

Jun Hu

Dr.med

## **FUNCTIONAL ANALYSIS OF MICRORNAS MIR-451 AND MIR-144 IN BILIARY TRACT CANCER**

Fach/Einrichtung: Pathologie

Doktorvater: apl. Prof. Dr. Kai Breuhahn

Gallengangskarzinome, welche Gallenblasenkarzinome einschließen, sind die zweithäufigste Form von Leberkrebs und eine der tödlichsten Erkrankungen weltweit. Die radikale Resektion ist die einzige Möglichkeit, um Gallengangskarzinom zu heilen. Aufgrund des Mangels an Biomarkern für die Früherkennung ist jedoch bei nur 30% der Patienten eine Operation möglich, und die Rezidivrate ist hoch. Bisher wurde keine wirksame adjuvante Behandlung von Gallengangskarzinomen entwickelt. Deshalb ist ein besseres Verständnis der Mechanismen der Gallengangskarzinogenese erforderlich. MiRNAs können verschiedene essentielle Funktionen regulieren und haben sich als vielversprechende Ziele für die Diagnose und Therapie anderer Krebsarten erwiesen. Das Ziel dieses Projektes war es den Zusammenhang zwischen miRNAs und dem Fortschreiten von Gallengangskarzinomen zu untersuchen.

Mittels miRNA-Profilung untersuchte ich den Unterschied der miRNA-Expression zwischen Gallenblasenkarzinomen und normalem Gallenblasengewebe. Diese Analysen zeigten, dass miR-451 und miR-144, die sich im selben Cluster befinden, in Gallenblasenkarzinomen signifikant herunterreguliert sind. Durch funktionelle Analyse demonstrierte ich, dass eine Überexpression von miR-451 oder miR-144 die Migrationsfähigkeit von Gallengangskarzinomen signifikant hemmt, und die Hemmung war durch die Koexpression des miR-144-451-Cluster verstärkt. In Kombination mit Daten aus öffentlichen miRNA-Zieldatenbanken und Luciferasetests wurde ATF2 als direktes Ziel von miR-451 identifiziert, was durch qRT-PCR sowie Western Blot weiter bestätigt wurde. Durch ATF2-Knockdown und Rescue-Experimente wurde bestätigt, dass miR-451 die Migration von Gallengangskarzinomzellen in einer ATF2-abhängigen Weise unterdrückt. Darüber

hinaus wurde c-Jun als Downstream-Target der miR-451-ATF2-Achse nachgewiesen. C-Jun spielte bei der Hemmung der Zellmigration eine wichtige Rolle. Durch die Behandlung von 5-Aza-2'-desoxycytidin konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der DNA-Methylierung eine Möglichkeit darstellt, die Expression von miR-451 und miR-144 in Gallengangskarzinomen zu erhöhen.

Zusammenfassend zeigen die hier präsentierten Daten, dass sowohl miR-451 als auch miR-144 als Tumorsuppressoren in Gallengangskarzinomen fungieren. Die miR-451-ATF2-c-Jun-Achse könnte ein vielversprechender Ansatz für eine frühzeitige Diagnose oder eine effektivere Therapie dieser tödlichen Krankheit sein, und die Hemmung der DNA-Methylierung könnte ein interessanter Weg für die Therapie von Gallengangskarzinomen sein.

Biliary tract cancer is the second most common type of hepatobiliary cancers and one of the most lethal diseases worldwide. Radical surgery is the only choice to cure this malignancy, however, because of lack of biomarkers for early diagnosis, only 30% patients are eligible for surgery, and relapse is frequent. The adjuvant treatment for biliary tract cancer is still ineffective. These all present an urgent need for a much more profound insight into the mechanism of carcinogenesis of biliary tract cancer. MiRNAs can regulate various essential functions, and have been confirmed as good targets for diagnosis and therapy in various types of cancers. Therefore, in this project, I aimed to find the relationship between miRNAs and biliary tract cancer progression.

Using miRNA profiling, I investigated the difference of miRNA expression between gallbladder cancer tissues and normal gallbladder tissues. MiR-451 and miR-144, which are located in the same cluster, were found significantly downregulated in gallbladder cancer tissues. Through functional analysis, overexpression of miR-451 or miR-144 was found to inhibit migration ability of biliary tract cancer cell significantly, and the inhibitory ability may be enhanced via co-expression of the miR-144-451 cluster. Combined with data from public miRNA target prediction database and luciferase assays, ATF2 was identified as a direct target of miR-451, which was further confirmed by qRT-PCR as well as Western blot. Through ATF2 knock down and

restoration experiments, miR-451 was confirmed to suppress biliary tract cancer cells migration in an ATF2 dependent way. Moreover, c-Jun was demonstrated as a downstream target of the miR-451-ATF2 axis and played an important role in cell migration inhibition. Furthermore, via treatment of 5-Aza-2'-deoxycytidine, I revealed that inhibition of DNA methylation might be a way to rescue the expression of miR-451 and miR-144 in gallbladder cancer.

Taken together, the data presented here support that both miR-451 and miR-144 could play as tumor suppressors in biliary tract cancer. The miR-451-ATF2-c-Jun axis might be a promising approach to early diagnosis or more effective therapy for this fatal disease, and DNA demethylation is also an interesting way for therapy of biliary tract cancer.