375 eta miR-205 onkogeneak, baita zelulen proliferazioa inhibitzen duen miR-194 tumore supresorea ere ^(10,11).

MiRNA-ek LSCC-an eragina dutela ikusita, displasiatik kartzinomarako prozesuan miRNA desberdinek parte hartzen zuten ikusteko proiektua hasi zen. Bi motatako displasietan, hau da kartzinomara progresatzen ez zuten eta progresatzen zutenetan, miRNA adierazpenaren profila analizatu zen. Analisi horretan, besteak beste miR-301a progresioarekin erlazionatuta zegoela ikusi zen. Hori dela eta proiektu honetan, miR-301a-ren eragina LSCC-an eta bere mekanismo biologikoa aztertu ziren.

1.2.1 MiR-301a eta LSCC

MiR-301a, miR-130 gene familiakoa da. Gizakietan pre-miRNA sekuentziatik bi miRNA heldu sortzen dira, miR-301a-3p eta miR-301a-5p (2. Irudia), lehenengoa ugariago izanik. Dagoeneko balioztatu dira zenbait gene itu molekula honentzat (IRF1, PTEN, TGFBR1..), eta beste iragarritako hainbat oraindik frogatzeke daude.

```
51 - cagugcaauaguauugucaaagc - 73
14 - gcucugacuuuauugcacuacu - 35
```

2. Irudia: miR-301a-ren miR-301a-5p (goikoa) eta miR-301a-3p-en (behekoa) sekuentzia helduak

Jakina da miR-301a-k onkogene modura jokatzen duela hainbat giza minbizitan, gibel zein areako minbizietan edo melanometan kasu ^(12, 13, 14). HNSCC-tan ere badaude ikerketa batzuk zeinetan miR-301a-ren adierazpen aldaketak kartzinomaren sorreran eta garapenean eragina duela erakusten duten. LSCC-an ere ondorioztatu da miR-301a-3p-k onkogene moduan jokatzen duela Smad4 tumore supresorea zuzenean erregulatuz ⁽¹⁵⁾. Beraz, mir-301a-3p-k funtzio

garrantzitsua du LSCC-aren sorrera zein garapenean. Hala ere, oraindik ere ikertzeke dago miR-301a-ak zehazki LSCC-an dituen edo izan ditzakeen funtzio eta eraginak.

2. HELBURUAK

Ikerketa proiektu honen helburua miR-301a-k laringeko zelula ezkatatsuen kartzinometan duen eragina aztertzea izan zen, baita zein bidezidorretan parte hartzen duen ere. Honela, minbizi honen tratamendurako miR-301a edo erregulatzen duen bidezidorra itu egokia den jakin ahal izango litzateke. Helburu zehatzak hauek izan ziren:

- MiR-301a-ren gainadierazpen nahiz inhibizioak zelulen portaeran zein eragin duen aztertzea.
- MiR-301a-k zein bidezidorretan parte hartzen duen eta nola eragiten duen aztertzea.
- MiR-301a-ren itu gene posibleak ondorioztatu ahal izatea.

3. MATERIALA ETA METODOAK

3.1 SCC-38 eta SCC-42B zelula lerroen hazkuntzak

Ikerketa lan honetan bi tumore zelula lerro erabili ziren: SCC-38 eta SCC-42B. Zelula lerro hauek Reidar Grénman katedradunak emanak dira (Turku unibertsitatea, Finlandia). Zelulak gaixoen laringeko biopsietatik lortu ziren, SCC-38 lerroa I-II graduko tumore batetik eta SCC-42B metastasi batetik. Zelula lerro hauek Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) medioan hazi ziren, %10 FBS seruma (Fetal Bovine Serum), %1 glutamina, %1 estreptomizina eta penizilina, 2mM HEPES eta %1 aminoazido esentzialekin osatuta (guztiak Life Technologies Ltd-koak). Plaka bakoitzean 500.000 zelula jarri ziren eta %80-ko konfluentziara heltzean medioa aldatu zitzaien (4 egunez behin). Zelulak %5 CO₂-ko baldintzetan inkubatu ziren, 37 °C-tan.

3.2 Zelulen kontaketa

Hazkuntzetan lortutako zelulen kontaketa burutzeko zelulak tripsinaz (%0,05 EDTA, Life Technologies Ltd) tratatu, 1.500rpm-tara zentrifugatu, eta jalkina 1ml DMEM medioan bersuspenditu zen. Hemendik 10µl zelula 10µl Trypan Blue-rekin nahastu ziren (Trypan blue solution, Sigma), eta 10µl kargatu ziren Neubauer kameran. Erreaktibo honi esker zelula biziak eta hildakoak desberdindu eta bizirik zeudenak kontatu ahal izan ziren. Diagonalean kokatutako

1 mm²-ko bi karratuetako zelulak kontatu ziren, eta zelula kopuru totala kalkulatu zen mililitroko, formula honen bidez:

$$\frac{\text{Zelula kopurua}}{\text{ml}} = \frac{\text{Kontatutako zelula kop. totala} \times 10.000 \times 2}{\text{kontatutako karratu kopurua}}$$

3.3 MiR-301a-ren inhibizioa eta gainadierazpena

Lan honetan miR-301a gainadierazi eta inhibitu zen, eta horretarako zelula lerro bakoitzetik bi azpillerro lortu ziren: bata scramble-a (SCR) edo sekuentzia kontrola zuena eta bestea miRNA gainadierazita (miR-301a) edo inhibituta (INH) zuena. Inhibizioa transfekzio bidez burutu zen, eta gainadierazpena lentivirus bidez. Honenbestez, lortu ziren zelula lerroak honakoak izan ziren: SCC-38 SCR, SCC-38 INH, SCC-38 miR-301a, SCC-42B SCR, SCC-42B INH, SCC-42B miR-301.

a) MiR-301a-ren inhibitzailearen transfekzioa

MiR-301a-ren inhibizioa lortzeko bi zelula lerroak 100nM -imiR-301a RNA osagarriarekin transfektatu ziren (Dharmacon GE). RNA sintetiko hau osagarriki lotzen da miR-301a-ra, eta bere ituak erregulatzea eragozten du. Transfekzioa baino 24h lehenago zelulak P6 plaketan eroin ziren, putzu bakoitzean 50.000 zelula 2ml DMEM mediotan bersuspendituta. Lehenik eta behin, putzu bakoitzeko 6ul Turbofect erreaktibo (TurbofectTM Transfection Reagent, Thermo Fisher Scientific) eta suero gabeko DMEM medioa nahastu ziren. Era berean, alde batetik 100nM SCR eta bestetik 100nM INH DMEM medio garbian 200µL arte nahastu ziren. Guztiak 5 minutuz inkubatu ziren ondo disolbatzeko. Jarraian, turbofect disoluzioa (200µL putzu bakoitzeko) SCR eta INH-ren tuboetara banatu zen eta 30 minututan zehar inkubatu. Transfekzioan, turbofect erreaktiboak zelulen mintzean poroak zabaltzen ditu eta zelula kanpoko eta barruko medioen arteko trukea errazten du, SCR eta INH molekulak barrura sartzea erraztuz. Aldi berean, medioan dauden beste molekulak ere barrura sartu daitezke normala baino kontzentrazio altuagoan. Hori antibiotikoen kasuan kaltegarria izan daiteke zelulentzat eta beraz, zelulak bi aldiz PBS-rekin garbitu ziren eta 1mL %10 FBS-rekin bakarrik osatutako DMEM gehitu zitzairen. Behin inkubazio denbora pasata, SCR eta INH-ren tubo bakoitzean DMEM %10 FBS gehitu zen, 1mL arte, eta egokitutako putzu bakoitzean honen 1ml gehitu zen. Zelulak 48 orduz inkubatu ziren RNA erauzketa arte.

b) Lentivirusen bidezko miR-301a gainadierazpena

Zelula lerro hauez gain SCR edo miR-301a gainadierazten zuten lentivirusak barneratuta zeuzkaten SCC-38 eta SCC-42B zelulak ere hazi ziren. Zelula hauek aurrekoen medio eta baldintza berdinetan hazi ziren baina 1µg/µL puromizina (Invitrogen, United Kingdom) gehitu zitzairen. Izan

ere, lentivirus hauek puromizinarekiko erresistentzia genea dute eta horrela, lentivirusa zuten zelulak soilik hazi ziren.

3.4 RNA erauzketak

Behin zelulek miR-301a gainadierazita edo inhibituta zutenean, RNA erauzketari ekin zitzaion. Horretarako TRI-Reagent (Ambion) errektiboa erabili zen, fabrikatzailearen protokoloa jarraituz. Zelulak bi aldiz PBS-rekin (hotza) garbitu eta putzu bakoitzean 1ml TRI-reagent errektiboa gehitu zen, 10 minutuz inkubatu ziren giro tenperaturan eta DEPC-z tratatutako eppendorf-etan jaso ziren. Ondoren, 200µl kloroformo gehitu zitzaizkien RNA beste osagaietatik banatzeko, bortex batekin nahastuz eta 10 minututan inkubatuz giro tenperaturan. Lagin hauek 12.000xg-ra zentrifugatu ziren 10 minututan zehar 4°C-tan, eta gainjalkinak DEPC-z tratatutako eppendorf berri batean jaso ziren. Gero 1ul glukogeno eta 500ul isopropanol gehitu zitzaizkien RNA prezipitatzeko, nahastu eta 10 minutu giro tenperaturan inkubatu ondoren, 12.000xg-tara zentrifugatu ziren laginak 10 minututan zehar 4°C-tan. Ordurako RNA jalkin txuria ikusi zenez, gainjalkina kendu zen. Jarraian, 1ml %75 etanol gehitu zen jalkina garbitzeko eta 7.600xg-tara zentrifugatu zen 5 minututan zehar 4°C-tara. Etanola kendu zen ondoren, eta jalkina hutsean lehortzen utzi zen 20 minututan zehar. Amaitzeko, RNAasa-rik gabeko 20µl uretan bersuspenditu ziren jalkinak, eta laginen kontzentrazioa neurtu zen NanoDrop espektrometroan (Thermo Scientific NanoDrop 1000) ND softwarearen bidez (Nucleic Acid, RNA40). RNA -80°C-tara gorde zen erabili arte.

3.5 MiR-301a-ren itxurazko azterketa adierazpen array-en bidez

MiR-301a-ren inhibizioak zein generen adierazpenean eragiten duen ikusteko eta honela itxurazko ondorioztatu ahal izateko, adierazpen array bat egin zen SCC-42B zelula lerroarekin. Kontrol moduan 3.4 atalean aipatutako SCR kontrol sekuentziarekin transfektatutako zelulak erabili ziren. Honetarako Human Genome U133 Plus 2.0 array-ak erabili ziren eta GeneChip® 3' IVT PLUS Reagent Kit protokoloa jarraitu zen (Affimetrix). Array-aren emaitzak *Expression Console* eta *Transcriptome Analysis Console* softwareak erabiliz analizatu ziren. Jarraian, array honetan lortutako emaitzak balioztatze qPCR bidez aztertu zen hainbat generen adierazpena.

3.6 Erretrotranskripzioa (RT)

Zeluletatik erauzitako RNA bi helbururekin erretrotranskribatu zen DNA-ra. Alde batetik, miR-301a-ren inhibizioa eta gainadierazpena ondo burutu zirela ziurtatzeko egin zen. RNU48 barne kontrola edo *housekeeping* genea ere erretrotranskribatu zen normalizaziorako. Honetarako, TaqMan microRNA reverse transcription kit-a erabili zen (Life Technologies). Lagin bakoitzetik 50ng RNA nahastu ziren 5µl uretan eta jarraian 2,9µl MIX gehitu ziren: 0.75µl 10x

tanpoi, 0.075µl dNTP, 1.5µl RNU48 edo miR-301a hasleenak, 0.5µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase (MSRT) entzima. Termoziklatzailean ezarritako programa honakoa izan zen: 30 min 16 °C, 30 min 42 °C, 5 min 85 °C. Honela lortutako cDNA -20°C-tara gorde zen erabili arte.

Bestetik, errestranskripzioa miR-301a-ren gainadierazpen nahiz inhibizioak hainbat generen adierazpenean duen eragina ikusteko egin zen. Kasu honetan, High capacity cDNA Reverse Transcription Kit-a (Life Technologies) erabili zen. 1.000ng RNA nahastu ziren 14,2µl uretan eta jarraian 5,8µl MIX gehitu ziren: 2 µl 1x tanpoi, 0.8 µl dNTP, 2µL random hasleenak, 1µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase (MSRT) entzima. Ondoren, RT programa ezarri zen: 25°C 10min, 37°C 120min, 85°C 5 min, 4°C laginak jaso arte. Honela, cDNA 50ng/µl-ko kontzentrazioa lortu zen lagin bakoitzean. Prozesu hau burututa, miR-301a-ren inhibizioak nahiz gainadierazpenak hainbat genetaren eraginak adierazpen aldaketak neurtu ahal izan ziren qPCR bidez.

3.7 Adierazpenaren azterketa qPCR bidez

a) miR-301a-ren adierazpenaren kuantifikazioa

Inhibizioaren eraginkortasuna egiaztatzeko miR-301a-ren adierazpena neurtu zen. Normalizaziorako RNU48 *housekeeping* genearen adierazpena ere neurtu zen. cDNA laginak 3 aldiz diluitu ziren eta lagin bakoitzetik 2,1µl jarri ziren CFX96 plakako zegokien putzuan. Honi amplifikaziorako prestatutako 7,9µl mix gehitu zitzaizkion putzu bakoitzean: 5µl 2x TaqMan Universal Master Mix, 0,5µl 20x TaqMan hasle espezifiko, 2,4µl ura. Emaitzak fidagarriak izateko lagin bakoitzerako triplikatuak egin ziren. Plaka prest zegoenean, plastikozko estalki itsaskor bat jarri eta pulsu bat eman zitzaion laginak ondo nahasteko putzuetan. Azkenik, plaka BioRad C1000 Touch™ CFX96 Thermal Cycler termoziklatzailean sartu zen eta adierazpena neurtu zen hurrengo programa erabilita: 5min 50°C, 5min 95°C eta 40 ziklo 15s 95°C eta 1min 60°C -tan.

b) Geneen adierazpenaren kuantifikazioa

MiR-301a-ren gainadierazpenak nahiz inhibizioak bere ituen adierazpena nola aldatzen duen aztertu zen qPCR bidez. Alde batetik, aurretik burututako adierazpen array-aren balioztatzea egiteko balio izan zuen. Adierazpen array-ean SCR-arekiko adierazpen igoera nabaria aldatuta zuten hainbat gene neurtu ziren: IL8, COX2, BIRC3 eta A20 geneena, hain zuzen ere. Bestetik, miR-301a-ren iturri posibleen eraginpean dauden geneen adierazpena neurtu zen. Kasu honetan NF-κB bidezidorrean parte hartzen duten gene batzuen adierazpena neurtu zen: TNF, IL6,

GP130, IL1 eta RELA (p65 transkripzio faktorearen genea) geneena. Normalizaziorako HMBS *housekeeping* generen adierazpena ere neurtu zen.

cDNA laginak 5ng/ μ L-ra diluitu ziren. Itu gene bakoitzarentzat master mix soluzioa prestatu zen. Horretarako 0,17 μ l 5 μ M hasle espezifikoa, 5 μ l 2X Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Life technologies) eta ura 6 μ L arte nahastu ziren. CFX384 plaka optiko batean 4 μ L cDNA (20ng guztira) eta 6 μ L master mix gehitu zen putzu bakoitzean eta 3 putzu bete ziren lagin bakoitzeko. Aurreko kasuan bezala, estalkia jarri eta pulsu bat eman ondoren, plaka BioRad C1000 Touch[™] CFX384 Thermal Cycler termoziklatzailean sartu zen. Adierazpenaren neurketarako ondorengo programa aplikatu zen: 5min 95°C-tan eta 40 ziklo 15s 95°C-tan eta 1min 60°C-tan.

3.8 Adierazpen datuen analisia

Termoziklatzailean neurtutako laginen adierazpen erlatiboa aztertzeko, adierazpen erratioak atari ziklo (threshold cycle, Ct) konparaketen bidez kalkulatu ziren. Ct balioak fluoreszentiaren seinaleak ataria gainditzeko behar dituen ziklo kopuruak dira. Kuantifikazioak adierazteko $2^{-\Delta\Delta Ct}$ *fold change* metodoa erabili zen. Lehenbizi Ct balio guztiei gene endogenoaren Ct balioa kendu zitzaien ΔCt kalkulatu. Ondoren $\Delta\Delta Ct$ -ak kalkulatu ziren miR-301a-ren ΔCt balioei SCR-aren ΔCt balioa kenduz. Azkenik $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -ak kalkulatu ziren $\Delta\Delta Ct$ balioen berreketa eginez. Azken balio hauek izan ziren emaitzetan adierazi zirenak. Adierazpena 2 balioa baino altuagoa eta 0,5 baino baxuagoa ematen duten laginak esangarriak kontsideratzen dira. Bestetik, gainadierazpena aztertzerako orduan, adierazpenaren estatistika ere egin zen Man Whitney test ez parametrikorekin ($p < 0.05$).

3.9 Luciferasa saioak

MiR-301a-k NF- κ B bidezidorean eragina izan dezakeela ikusita, luciferasa saioen helburua miRNA horren gainadierazpenak NF- κ B seinalez tapen bidean nola eragiten duen aztertzea zen. Honetarako, luciferasa erreportariaren genea zuten ConA eta 3 enhancer ConA (3x κ B ConA Luc) plasmidoak transfektatu zitzaizkien zelulei. Azken honen berezitasuna luciferasaren urgora NF- κ B menpeko hiru gene aktibatzaile gehigarri dituela da, eta beraz, NF- κ B aktibatzen bada, Firefly luciferasa seinalea handiagoa izango da. Honenbestez, gene hauek ez dituen ConA plasmidoak kontrol modura balio izan zuten.

a. Zelulen transfekzioa

Zelulen transfekziorako p6 plaketan 75.000 zelula erein ziren putzu bakoitzean. Kasu honetan lentivirus bidez miR-301a eta SCR gainadierazten zuten honako zelula lerroak ConA plasmidoekin (ConA eta ENH) transfektatu ziren: SCC-38 SCR, SCC-38 miR-301a, SCC-42B SCR eta SCC-42B

miR-301a. Transfekzioarako turbofect errektiboa erabili zen eta aurrez aipatutako protokolo bera jarraitu zen. Behin zelulak zegozkien 200ng plasmidorekin transfektatu zirenean, 48 ordutan zehar inkubatu ziren zelulak %5 CO₂-ko baldintzetan, 37 °C-tan. Transfekzioaren azken 5 orduetan plaken kopuruaren erdia 10ng/ml TNF α -rekin tratatu ziren. Beraz, lerro zelular bakoitzarekin 8 baldintza desberdin genituen: SCR ConA TNF-, SCR ConA TNF+, SCR ENH TNF-, SCR ENH TNF+, miR-301a ConA TNF-, miR-301a ConA TNF+, miR-301a ENH TNF- eta miR-301a ENH TNF+. TNF α -k NF- κ B aktibatzen duela behatuenez ⁽¹⁶⁾, honekin tratatutako zelulen luciferasa seinalea altuagoa izatea espero zen, eta gainera, 3 enhancer ConA (ENH) plasmidoa zuten zelulek, ConA plasmidoa zutenak baino oraindik eta altuagoa.

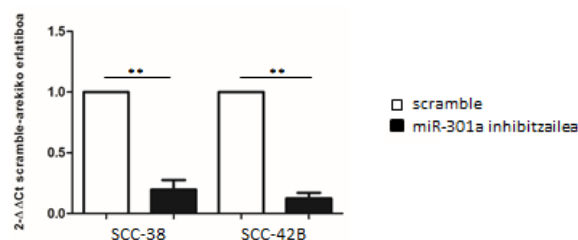
b. *Luciferasa neurketa*

Luciferasa seinalearen neurketarako, Dual Luciferase Reporter assay system (Promega) erabili zen. Kit honek jatorriz Renilla eta Firefly luciferasak neurtzen baditu ere, soilik Firefly luciferasa neurtu ahal izan zen. Seinalea estandaritzatzeko ConA plasmido arrunta erabili zen. Transfekziotik 48 ordu pasa ondoren, zelulak bi aldiz garbitu ziren PBS-rekin eta jarraian 250 μ l 1x Lysis buffer gehitu zitzairen, 30 minutuz mugimenduan inkubatzen utziz. Behin zelulak lisatuta, “cell scraper” batekin lisatua jaso zen eta -80°C -tara gorde. Hurrengo egunean, luminiszentzia plaka batean 100 μ l LARII errektibo jarri ziren putzu bakoitzean. Honi multikanalarekin 20 μ l lisatu gehitu eta segituan PHERAstar BMG Labtech luminometroan neurtu ziren laginak.

4. EMAITZAK

4.1 MiR-301a-ren inhibizioa RNA osagarriaren transfekzioaren bidez

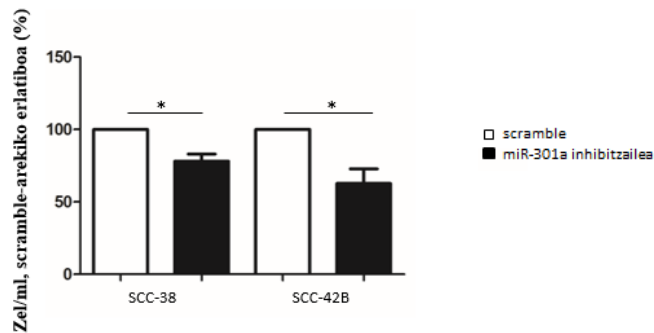
Ikerketa honetan, miR-301a-ren inhibizioa lortzeko, SCC-38 eta SCC-42B zelula lerroak -imiR-301a RNA osagarriarekin transfektatu ziren. Transfekzioak zelulen portaeran eragindako aldaketak ikusi aurretik, inhibizioaren eraginkortasuna aztertu zen. 3. Irudian ikusten den moduan, inhibizioaren eraginkortasuna %75a baino handiagoa izan zen bi zelula lerroetan eta estatistikoki esangarria izan zen, $p < 0.01$ balioak lortu zirelarik.



3 irudia: MiR-301a-en adierazpena transfekzioaren ondoren. Transfekzioa egin eta 72 ordutara, zelulen RNA erauzi eta RT-qPCR bidez adierazpena neurtu zen. 2^{-ΔΔCt}-aren bidez kalkulatu zen adierazpena, eta scramble-arekiko erlatibizatu zen. ** $p < 0.01$ Mann-Whitney-ren U testa.

4.2 MiR-301a-ren inhibizioak eragina dauka zelulen hazkuntzan

Inhibizioa egokia zela egiaztatu ondoren, horrek SCC-38 eta SCC-42B zelula lerroen hazkuntzan edo proliferazioan zuen eragina aztertu zen zelula kontaketa bidez. Transfekzioa egin eta 72 ordutara zelulen proliferazioaren jaitsiera ikusi zen bi lerroetan, (SCC-38 lerroan %78raino jaitsi zen zelulen hazkuntza, eta SCC-42B lerroan %62ra) (4. irudia). Jaitsiera hori estatistikoki esangarria izan zen bi zelula lerroetan ($p=0,012$ eta $p=0,021$ hurrenez hurren). Beraz, miR-301a ren inhibizioa zelulen hazkuntza moteltzeko gai dela ikusi zen laringeko kartzinomako bi zelula lerro horietan.

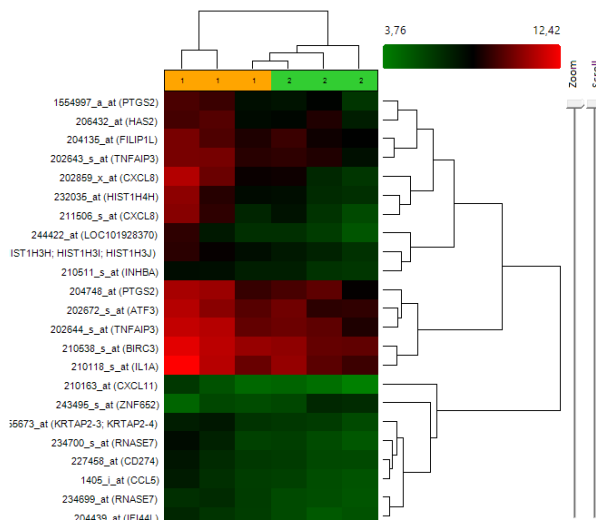


4. irudia. MiR-301a-ren inhibizioak zelulen hazkuntza murrizten du. Inhibitzailearen transfekzioa egin eta 72 ordutara, zelula kontzentrazioa neurtu zen mililitroko SCC-38 eta SCC-42B lerroetan. * $p<0,05$ Mann-Whitney-ren U testa.

4.3 MiR-301a-ren inhibizioak eragina du NF- κ B seinaleztapen bidezidorrean

MiR-301a-ren inhibizioak gene adierazpena nola aldatzen zuen ikusteko eta honela itu posibleak ondorioztatu ahal izateko adierazpen array bat egin zen SCC-42B lerroarekin. Hemen SCR-a eta miR-301a inhibituta zituzten lerroak konparatu ziren eta adierazpen desberdintasunak aztertu ziren. Analisi honetan hainbat generen adierazpena nabarmen igo zela ikusi zen: CXCL8, PTGS2, ATF3, TNFAIP3, BIRC3, IL1A-rena besteak beste ($p < 0,05$, *fold change* >2) (5A irudia). GSEA datu baseari esker, gene hauek TNF α -k induzitutako NF- κ B bidezidorrean parte hartzen dutela ikusi ahal izan zen (5B irudia).

A



B

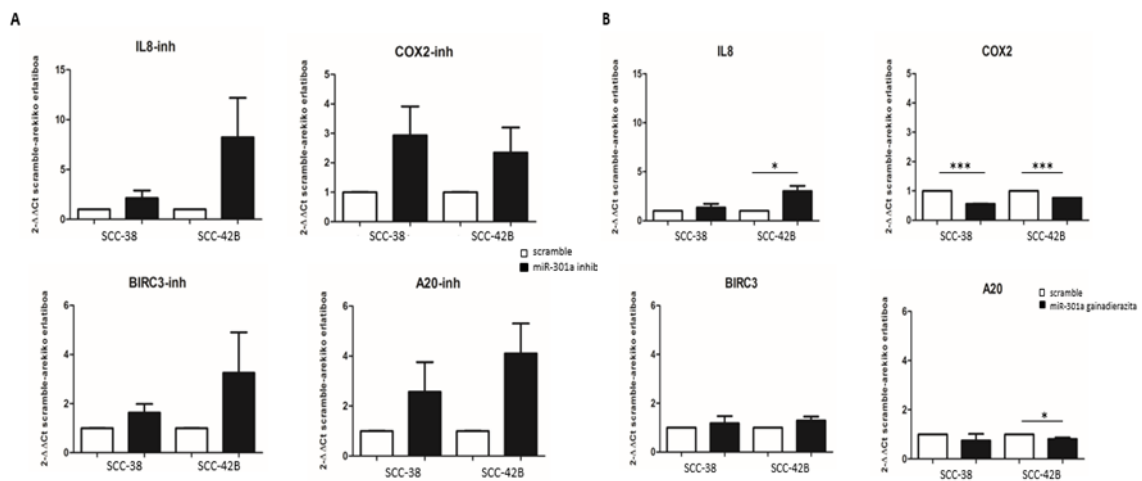
Gene Set Name [# Genes (K)]	Description	# Genes in Overlap (k)	k/K	p-value	FDR q-value
HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB [200]	Genes regulated by NF-kB in response to TNF [GeneID=7124].	8		2.63 e ⁻¹⁵	3.15 e ⁻¹¹

5. irudia: A. MiR-301a-ren inhibizioak SCC-42B zelula lerroaren gene adierazpenean nola eragiten duen aztertzeko adierazpen array-aren errepresentazioa. Lehenengo 3 zutabeetan inhibizioa jasandako lerroaren triplikatuak jarriziren, eta azken 3 zutabeetan SCR-ren triplikatuak. **B.** Array-aren emaitzak interpretatzeko GSEA datu basean lortutako emaitzak.

a) Adierazpen array-aren balioztatzea

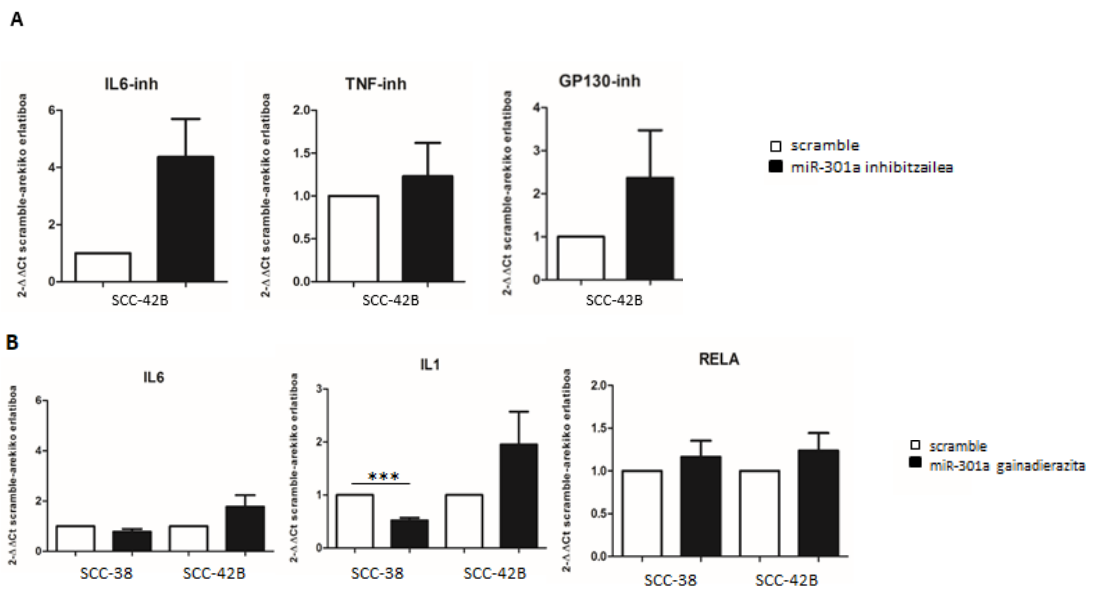
Emaitza hauek balioztatzeko, hauetako 4 generen adierazpena neurtu zen qPCR bidez inhibizioa jasandako zelula lerroetan: COX2 (PTGS2), A20 (TNFAIP3), IL8 (CXCL8) eta BIRC3. Aztertutako lau geneetan, adierazpenaren igoera esangarria izan zen, SCC-42B lerroan batik bat ($2^{-\Delta\Delta Ct} > 2$, 6A irudia). Gene hauek NF-κB bidezidorrean parte hartzen dutela jakinda, seinaleztapen bide hau miR-301a-ren adierazpenaren menpe egotearen hipotesia proposatu zen.

Hipotesi hori aztertzen jarraitzeko asmoz, SCC-38 eta SCC-42B zelula lerroetan miR-301a-gainadierazi zen lentivirus bidez eta lau geneen neurketa berdinak egin ziren. 6B irudian ikus daitekeen moduan, COX2 eta A20 geneen adierazpena estatistikoki esangarriki jaitsi zen bi zelula lerroetan. IL8 geneak adierazpena igotzeko joera erakutsi zuen SCC-42B lerroan, baina inhibitzailearekin baino adierazpen maila baxuagoa erakutsi zuen eta BIRC3-ren adierazpena ez zen aldatu.



b) NF-κB -ak erregulatu dituen geneen adierazpena

MiR-301a-k NF-κB bidezidorra erregulatu duen ikusteko, NF-κB bidezidorrean parte hartzen duten 3 generen adierazpena (IL6, GP130 eta TNFα) neurtu zen miR-301a inhibituta zuten SCC-42B lerroko zeluletan. IL6 eta GP130 geneen adierazpen igoera esangarria izan zen egoera honetan baina TNFα-rena ez zen aldatu. (7A irudia, $2^{-\Delta\Delta Ct} > 2$). Bestetik, NF-κB bidezidorrean parte hartzen duten beste 3 generen neurketak ere egin ziren miR-301a gainadierazten zuten zeluletan: IL6, IL1 eta RELA-renak (7B irudia). Azken hori NF-κB konplexuaren p65 transkripzio faktorearen genea da. SCC-38 lerroan IL1 genea isilarazita agertu zen, eta SCC-42B lerroan, aldiz, ez. IL6 geneak gainadierazteko joera erakutsi zuen SCC-42B lerroan eta RELA-ren adierazpena ez zen aldatu bi zelula lerroetan.



7. irudia: NF-κB bidezidorrean parte hartzen duten geneen adierazpena 72 ordutara neurtu zen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodoaren bidez.

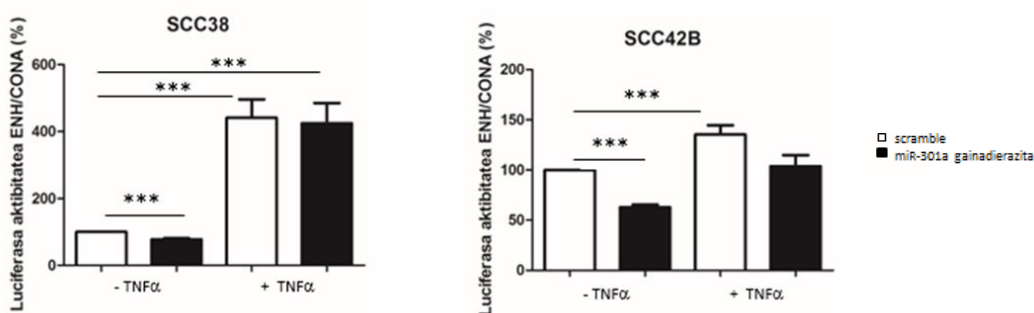
A. Bidezidorreko geneen adierazpen aldaketa miR-301a inhibititu ondoren. **B.** MiR-301a-ren gainadierazpenak eragindako adierazpen aldaketak. *** $p < 0,001$ Mann-Whitney-ren U testa.

4.4 NF-κB seinaletapen bidearen inplikazioaren azterketa luciferasa saioen bidez

Azkenik, NF-κB bidezidorrean miR-301a-k duen inplikazioa aztertzeko, ConA eta $3 \times \kappa\beta$ ConA plasmidoak transfektatuta zituzten lerroen *Firefly* luciferasa seinaleak neurtu ziren. Gainera, TNFα-ren estimulazioak seinalearen intentsitatean zuen eragina ere aztertu zen.

8. irudian ikus daitekeen moduan, SCC-38 lerroan TNFα-rik gabeko eta miR-301a gainadierazita zuten zeluletan luciferasa intentsitatearen jaitsiera estatistikoki esangarria izan zen ($p < 0,0001$). Gainera, TNFα-k eragindako estimulazioak seinalearen intentsitatearen igoera nabarmena eragin zuen, baina honek ere gainadierazpenak eragindako seinalearen esperotako jaitsiera balio gabetu

zuen. SCC-42B lerroan ere esperotakoa bete zen: TNF α -rik gabeko zelulen kasuan *Firefly* luciferasaren intentsitate jaitsiera estatistikoki esangarria gertatu zen ($p < 0,0001$). Kasu honetan, aldiz, TNF α bidezko estimulazioa emanda ere, miR-301a gainadierazitako zeluletan ere luciferasa seinalearen jaitsiera nabaritu zen. Beraz, bi zelula lerroetan miR-301a-ren gainadierazpenak NF- κ B bidezidorra isilarazten duela egiaztatu ahal izan da.



8. Irdia. MiR-301a-ren gainadierazpenak NF- κ B menpeko transkripzioa inhibitzen du. SCR (zutabe zuriak) eta miR-301a (zutabe beltzak) gainadierazten dituzten SCC-38 eta SCC-42B zelulak 48 ordutan zehar transfektatu ziren 3x κ B ConA eta ConA plasmidoekin. Transfektatutako zelulak TNF α -rekin induzitu ziren (10ng/ml) hazkuntzaren azken 5 orduetan, eta jarraian luciferasa aktibitatea neurtu zen. Luciferasa aktibitatea ConA plasmidoenarekin eta TNF α -rekin tratatu gabeko SCR-rekin erlatibizatu zen. *** $p < 0,001$ Mann Whitney-ren U testa.

5. EZTABAIDA

LSCC duten pazienteen biziraupen maila hobetu eta metastasien garapena ekiditeko asmotan, gaixotasun honen detekzio goiztiarra eta tratamendu eraginkor bat aurkitzea garrantzitsua da. LSCC-an hainbat miRNA-en adierazpena aldatuta dagoela eta beraien erregulazioa gaixotasuna kontrolatzeko gai izan daitekeela ikusi da ⁽⁹⁾. Horregatik, lan honetan kartzinoma bihurtzen diren displasietan gainadierazita ageri ohi den miR-301a-ren funtzioa aztertu zen, bere inhibizioa eta gainadierazpena eraginez.

Lehendabizi, miR-301a-ren inhibizioa frogatu ondoren zelulen proliferazioa aztertu zen eta SCC-38 eta SCC-42B zelula lerroen hazkuntza moteltzeko gai zela ikusi zen. Jarraian, inhibizioak zein generen adierazpenean eragiten zuen aztertu zen adierazpen array-en bidez eta TNF α -k induzitutako NF- κ B seinaleztapen bideko hainbat generen adierazpena (COX2, A20, IL8, BIRC3, IL1, ATF3) nabarmen igo zela ikusi zen. Horietariko batzuen eta bidezidorrean parte hartzen zuten beste bi generen gainadierazpena (IL6 eta GP130) qPCR bidez ere frogatu ahal izan zen.

Gainera, miR-301a-ren gainadierazpenak NF- κ B bidean nola eragiten zuen aztertu zen qPCR eta luciferasa erreportaridun 3x κ B ConA plasmidoen bidez. Luciferasa seinalearen detekzioaren saioretan, SCC-38 eta SCC-42B lerroetan miR-301a-ren gainadierazpenak NF- κ B bidearen isilpena eragin zutela frogatu zen, eta TNF α -ren estimulazioa bidezidorra aktibatzeke gai zela. Emaiza hau, qPCR bidez ere ondorioztatu zen. miR-301a gainadieraztean, NF- κ B bidezidorrean parte hartzen duten COX2 eta A20-ren adierazpena nabarmen jaitsi zen eta alderantziz, miR-301a inhibitzean, gene horien adierazpena igo egin zen. NF- κ B aktibatzean gainadierazten diren geneak aztertzean, miR-301a gainadieraztean IL1 jaisten dela eta miR-301a inhibitzean IL6-ek igotzeko joera duela ikusi zen. Gene bakoitza bi egoera eta bi zelula lerroetan analizatu ez baziren ere, datuak beste emaitzekin bat datoz.

Lan hau osotasunean hartuta, LSCC-tan gainadierazten den miR-301a-k NF- κ B inaktibatzen duela frogatu dugu eta miR-301a-ren inhibizioak zelulen proliferazioa moteltzen duela. Emaiza hauek ez dira hasiera batean espero genituenak. Izan ere, ikerketa kliniko eta oinarrizkoek frogatu dute NF- κ B transkripzio faktorea HNSCC-n konstituzionalki adierazten dela eta NF- κ B-ren iraunkortasunaren ondorio direla minbizi zelulen ugalketa, biziraupena, inbasioa, metastasia eta pazienteen biziraupen eskasa ^(17,18,19).

NF- κ B seinaleztapen bide oso konplexua da. Inflamazioan, immunitatean, zelulen hazkuntzan eta apoptosian parte hartzen du eta hainbat zitokinen bidez aktibatzen da. Zitokina horietako bat TNF α da eta era honetan aktibatzean, apoptosia induzitzen da kaspasa kaskada medio. HNSCC zelula lerroetan ikusi da, ordea, TNF α -k ez duela apoptosia induzitzen ⁽²⁰⁾. Era berean, NF- κ B-ak, TNFR-ri lotutako TRAF1 eta TRAF2 eta cIAP1 eta cIAP2 kaspasa faktore inhibitzaileak induzitzen ditu, zelulak TNF α -k induzitutako apoptositik babesteko ⁽²¹⁾. Bestalde, zelula ezkatatsuen kartzinomen kasuan, NF- κ B bidezidorrak isilduta egoteko joera duela ere ikusi da ⁽²²⁾ eta ondorioz, zelula ezkatatsuen estres oxidatiboa handitu eta DNA kalteak pilatzen direla.

Ondorioz, guzti hau kontutan izanik, gure emaitzek miR-301a-k prozesu horretan parte hartzen duela iradokitzen dute. Hau da, miR-301a-k TNF α -k induzitutako NF- κ B bidezidorra erregulatzen duela zelulak apoptositik babesteko, kartzinometarako bilakaera bultzatuz. Hipotesi hau frogatzeko, etorkizunera begira miR-301a gainadierazi nahiz inhibitzean apoptosiarekin zer gertatzen den ikertzea komenigarria litzateke. Inhibizioak hazkuntzan eragiten duen jaitsiera apoptosiak eragindakoa den ikustea, adibidez, NF- κ B bidezidorrean parte hartzen duten proteinen aktibazio egoera western-blot bidez analizatu beharko da, miR-301ak inaktibatzen duela frogatzeko. Bestalde, DNA kalteen pilaketarik dagoen ikertzea ere oso interesgarria litzateke.

6. ONDORIOAK

Lan honen bitartez, miR-301a-ak LSCC-an funtzio garrantzitsua duela frogatu ahal izan da. Izan ere, bere erregulazioak zelulen proliferazioan eta NF- κ B bidezidorrean eragiten du. Honek, LSCC-ko zelulen proliferazio indartsua eta apoptosia inhibitzeko joera azaldu ahalko luke.

Hala ere, etorkizunera begira interesgarria izango litzateke miR-301a-ren itu zuzena zein den ikertzea, seinaleztapen bidearen portaera hobeto ulertu ahal izateko. Gainera, miR-301a-ren erregulazioak zelulen apoptosian, migrazioan, inbasioan edota kimioerresistentzian duen eragina aztertzea ere komenigarria litzateke. Honela, miR-301a-ren potentzial terapeutikoa ezagutu eta LSCC-ren tratamendurako itu egokia den jakin ahal izango litzateke.

7. ESKER ONAK

Azkenik, eskerrak eman nahi dizkiot nire zuzendaria izan den Lorea Manterolari, proiektu honetan parte hartzeko aukera emateagatik. Prozesu osoan zehar asko lagundu dit eta bere ezagupenak momentu osoan partekatu ditu nirekin, nire gaitasunak garatzen lagunduz.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Lu, Y., Gao, W., Zhang, C., Wen, S., Huangfu, H., Kang, J., and Wang, B. (2015). Hsa-miR-301a-3p acts as an oncogene in laryngeal squamous cell carcinoma via target regulation of Smad4. *Journal of Cancer*, 6(12), 1260
2. Marioni, G., Marchese-Ragona, R., Cartei, G., Marchese, F. and Staffieri, A: Current opinion in diagnosis and treatment of laryngeal carcinoma. *Cancer Treat Rev* 32: 504-515, 2006.
3. Ganly, I., Patel, S. G., Matsuo, J., Singh, B., Kraus, D. H., Boyle, J., & Shah, J. P. (2009). Predictors of outcome for advanced-stage supraglottic laryngeal cancer. *Head & neck*, 31(11), 1489-1495.
4. Califano, J., Van Der Riet, P., Westra, W., Nawroz, H., Clayman, G., Piantadosi, S., and Sidransky, D. (1996). Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research*, 56(11), 2488-2492.
5. Califano, J., Westra, W. H., Meininger, G., Corio, R., Koch, W. M., and Sidransky, D. (2000). Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clinical Cancer Research*, 6(2), 347-352.
6. Weller, M. D., Nankivell, P. C., McConkey, C., Paleri, V., and Mehanna, H. M. (2010). The risk and interval to malignancy of patients with laryngeal dysplasia; a systematic review of case series and meta-analysis. *Clinical otolaryngology*, 35(5), 364-372.
7. Chang, T. C., and Mendell, J. T. (2007). microRNAs in vertebrate physiology and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 8, 215-239

8. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., and Rassenti, L. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15524-15529.
9. McManus, M. T. (2003, August). MicroRNAs and cancer. In *Seminars in cancer biology*. Vol. 13, No. 4, pp. 253-258. Academic Press.
10. Li, P., Yang, Y., Liu, H., Yang, A.K., Di, J.M., Tan, G.M., Wang, H.F. and Ye J. (2017). MiR-194 functions as a tumor suppressor in laryngeal squamous cell carcinoma by targeting Wee1. *Journal of Hematology & Oncology*. 25 Jan 2017, 10(1):32
11. Wang, B., Lv, K., Chen, W., Zhao, J., Luo, J., Wu, J., Li, Z., Qin, H., Wong, T.S.,... and Lei, W.. (2016) miR-375 and miR-205 Regulate the Invasion and Migration of Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Synergistically via AKT-Mediated EMT. *Biomed Res Int*. Epub 2016 Dec 19.
12. Zhou, P., Jiang, W., Wu, L., Chang, R., Wu, K., and Wang, Z. (2012). miR-301a is a candidate oncogene that targets the homeobox gene Gax in human hepatocellular carcinoma. *Digestive diseases and sciences*, 57(5), 1171-1180.
13. Chen, Z., Chen, L. Y., Dai, H. Y., Wang, P., Gao, S., and Wang, K. (2012). miR-301a promotes pancreatic cancer cell proliferation by directly inhibiting bim expression. *Journal of cellular biochemistry*, 113(10), 3229-3235
14. Cui, L., Li, Y., Lv, X., Li, J., Wang, X., Lei, Z., and Li, X. (2016). Expression of MicroRNA-301a and its Functional Roles in Malignant Melanoma. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(1-2), 230-244.
15. Lu, Y., Gao, W., Zhang, C., Wen, S., Huangfu, H., Kang, J., and Wang, B. (2015). Hsa-miR-301a-3p acts as an oncogene in laryngeal squamous cell carcinoma via target regulation of Smad4. *Journal of Cancer*, 6(12), 1260
16. Moore, L.B., and Kyriakides, T.R.. (2015). Molecular Characterization of Macrophage-Biomaterial Interactions. *Adv Exp Med Biol*. 2015; 865: 109–122.
17. Chen, Z., Malhotra, P.S.... and Thomas, GR,. (1999) Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5: 1369–1379.
18. Ondrey, F.G., Dong ,G., Sunwoo, J.. (1999) Constitutive activation of transcription factors NF-(j)B, AP-1, and NFIL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog* 1999;26:119–129. 9.
19. Zhang, P.L., Pellitteri, P.K... and Law, A.(2005) Overexpression of phosphorylated nuclear factor-j B in tonsillar squamous cell carcinoma and high-grade dysplasia is associated with poor prognosis. *Mod Pathol* 2005;18:924–932.
20. Duffey, D.C., Crowl-Bancroft, C.V.... and Chen, Z..(2000) Inhibition of transcription factor nuclear factor-jB by a mutant inhibitor-jBa attenuates resistance of human head and neck squamous cell carcinoma to TNF-a caspase-mediated cell death. *Br J Cancer* 2000;83:1367–1374.
21. Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V. and Baldwin, A.S. Jr. (1998) NF-jB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase- 8 activation. *Science* 1998;281:1680–1683.
22. Hoyerlinden, M., Rozell, B.L, Ahrlund-Richter, L., Toftgård, R.. (1999) Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signalling. *Cancer Res*. 15;59(14):3299-303.