

Vplyv elektromagnetického poľa a miR-34a-5p na proliferáciu, migráciu a expresiu *cry1* v bunkovej línii kolorektálneho karcinómu DLD1

Soňa Jendrisková, Iveta Herichová

Univerzita Komenského v Bratislave, Prírodovedecká fakulta, Katedra živočíšnej fyziológie a etológie, Mlynská dolina, Ilkovičova 6, 842 15 Bratislava, Slovenská republika;
jendriskova1@uniba.sk

Abstract

Effect of the electromagnetic field and miR-34a-5p on proliferation, migration and expression of *cry1* in the colorectal carcinoma cell line DLD1

miRNAs and the circadian system were previously found to be involved in the regulation of colorectal cancer (CRC). We discuss the possible procarcinogenic effect of electromagnetic field (EMF) in the context of the electromagnetic-sensitive molecule, cryptochrome (*cry1*). Therefore, we investigated the effect of miR-34a-5p and EMF on migration, proliferation and gene expression of *cry1* in CRC cell line DLD1 under *in vitro* conditions. Changes in migration of DLD1 cells, which were altered by the interaction of EMF and miR-34a were not observed. Transfection of mimic pre-miR-34a significantly inhibited proliferation of DLD1 cells after 24 h treatment in control condition while transfection of mimic pre-miR-34a in EMF condition did not show an inhibition effect on proliferation of DLD1 cells. Moreover, transfection of mimic pre-miR-34a show a significantly increased level of *cry1* only in EMF condition.

Keywords: circadian; colorectal cancer; *cry1*; TP53

Úvod a formulácia cieľa

Hladiny miRNA, endogénne regulátory génovej expzie, môžu byť ovplyvnené rôznymi patologickými ochoreniami, vrátane kolorektálneho karcinómu (KRC) [1]. Hladina miR-34a-5p s tumorsupresorovými účinkami je v tkanivách KRC deregulovaná. Hasakova a kol. (2019) preukázali zvýšenú expresiu miR-34a-5p v nádorových tkanivách, na druhej strane Zhang a kol. (2017) dokázali zníženie expzie miR-34a-5p v nádorových tkanivách v porovnaní so zdravým príľahlým tkanivom. Oboma štúdiami bolo preukázané, že hladina miR-34a-5p je asociovaná s prítomnosťou metastáz. Navyše, hladina miR-34a-5p pozitívne koreluje s prežívaním pacientov [2-3].

Tumorsupresorový účinok miR-34a-5p bol preukázaný inhibíciou expzie regulátorov bunkového cyklu: cyklínu E2, cyklín dependentnej kinázy 6, transkripčného faktora E2F5 a inhibíciou expzie antiapoptického proteínu Bcl-2. Fyziologický efekt transfekcie miR-34a-5p *in vitro* bol dokázaný na úrovni inhibície proliferácie, migrácie, invazivity a metastázovania a tiež proapoptickým účinkom [4-5].

Génová expzia môže byť ovplyvnená nielen endogénne, prostredníctvom miRNA, ale aj environmentálnymi faktormi – ako je elektromagnetické pole (EMF), ktoré Medzinárodná

agentúra pre výskum rakoviny (IARC) v roku 2011 klasifikovala ako potenciálne karcinogénne pre ľudí. Existujú *in vitro* aj *in vivo* štúdie potvrdzujúce karcinogénny vplyv rádiofrekvenčného EMF no na druhej strane štúdie, ktoré nepreukazujú žiaden vplyv EMF na fyziologické parametre [6-9].

Expresia hodinového génu *cryptochrome* (*cry1*) je v tkanivách KRK signifikantne znížená v porovnaní so zdravým príľahlým tkanivom. Prežívanie pacientov s vyššími hladinami *cry1* bolo signifikantne horšie v porovnaní s hodnotami expresie rovnými alebo menšími ako medián hodnôt expresie *cry1* v sledovanej kohorte [10]. Zároveň existujú dôkazy o senzitivite *cry1* na expozíciu EMF [11].

Cieľom našej práce bolo zistiť, či faktor EMF a miR-34a-5p prípadne interakcia faktorov prispieva k regulácii expresie *cry1*, bunkovej proliferácii a migrácii bunkovej línie kolorektálneho karcinómu DLD1. Zároveň bolo našim cieľom zistiť, či aplikácia miR-34a-5p a EMF môžu súvisieť s migráciou alebo proliferáciou buniek, keďže jednou z charakteristík nádorového bujnenia je zvýšená proliferácia a tiež zmeny v migračnej aktivite buniek.

Materiál a metódy

V *in vitro* pokusoch bola použitá bunková línia DLD1 odvodená od ľudských buniek KRK. Bunková línia DLD1 bola kultivovaná v médiu RPMI 1640 s 5 - 10% FBS a antibiotikami pri 37°C a 5% CO₂. Po trypsinizácii, boli DLD1 bunky transfekované pomocou lipofektamínu (RNAiMAX reagent, Thermofisher, USA) transfekčnou zmesou, ktorá obsahovala mimic a/alebo inhibítor miR-34a, respektíve ich príslušnú negatívnu kontrolu rozpustenú v OptiMEM médiu (Thermofisher, USA). Transfekcia prebiehala podľa pokynov výrobcov (Thermofisher, USA). Finálna koncentrácia transfekovaných olíg v bunkovej suspenzii bola 100 nmol. Vysiate DLD1 bunky boli rozdelené podľa faktora EMF na kontrolnú a experimentálnu skupinu, ktorá bola vystavená pôsobeniu 2.4 GHz s intenzitou 70 mW/m². Zdrojom EMF bol WiFi router D-Link GO-RT-N150 (2.4 GHz), ktorý bol umiestnený v inkubátore, pričom platničky s DLD1 bunkami boli od zdroja vzdialené 6 cm. Bunky v kontrolnej skupiny boli obalené izolačnou fóliou YSHIELD HNV100. Ostatné podmienky boli pre obe skupiny rovnaké. Transfekované oligá: hsa-pre-miR-34a mimic (AM17100), hsa-pre-miR-34a negative control (AM17111), hsa-miR-34a-5p mimic (4464066), hsa-miR-34a-5p negative control (4464058), hsa-miR-34a-5p inhibitor (4464084).

Za účelom analýzy migrácie DLD1 buniek boli na 24 jamkové platničky vysiate transfekované DLD1 bunky. Následne, po 24 hod inkubácii, bola urobená wound healing esej. Vytvorené jazvy boli dokumentované pomocou mikroskopu NIB-100F (NOVEL, Čína) a

programu BEL Capture 3.2 (NOVEL, Čína) hneď po vytvorení jazvy a po 24 hod inkubácii v podmienkach (EMF aj kontrola). Migrácia buniek bola vyhodnotená pomocou programu TScratch (ETH, Švajčiarsko).

Proliferácia DLD1 buniek bola hodnotená 24 hod po vysiatí transfekovaných DLD1 buniek. Pričom transfekované DLD1 bunky boli inkubované v kontrolných podmienkach aj v podmienkach EMF. Na analýzu proliferácie bol použitý kit CellTiter 96 AQueous Cell Proliferation Assay (Promega, USA). Po 3 hod inkubácii DLD1 buniek s roztokom MTS/PMS bola spektrofotometricky odmeraná absorbancia pri 490 nm.

Transfekované DLD1 bunky určené na izoláciu mRNA a miRNA boli inkubované v oboch podmienkach (kontrola, EMF) po dobu 48 hod (každá skupina bola hodnotená z 8 jamiek 24 jamkovej platničky). Za účelom izolácie RNA z DLD1 buniek sme použili RNA-reagent (MRC, USA) ďalej sme postupovali podľa pokynov výrobcu. Na polyadenyláciu bol použitý primer so sekvenciou 5' - CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTT - 3'. Reakčná zmes (na jednu vzorku) sa skladala z: 1,3 µl vody, 4 µl 5x buffer, 2 µl 25 mM MnCl₂, 2 µl 10 mM ATP a 0,7 µl enzýmu E-PUB 2U/µl. Na reverznú transkripciu bol použitý kit: Reverse Transcription System (Promega, USA). Génová expresia bola analyzovaná prostredníctvom real time PCR a kitu: QuantiTect SYBR Green PCR Kit (1000) (QIAGEN, Nemecko). Celkový počet cyklov reakcie bol 40 s programom: aktivácia (95°C, 15 min), denaturácia (94°C, 15s), anelácia (s17,cry1: 49°C, 30s; hsa-miR-34a-5p: 60°C, 30s), syntéza (s17,cry1: 72°C, 30s; hsa-miR-34a-5p: 70°C, 30s), záverečná syntéza (s17,cry1: 72°C, 2 min; hsa-miR-34a-5p: 70°C, 2 min). Pomocou real time PCR bola odmeraná expresia génu *cry1*, *miR-34a-5p*. Dáta boli normalizované na housekeeper *s17*.

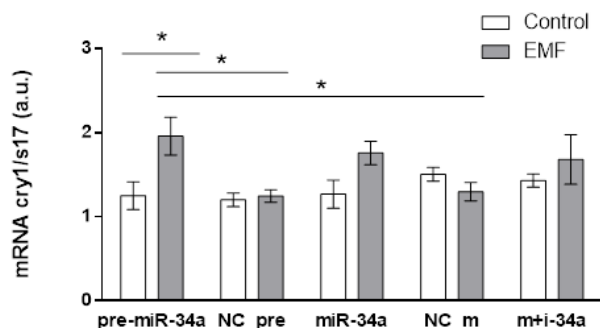
Na štatistické vyhodnotenie experimentov sme použili dvojfaktorovú ANOVU (faktor EMF a faktor transfekovaných olíg) a Tuckey post hoc test. Za signifikantne preukazné boli považované rozdiely vykazujúce $p < 0,05$.

Výsledky a diskusia

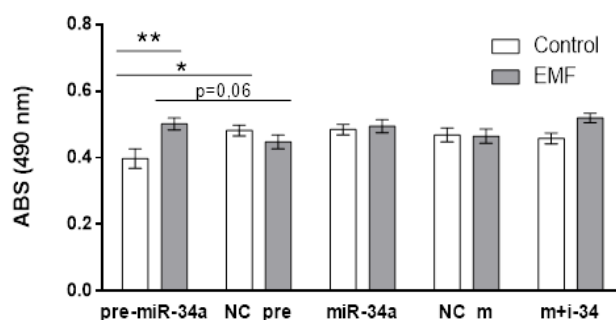
Preukázali sme signifikantný vplyv interakcie elektromagnetického poľa a miR-34a-5p v bunkovej línii DLD1 na expresiu hodinového génu *cry1*. Transfekcia mimic pre-miR-34a v skupine s faktorom EMF viedla k signifikantne zvýšenej expresii *cry1* ($p < 0,05$) v porovnaní s negatívnou kontrolou (NC_pre, NC_m) (Obr. 1.). Na druhej strane, aplikácia mimic pre-miR-34a v kontrolných podmienkach nezmenila expresiu hodinového génu *cry1* (Obr. 1.).

Naše výsledky preukázali signifikantný vplyv interakcie transfekovaných olíg a EMF na proliferáciu DLD1 buniek. Aplikácia funkčného analógu pre-miR-34a znížila proliferáciu u

kontrolných ($p < 0,05$) ale nie u EMF vystavených DLD1 buniek (Obr. 2.). Transfekcia funkčného analógu pre-miR-34a do DLD1 buniek v skupine s faktorom EMF preukázala trend ($p = 0,06$) k zvýšeným hodnotám proliferačnej aktivity v porovnaní s jej negatívnou kontrolou.



Obr. 1. Expresia hodinového génu *cry1* Transfekcia mimic pre-miR-34a v skupine s faktorom elektromagnetického poľa (EMF) viedla k upregulácii *cry1* v porovnaní s negatívnou kontrolou (NC_pre) aj s (NC_m). Expresia *cry1* po aplikácii mimic pre-miR-34a bola signifikantne vyššia v skupine v s faktorom EMF v porovnaní so skupinou v kontrolných podmienkach (Control) (ANOVA, Tukey post hoc test, $p < 0,05$)



Obr. 2. Analýza proliferačnej aktivity DLD1 buniek Transfekcia mimic pre-miR-34a v skupine s kontrolnými podmienkami (Control) viedla k zníženiu proliferačnej aktivity v porovnaní s jej príslušnou negatívnou kontrolou (NC_pre) (ANOVA, Tukey post hoc test, $p < 0,05$). Proliferačná aktivita po aplikácii mimic pre-miR-34a preukázala trend k zvýšeným hodnotám ($p = 0,06$) v porovnaní s jej negatívnou kontrolou (NC_pre) a po aplikácii mimic pre-miR-34a bola proliferácia signifikantne vyššia v skupine v s faktorom elektromagnetického poľa (EMF) v porovnaní so skupinou v kontrolných podmienkach (Control) (ANOVA, Tukey post hoc test, $p < 0,01$)

Naše výsledky sú v súlade so štúdiou, kde aplikácia funkčného analógu miR-34a-5p viedla k signifikantne zníženej proliferácii v porovnaní s negatívnou kontrolou v bunkovej línii KRK - HCT116. Znížená proliferačná aktivita vplyvom aplikovanej miR-34a bola dokázaná aj v bunkovej línii KRK - SW480, ktorá má mutovaný gén *TP53* [5,12]. V dostupnej literatúre zatiaľ nie sú výsledky naznačujúce, že by EMF stimulovalo proliferačnú aktivitu, napriek tomu sme v našej štúdii pozorovali neprítomnosť inhibície proliferácie aplikovanou pre-miR-34a v skupine s faktorom EMF. Filipovic a kol. (2014) dokázali opačný efekt pôsobenia EMF na

proliferáciu buniek, a teda, že expozícia 50 Hz s výstupným napätím 9.1 V a prúdovým zosilňovačom do 1A na bunkovú líniu SW480 viedla k signifikantne zníženej proliferácii v porovnaní s kontrolou. Tento efekt však nebol potvrdený na bunkovej línii HCT116 [13].

Mazzoccoli a kolektív (2016) potvrdili, že po ektopickej expresii *cry1* bola v bunkových líniiach KRK (HT29 a SW480) signifikantne zvýšená proliferácia buniek v porovnaní s kontrolou. Vyššia miera proliferácie bola po ektopickej expresii *cry1* u bunkových línii s mutovaným génom pre p53 (HT29 a SW480) v porovnaní s bunkovými líniami s wildtype *TP53* (CaCo2 a HCT116) [10]. V dostupnej literatúre nie je známa priama regulácia *cry1* prostredníctvom miR-34a. *In silico* analýza uvádza, že expresia *cry1* môže byť inhibovaná prostredníctvom miR-34a-5p [14], avšak naša analýza to nepotvrdila (Obr.1.). Naopak, potvrdili sme upreguláciu *cry1* po aplikácii pre-miR-34a, ale len v súčinnosti s EMF

Domnievame sa, že súčinnosť faktorov pôsobenie EMF a pre-miR-34a môže viesť k dereguláciám génovej expresie *cry1* a pravdepodobne aj iných génov. Naša štúdia poukazuje na možnú dereguláciu účinkov tumorsupresorovej miR-34a-5p vplyvom EMF. Predpokladáme tak na základe toho, že znížená proliferácia bola potvrdená aplikáciou pre-miR-34a len v kontrolných podmienkach, a nie v podmienkach EMF. Zároveň, transfekcia pre-miR-34a do bunkovej línii DLD1 mala vplyv na expresiu *cry1* len v skupine EMF, a nie v kontrolných podmienkach. Navyše, existujú dôkazy o senzitivite *cry1* na expozíciu EMF [11]. Napriek tomu, že výsledky štúdií analyzujúce vplyv EMF aj v súvislosti s inými faktormi nie sú konzistentné, a nie je známy ani možný mechanizmus pôsobenia EMF na nádorové bunky, naša štúdia poukazuje na možný negatívny účinok elektromagnetického poľa a to aj v súvislosti s aplikáciou miR-34a-5p.

Účinok miR-34a-5p v súčinnosti s faktorom EMF na expresiu *cry1* je možné hypoteticky vysvetliť tak, že elektromagnetické pole môže ovplyvňovať interakciu medzi pre-miR-34a a inhibítorom *cry1*. Interakcia faktorov miR-34a a EMF nemala vplyv na migračnú aktivitu DLD1 buniek. V dostupnej literatúre sa však uvádza, že transfekcia miR-34a-5p do bunkovej línii HCT116 viedla k signifikantne zníženej migračnej aktivite. Na druhej strane, zníženie migračnej aktivity nepotvrdili v bunkovej línii HCT116, ktorá mala mutovaný gén *TP53*. Bunková línia DLD1 použitá v našom experimente má tiež mutáciu v géne pre tumorsupresor p53. Predpokladáme, že práve kvôli mutácii v géne pre p53 sme v našom experimente nepozorovali inhibíciu migračnej aktivity po aplikácii miR-34a-5p. Naše výsledky tiež ukazujú, že faktor EMF neovplyvňuje migračnú aktivitu DLD1 buniek. Avšak, v dostupnej literatúre bola potvrdená regulácia migračnej aktivity na bunkovej línii keratinocytov (HaCaT),

kde expozícia EMF (0,5 V/cm) po 15 min viedla k zvýšenej rýchlosti migrácie buniek a migrácii smerom k anóde [15].

Záver

Naše výsledky ukazujú, že EMF v súčinnosti s miR-34a-5p má kapacitu ovplyvňovať fyziologické parametre ako génová expresia a proliferácia buniek. Transfekcia pre-miR-34a významne znížila proliferáciu v porovnaní s jej negatívnou kontrolou v kontrolných podmienkach, avšak nie v skupine s faktorom EMF. Analýza tiež potvrdila upreguláciu hodinového génu *cry1* po aplikácii funkčného analógu pre-miR-34a v porovnaní s negatívnou kontrolou v skupine s faktorom EMF. Na druhej strane, efekt zvýšenej expície *cry1* nebol preukázaný v kontrolných podmienkach. V našej práci sme nepotvrdili vzťah medzi miR-34a-5p a EMF na migráciu DLD1 buniek.

PodĎakovanie

Práca bola podporená grantami VEGA-1/0679/19, APVV-16-0209, APVV-20-0241.

Zoznam použitej literatúry

- [1] O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., et al. (2018) *Front Endocrinol.* 9, p. 402
- [2] Zhang X., Ai F., Li X., et al. (2017) *Oncol. Lett.* 14(2), p. 2325
- [3] Hasakova K., Reis R., Vician M., et al. (2019) *PLoS One* 14, p. e0224396
- [4] Bommer G.T., Gerin I., Feng Y., et al. (2007) *Curr. Biol.* 17(15), p. 1298
- [5] Gao J., Li N., Dong Y., et al. (2015) *Oncogene.* 34(31), p. 4142
- [6] Shayeghan M., Forouzesh F., Madjid Ansari A., et al. (2021) *Med. Oncol.* 38(10), p. 125
- [7] International agency for research on cancer (IARC) [24.3.2021] <https://www.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/07/pr208_E.pdf>
- [8] Akdag M. Z., Dasdag S., Canturk F., et al. (2016) *J. Chem. Neuroanat.* 75, p. 116
- [9] Regalbuto E., Anselmo A., De Sanctis S., et al. (2020) *Int. J. Mol. Sci.*, 21, p.7069
- [10] Mazzoccoli G., Colangelo T., Panza A., et al. (2016) *Mol. Cancer.* 15, p. 6
- [11] Zeng Z., Wei J., Liu Y., et al. (2018) *ACS Omega* 3(5), p. 4752
- [12] Zhang Q., Wang J., Li N., et al. (2018) *Am. J. Cancer Res.* 8(2), p. 280
- [13] Filipovic, N., Djukic, T., Radovic, M. et al. (2014) *Cancer Cell Int.* 14, p. 84
- [14] Sticht C., De La Torre C., Parveen A., et al. (2018) *PLoS ONE* 13(10), p. e0206239
- [15] Cho Y., Son M., Jeong H., et al. (2018) *Mol. Biol. Cell.* 29(19), p. 2292