

Flavonoid kivonat, zöldtea kivonat, japán viaszbogó kivonat, kávé
kivonat, olívaolaj és transz-zsírsv hatása a DMBA indukálta LINE-1
DNS-metilációra

Ph.D. tézisfüzet

Szabó László



Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Bódis József

Programvezető: Prof. Dr. Kiss István

Témavezető: Prof. Dr. Kiss István

**Pécsi Tudományegyetem
Egészségtudományi Kar
Egészségtudományi Doktori Iskola**

Pécs, 2022

1. Bevezetés

A WHO adatai szerint 2018-ban az újonnan regisztrált rosszindulatú daganatos megbetegedések esetszáma világszerte kb. 18,1 millió volt és az elhunytak száma megközelítette a 9,6 milliót, még az egyre szélesebb körben elérhető szűrővizsgálatok, a diagnosztikai módszerek fejlődése, és a célzott terápiák alkalmazása ellenére is. Tehát a rosszindulatú daganatos megbetegedések korai diagnosztizálása és a megelőzés továbbra is a leghatékonyabb stratégia az incidencia és a mortalitás csökkentésére. A megelőzésben kiemelten jelentős szerep jut az egészséges táplálkozásnak és a dohányzás elkerülésének, a korai diagnózisban pedig a megfelelő biomarkerek használatának.

A rákkeltő élelmiszerek egy része és a dohányfüst is tartalmaz karcinogén 7,12-dimetilbenz[a]antracén (DMBA) vegyületet, ami állatkísérletesen is használható daganatmodellekben. Ezen felül a transz-zsírsavak (TFA) jelentős táplálkozási eredetű ártalmat képviselnek. Ezzel szemben számos kemopreventív vegyület fejt ki daganatbiológiai szempontból védő hatást, például a polifenolokban gazdag növényi részek vagy az extraszűz olíva (*Olea europaea*) olaj, a zöldtea (*Camellia sinensis*), a japán viaszbogó (*Myrica rubra*), valamint a kávé (*Coffea arabica*).

Ezen tényezők reprezentatív biomarkere a Long Interspersed Element-1 (LINE-1) retrotranszpozon DNS szakasz promóter régiójának a metiláltsági állapota. A megalapozottság ellenére viszont eddig kevés vizsgálat történt a DMBA karcinogénnel indukált LINE-1 DNS hipometilációval kapcsolatban.

Dolgozatom témája a fentiek alapján a táplálkozási eredetű karcinogén anyagok és a kemopreventív molekulák hatása a LINE-1 transzpozon metilációs mintázatára. A téma további jelentősége, hogy a kemopreventív anyagok a megelőző stratégiák részeként az ártalmas korai epigenetikus változásokat visszafordíthatják.

2. Célkitűzés

Tanulmányomban állatkísérletesben vizsgálatam a LINE-1 DNS metilációs mintázatát va DMBA-val előkezelt egerek májában, lépében és veséiben. A kísérlet célja annak

meghatározása volt, hogy ezek a karcinogén/kemopreventív hatások hogyan jelennek meg a LINE-1 DNS metilációs mintázataiban, a vizsgált kemopreventív anyagok milyen mértékben képesek megakadályozni a DMBA által okozott hipometilációt, és felhasználhatók-e ezen hatások potenciális biomarkerként. További cél volt a TFA hatásának a vizsgálata a DMBA által okozott LINE-1 DNS hipometilációra, hogy vajon képes volt-e azt erősíteni, vagy sem?

3. Anyag és módszer

A vizsgálatunk során nyolc csoport 12 hetes nőstény CBA/Ca egeret használtunk (n=6). A kezeletlen kontroll és a DMBA-val kezelt kontroll csoportok nem kaptak előtáplálást, míg egy-egy állatcsoport a szokásos étrend mellett két hétig a DMBA kezelés előtt:

1. 4 mg/nap/állat zöld tea (*C. sinensis*) kivonatot (katekin tartalom 80%) (Xi'an Longze Biotechnology Co. Ltd.),
2. 2,5 mg/nap/állat japán viaszbogó (*M. rubra*) kivonatot (miricetin [3,5,7,3', 4', 5'-hexahidroxi-flavon] tartalom: 80 %) (Xi'an Longze Biotechnology Co. Ltd.),
3. 30 mg/nap/állat flavonoid kivonatot (közönséges szőlő (*Vitis vinifera* "Cabernet Sauvignon") mag és héj, szeder (*Rubus fruticosus* "Thornfree") mag és héj, fekete ribiszke (*Ribes nigrum*) mag és héj, hozzáadott rezveratrol 4 gramm 100 ml-ben, nevezetesen FruitCafe™ (SC Vita Crystal Research SRL)),
4. 30 mg/nap/állat (150 ml) kávé (*C. arabica*) kivonatot,
5. 300 mg/nap/állat olívaolajat (Agraria Riva Del Garda SCA), illetve
6. 300 mg/nap/állat TFA-t (transz-3-hexadecénsav) (Sigma Aldrich) kapott.

A kezeletlen (negatív kontroll) kontrollcsoport kivételével a másik hét csoport 20 mg/testsúlykilogramm DMBA-t kapott intraperitoneálisan (Sigma-Aldrich), 0,1 ml kukoricaolajban feloldva. (A kezeletlen kontroll csoport is kapott 0,1 ml kukoricaolajat intraperitoneálisan). A 24 órás DMBA-expozíciót követően nyaki diszlokáció után eltávolítottuk a vizsgálandó szerveket (máj, vesék és lép).

3.1. A DNS izolálása

A DNS izolálását a High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Madison, WI, USA) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint.

3.2. LINE-1 DNS-metiláció vizsgálata

A biszulfát-konverzióhoz EpiTect Bisulfite kitet (Qiagen, Hilden, Németország) használtunk a gyártó utasításai szerint. Ez a folyamat a nem metilezett citozinek uracillá történő átalakítását eredményezte. Ezt követően nagy felbontású olvadáselemzést (HRM) végeztünk, amely az olvadáspont különbség alapján képes volt megkülönböztetni az uracil és a metilált citozin bázisokat. Ha a DNS erősen metilált régiókat tartalmaz, a biszulfit átalakítás és az azt követő amplifikáció magasabb olvadáspontot eredményez.

A HRM-elemzéshez a LINE-1 CpG-gazdag régióját célzó primereket használtunk (Newman, 2012), a szekvenciák a következők voltak: forward: 5'-GGT TGA GGT AGT ATT TTG TGT G-3', reverse: 5'- TCC AAA AAC TAT CAA ATT CTC TAA C-3'. Az amplifikációt 96 lyukú lemezekben, Roche LightCycler480 qPCR készülékben (Roche, Madison, WI, USA) végeztük. A reakciómix 20 ng biszulfit kezelt DNS-t, 0,75-0,75 µM előre- és fordított primert, 1x LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche, Madison, WI, USA) 20 µl végső mennyiségben tartalmazott (Bray, 2018). A PCR paraméterei a következők voltak: 5 percig 95°C-ra történő melegítés, majd 35 ciklus következett: 1. 95°C 20 másodpercig, 2. 60°C 30 másodpercig, 3. 72°C 20 másodpercig. Ezt követően az olvadáspont/olvadási görbe elemzését 73°C és 84°C között végeztük 0,1°C/2 sec hőmérsékletlépésekkel.

Pozitív és negatív kontrollok céljára Mouse high methylated genomic DNA-t (EpigenDx, Hopkinton, MA, USA) és Mouse low methylated genomic DNA-t (EpigenDx, Hopkinton, MA, USA), valamint ezek különböző arányú keveréseit használtuk, hogy lehetővé váljon a mintáink metilációs szintjének számszerűsítése.

3.3. Számítás és statisztikai elemzés

A LINE-1 expressziós szintek relatív LINE-1 metilációs szintjeit a $2^{-\Delta\Delta CT}$ módszerrel kiszámoltuk és összehasonlítottuk. Az eredmények eloszlásának vizsgálatát a Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük, majd az átlagok egybevetésére a Levene-féle F-próba után t -próbát használtunk. Az IBM SPSS 21 statisztikai szoftverével végeztük a számításokat és az elemzéseket, a statisztikai szignifikancia szintjét $p < 0,05$ -értéknél határoztuk meg.

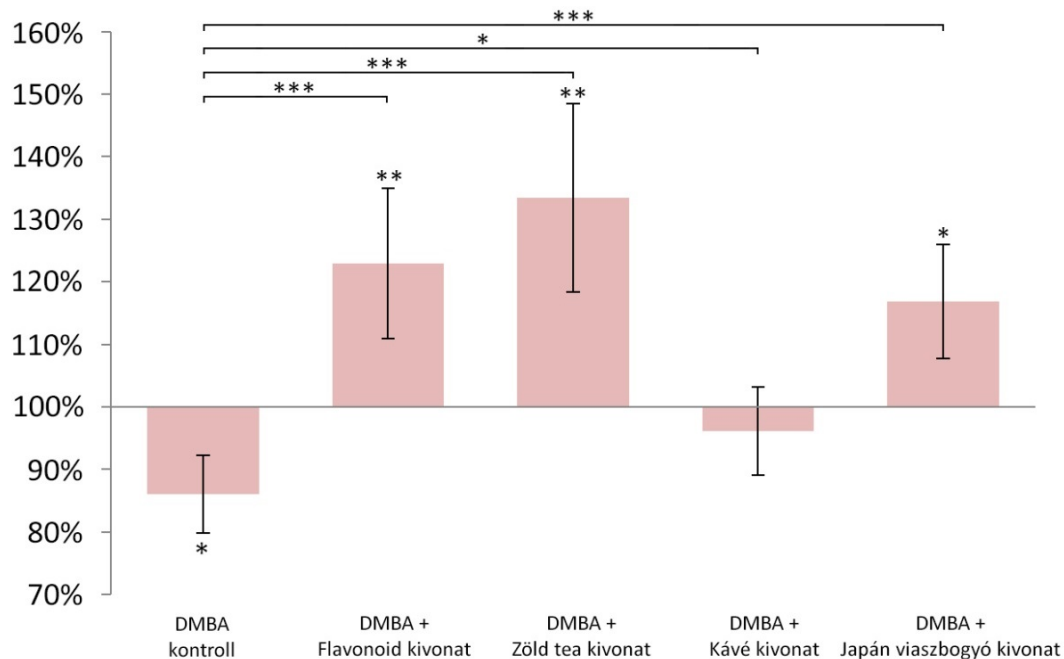
Az átlagos DNS-metilációs szinteket a kezelés nélküli állatok (negatív kontrollok) százalékában fejeztük ki.

4. Eredmények

Az önmagában DMBA-val kezelt kontrollhoz képest a DMBA és az alkalmazott anyagok együttes hatását vizsgáltam a LINE-1 metilációra.

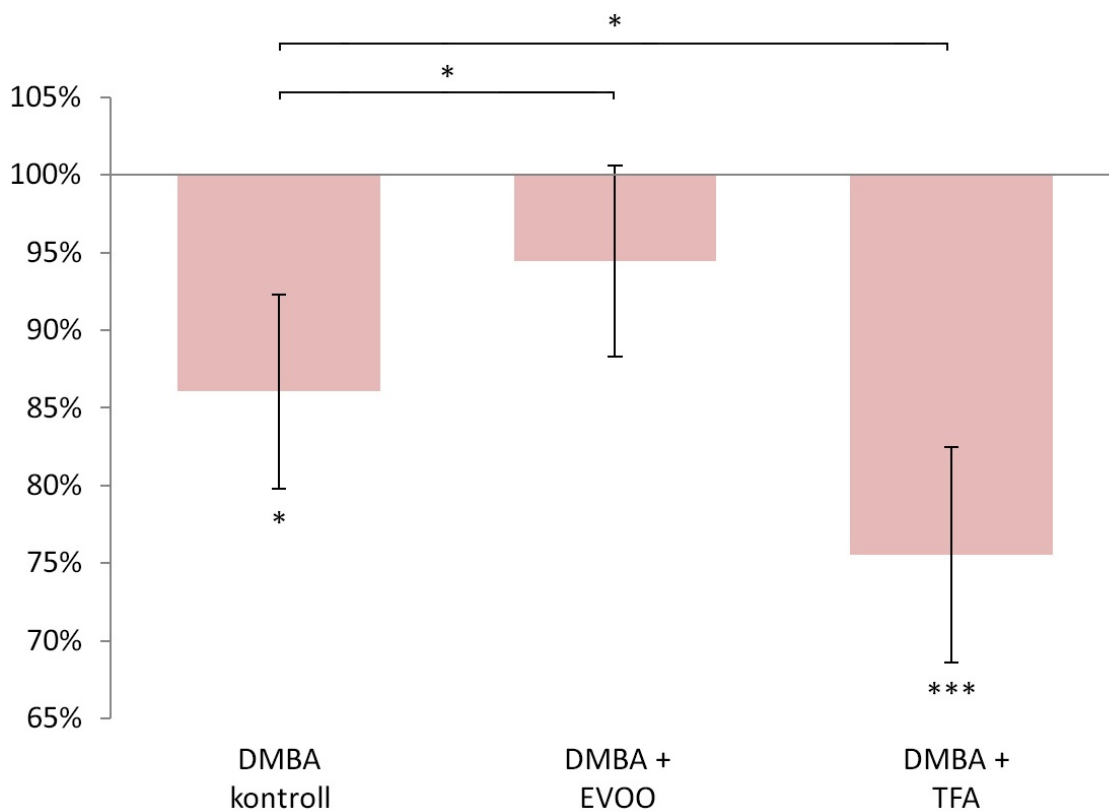
4.1. Metilációs mintázatok változásai a lépben

A lép esetében DMBA-val együtt adott flavonoid kivonat, zöld tea kivonat és japán viaszbogó kivonat kivédte a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációt, sőt kifejezetten ellenkező irányú változást – hipermetilációt – idézett elő. A kávé kivonat esetében kismértékű hipometilációt tapasztaltunk (1. ábra).



1. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) lépében DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg flavonoid kivonat, zöld tea kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogó kivonat hatására, a kezeletlen kontrollt száz százaléknak tekintve (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – az oszlopok feletti és alatti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét, a vízszintes vonalaknál levő jelölések a DMBA-kezelt csoporttal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét mutatják).

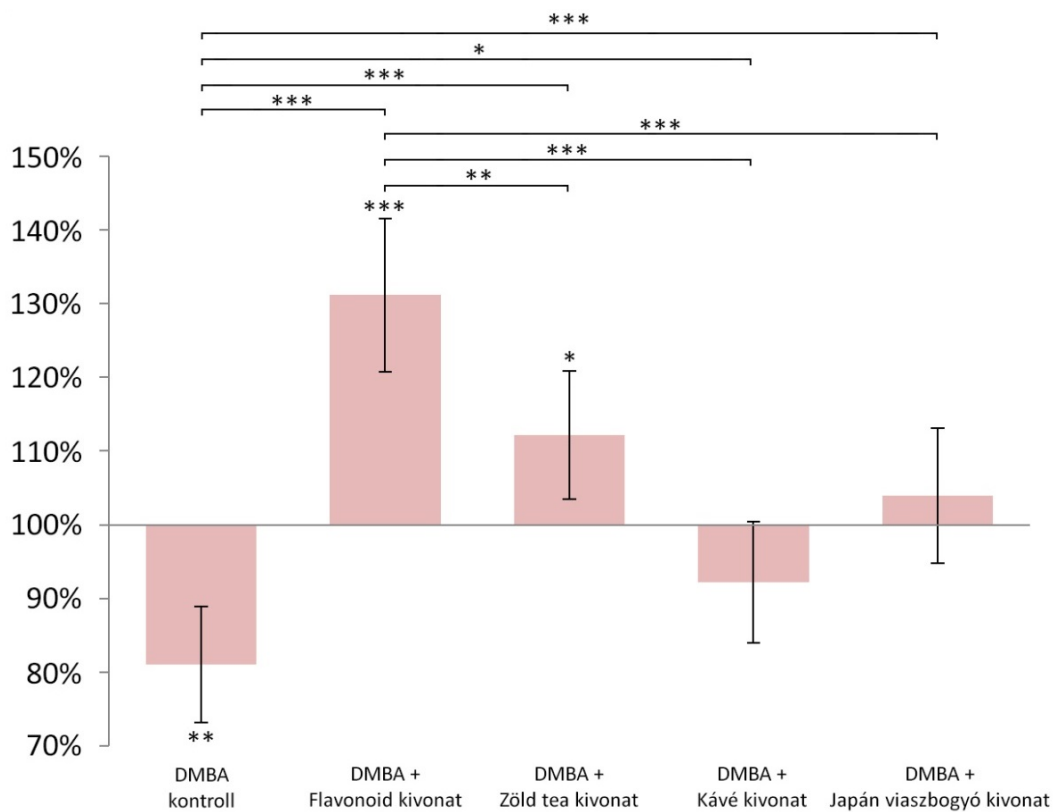
A lépben a DMBA-val együtt adott EVOO számottevően csökkentette, a TFA viszont jelentős mértékben fokozta a DMBA által okozott LINE-1 hipometilációt (2. ábra).



2. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőtény egerek (n=6) lépében DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg EVOO vagy TFA hatására, a kezeletlen kontrollt száz százaléknak tekintve (* $p < 0,05$; * $p < 0,001$ – az oszlopok alatti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikancia-szintjét, a vízszintes vonalánál levő jelölések a DMBA-kezelt csoporttal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét mutatják).**

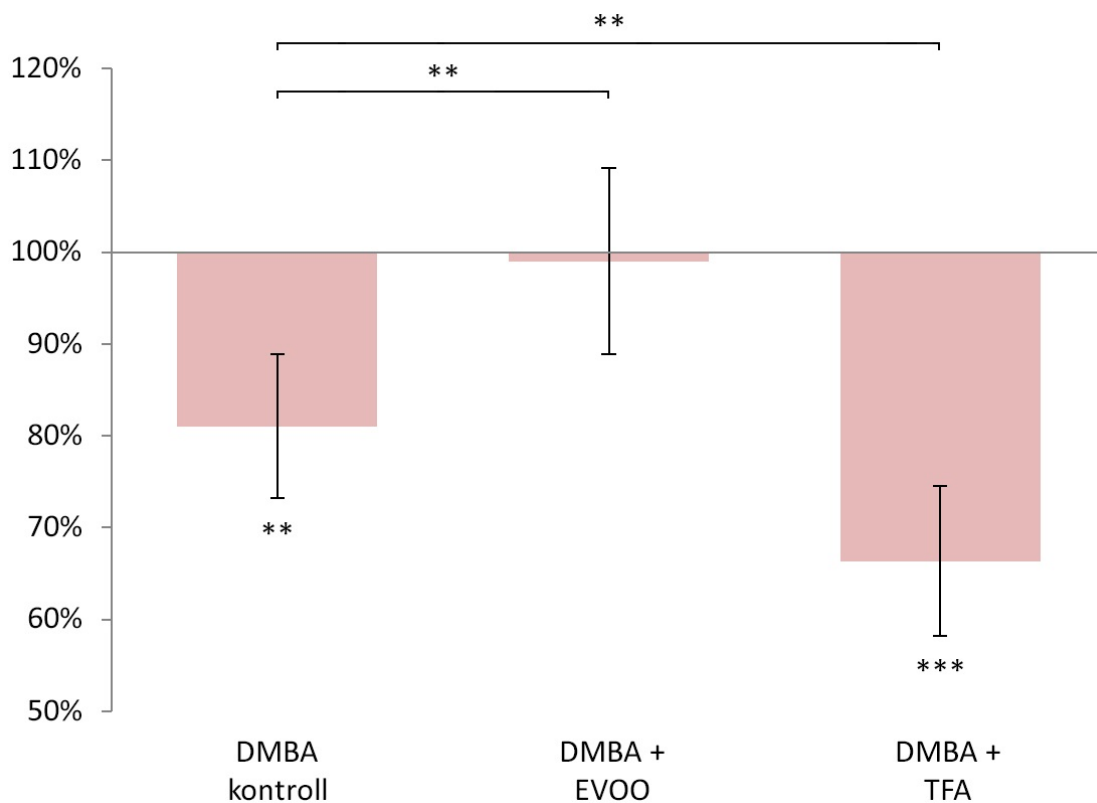
4.2. Metilációs mintázatok változásai a májban

A máj esetében DMBA-val együtt adott flavonoid kivonat, és zöld tea kivonat sikeresen kivédte a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációt, sőt hipermetilációt eredményeztek. A japán viaszbogó kivonat és a kávé kivonat is statisztikailag szignifikáns védő hatást mutattak, ami a kávé esetén kismértékű hipometilációt tapasztaltunk (3. ábra).



3. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) májában DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg flavonoid kivonat, zöld tea kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogó kivonat hatására, a kezeletlen kontrollt száz százaléknak tekintve (* p<0,05; ** p<0,01; * p<0,001 – az oszlopok feletti és alatti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét, a vízszintes vonalaknál levő jelölések a DMBA-kezelt csoporttal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét mutatják).**

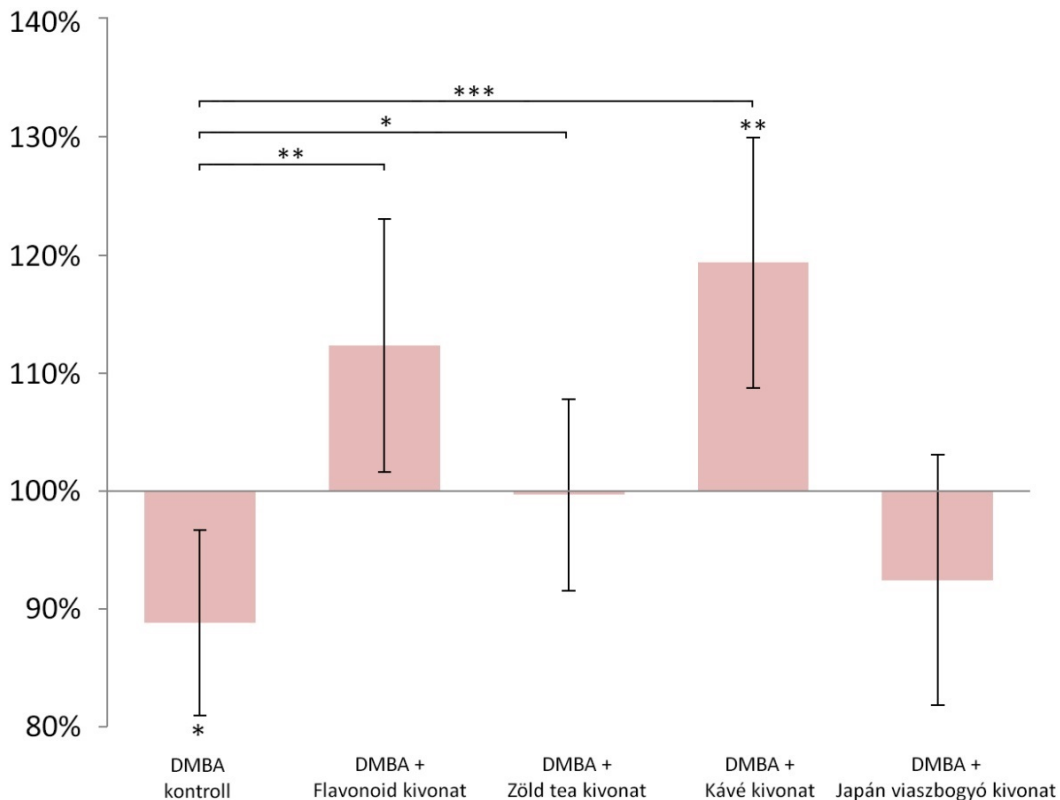
A léphez hasonlóan a máj esetében is DMBA-val együtt adott EVOO kivédte a LINE-1 hipometilációt, míg a TFA tovább fokozta azt (4. ábra).



4. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) májában DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg EVOO vagy TFA hatására, a kezeletlen kontrollt száz százaléknak tekintve (p<0,01; *** p<0,001 – az oszlopok alatti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikancia-szintjét, a vízszintes vonalánál levő jelölések a DMBA-kezelt csoporttal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét mutatják).**

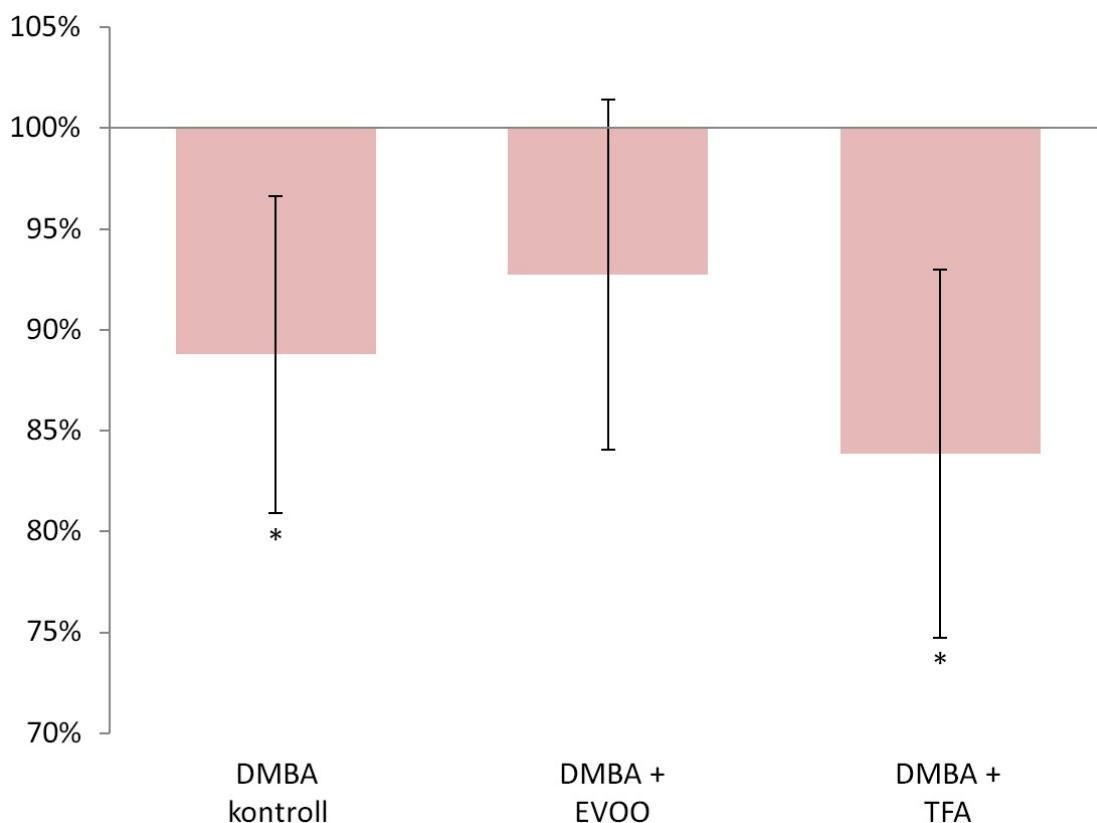
4.3. Metilációs mintázatok változásai a vesékben

A vesékben a flavonoidok, a kávé kivonat és a zöld tea kivonat kivédtek a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációt, míg a japán viaszbogó kivonat kis mértékű, statisztikailag nem szignifikáns csökkenést okozott. A flavonoid kivonat és a kávé kivonat a kezeletlen kontrollhoz képest is hipermetilációt okozott, ami a kávé esetén volt statisztikailag szignifikáns (5. ábra).



5. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) veséiben DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg flavonoid kivonat, zöld tea kivonat, kávé kivonat vagy japán viaszbogó kivonat hatására, a kezeletlen kontrollt száz százaléknak tekintve (* p<0,05; ** p<0,01; * p<0,001 – az oszlopok alatti és feletti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét, a vízszintes vonalaknál levő jelölések a DMBA-kezelt csoporttal való összehasonlítás szignifikanciaszintjét mutatják).**

A vesékben a DMBA-val együtt adott EVOO csökkentette, a TFA fokozta a LINE-1 hipometilációt. A 6. ábra mutatja az arányokat, illetve azt, hogy a DMBA-kezelt csoporthoz képest egyik összetevő sem okozott statisztikailag szignifikáns változást.



6. Ábra: LINE-1 metilációs mintázat CBA/Ca nőstény egerek (n=6) veséiben DMBA, valamint DMBA-val egyidejűleg EVOO vagy TFA hatására, a kezeletlen kontrollt száz százalékknak tekintve (* $p < 0,05$ – az oszlopok alatti jelölések a kezeletlen kontrollal való összehasonlítás szignifikancia-szintjét mutatják).

4.4. Eredmények összefoglalása

Összességében a LINE-1 hipometiláció kivédésében a flavonoid kivonat és a zöld tea kivonat mutatta a legerősebb hatást a lépben és a májban. A vesékben a kávé kivonat eredményezte a legnagyobb hipermetilációt. Az EVOO vagy csökkentette, vagy kivédte a DMBA-okozta hipometilációt, de hipermetilációt nem idézett elő. A várakozásnak megfelelően a TFA mindhárom szervben fokozta a LINE-1 hipometilációt, erősítve a DMBA hatását.

5. Megbeszélés

5.1. A DMBA hatása a LINE-1 metilációs mintázatra

A DMBA hatásai lehetnek egyrészt közvetlenek, például a sejtalkotókra (DNS, fehérjék, membránok, stb) kifejtett oxidatív stressz, vagy a DNS-t érő direkt mutagén, és epigenetikai (pl. gén- és mikroRNS expresszió, globális DNS hipometiláció) hatások. Másrészt a DMBA közvetett hatásokat is kifejt a sejtosztódás szabályozásának az onkogenezis számára kedvező irányba történő megváltoztatásával, vagy gyulladáskeltő másodlagos jelátviteli folyamatok elindításával, serkentésével, illetve antioxidánsok (például a glutation [GSH]) depléciója, stb. Az oxidatív ártalom a másodlagos jelátviteli utak aktiválásával pozitív visszacsatolást is kaphat. Például a DMBA kezelt egerekben reaktív oxigén gyökök (ROS) szabadulnak fel, amik az interleukin 1 β (IL1 β), interleukin 6 (IL6) és a tumor nekrozis faktor (TNF) mennyiségét is növelik és ezek a nukleáris faktor kappa B-val (NF- κ B) kölcsönösen aktiválják egymást – sőt még további ROS-t is képeznek. Ennek jelentősége, hogy a ROS a helyi gyulladással jelátvitel elindítása mellett közvetetten a malignus transzformáció valószínűségét is növeli és ez végső soron globális DNS hipometilációhoz vezet - aminek a biomarkere a LINE-1 metilációs mintázat. A vizsgált szervek LINE-1 hipometilációja feltehetően ezen hatások összegződésének az eredményeiből adódnak.

Tehát DMBA az NF- κ B mellett a mitogén aktivált protein kináz (*mitogen-activated protein kinase*) (MAPK) és a Janus kináz (*Janus kinase*) (JAK) jelátvivőket is aktiválja, amik a gyulladáskeltő és közvetetten az onkogenezisnek kedvező említett interleukinokat, illetve pozitív visszacsatolási hurokban a NF- κ B-t is serkenti – ami így direkt proinflammatorikus hatást is nyer és összefüggésbe hozható malignus transzformációs folyamatokkal is.

A DMBA ártalom a RAS proto-onkogén család onkogénné aktivált mutációjával és a *C-MYC* onkogén expresszió fokozásával korai karcinogenezis lépéseit elindítja. Az aktivált K-RAS protein pedig több kolorektális karcinóma sejtvonalban is képes a tumorszuppresszor gének (például az *INK4-ARF*) transzkripció faktorait hipermetilálni és ezáltal epigenetikus módon lecsendesíteni ezen tumorszuppresszor gének

expresszióit. Az aktivált K-RAS szintén gátolja a ZNF304 transzkripciós faktor lebontását, amely a tumorszuppresszor $\beta 1$ integrin transzkripciós szabályozója. Tehát ezen másodlagos jelátviteli mechanizmusok is főleg a karcinogenezist támogatják.

A DMBA szignifikáns L1-RTP DNS hipometiláló hatása a DNMT enzim gátlásán keresztül érvényesülhetett. Továbbá a DMBA szintén a DNMT enzimek említett CpG szigeteinek a metilációs mintázatát befolyásolva onkogének (például a *HA-RAS*) hipó- és tumorszuppresszor gének (például *P53*) hipermetilációját okozza, amik következképpen fokozott proliferációhoz vezetnek, növelve a karcinogenezis esélyét.

5.2. A TFA ártalmas hatásai a LINE-1 metilációs mintázatra

A TFA sejtmembrán foszfolipid rétegébe inkorporálódik és közvetetten az oxidatív károsodásokhoz is hozzájárul, illetve másodlagos szignáltranszdukciós utakon keresztül is gyulladáskeltő, daganatképző hatást fejt ki. Továbbá a TFA képes antioxidáns enzimeket, például a szuperoxid-dizmutázt (SOD) gátolni, és antioxidáns molekulákat (pl. GSH) depletálni - amik májtoxikus folyamatokhoz járulnak hozzá – és ez is közvetetten az említett gyulladásoknak, daganatképződésnek kedvez.

A TFA etetése állatkísérletesen a zsírszövetben csökkentette az n-3 többszörösen telítetlen zsírsavak (*polyunsaturated fatty acid*) (PUFA) mennyiségét a sejtmembránokban és ezzel annak a rigiditását növelte. Ehhez hozzájárul, hogy a - legalább egy transz konfigurációjú konjugált kötést tartalmazó és ezért (legalább részben) lineáris alakú - TFA szintén merevíti a membránszerkezetet. Továbbá ehhez a TFA-val összefüggésben képződő F2-izoprosztánok is hozzájárulnak. A membránfluiditás csökkenése pozitív asszociációt mutat a ROS aktivitás növekedésével a membrán foszfolipid kettősrétegén belül, illetve a gyulladás kialakulásának és a malignus transzformáció esélyével is. Így közvetlenül is hozzájárul a TFA az oxidatív ártalmakhoz is, illetve a másodlagos szignáltranszdukciós mechanizmusokon keresztül hozzájárul még a gyulladáshoz és a daganatképződéshez. Továbbá állatkísérletesen hepatocitákban és adipocitákban is a koleszterin szintézis fokozódását figyelték meg a TFA ártalommal összefüggésben, ami közvetetten a RAS géncsaládot aktiválja.

Irodalmi adatok megegyeznek eredményeinkkel, miszerint a vesékbe kisebb mennyiségben hajlamos a TFA beépülni a májhoz képest.

A TFA fogyasztás még fokozta az intercelluláris adhéziónak molekulá-1 (ICAM-1) és a vaszkuláris sejtadhéziónak molekulá-1 (VCAM-1), a mátrix metalloproteinázok (MMPk) aktivitását, amik az oxidatív stressz generálása mellett közvetetten a daganatellenes miR-134 és a *P53* gén expresszióját is gátolja.

5.3. A polifenolok hatásai a DMBA indukálta LINE-1 hipometilációra

A rezveratrol és a myricetin képes enyhíteni az említett káros hatásokat a DMBA prokarcinogén formáját karcinogénné aktiváló CYP1A1 enzimek gátlásával. A polifenol kivonatok gazdagok 4-hidroxi-benzoosavban, 4-hidroxi-fahéjsavban, flavanolban, flavonolban, antocianidinben és stilbén-polifenolokban, amelyek antioxidánsok, gyulladáscsökkentők (pl. gátolják a TNF- α -t, IL-1 β -t, IL-6-ot), daganatellenesek pl. szabályozzák a sejtek proliferációját – szinergizáló módon.

A rezveratrol megakadályozza mind az oxidatív, mind pedig a gyulladással károsodások által kiváltott *DNMT1*, *DNMT3a*, *DNMT3b* és *SIRT2* expresszió csökkenését és ezáltal kivédte az említett ártalmak által okozott LINE-1 hipometilációt. A kávé klorogénsav és hidroxi-fahéjsav (4-hidroxi-fahéjsav) tartalma, a zöldtea katechinek, a flavonoidok, valamint a rezveratrol szabadgyök-fogó hatásúak, amelyek csökkentik a ROS által okozott károsodást. Ezen túlmenően ezek az anyagok az antioxidáns SOD és a glutation S transzferáz (GST) enzimeket is indukálják.

A vizsgált polifenolok a metilációs mintázatot másodlagos jelátviteli utakon keresztül is befolyásolják, például a rezveratrol növeli a foszfátáz- és tenzin homológ gén (*PTEN*) expresszióját, ami a DNMT1 gátlásához vezet, ami daganatellenes, mivel a DNMT1 tumorszuppresszor gének promóter régióját hipermetilálja. A zöldtea epigalokatekin-gallát (EGCG) polifenolja is a DNMT1 enzim inhibitora és a P21 promóter régiójának hipometilációjával növeli a *P21* tumor szuppresszor gén expresszióját *in vivo*, függetlenül a P53 tumor szuppresszor által kiváltott jelátviteli útvonaltól.

5.4. Az EVOO hatásai

Az oleocanthal fenolos vegyület és az oleuropein polifenol az olíva olaj vízoldékony anyagai, melyek antioxidánsok és főleg sejtmembránt védik, pl. az NF- κ B aktivációját gátolják, csökkentik az *mTOR* génexpresszióját, illetve az IL-6, IL-1 β és a TNF- α szintézisét is gátolják.

Ezen felül az oleocanthal - a szabadgyökök által egyébként csökkentett - GSH intracelluláris szintjét növeli.

Az EVOO omega-9-olajsav egyszeresen telítetlen zsírsav (MUFA) és linolsav többszörösen telítetlen zsírsav (PUFA) tartalma a sejtmembrán fluiditást növeli és fent említett másodlagos jelátviteli utakon keresztül LINE-1 metilációt fokozó hatása egyértelmű. Érdekes módon a telített az EVOO palmitinsav tartalma annak ellenére, hogy a sejtmembrán rigiditását növeli in vitro a proxiszóma proliferátor-aktiválta receptor (*peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) (PPAR γ)-koaktivátor gén indukcióján keresztül globális hipermetilációt okozott. Továbbá az omega-9-olajsav és a palmitinsav a PPAR α útvonalon keresztül is kemopreventív hatást fejt ki, ami LINE-1 metilációt végső soron növeli. Az omega-9-olajsav szepszises egerekben csökkentette a TNF- α és az IL-1 β gyulladáshoz kapcsolódó interleukinek expresszióját és növelte a gyulladásgátló IL-10 mennyiségét.

A PUFA direkt β -katenin gátló hatásán keresztül a *C-MYC* gén expresszióját szignifikánsan csökkenti. Ennek jelentősége a DNS metilációs mintázatra nézve nagy, mivel a C-MYC a *ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase (TET)* gének expresszióját is befolyásolja és a TET1 tumor proliferációt fokoz, valamint a DNS-demetiláló hatású is.

5.5. Egyéb anyagok hatása a LINE-1 metilációs mintázatra

A kávéban nyomokban előforduló akril-amid és furán tartalma által okozott GSH csökkenés (és egyéb karcinogén hatások) elenyészőnek bizonyultak a LINE-1 metilációs mintázat eredményeinek szempontjából, mivel valószínűsíthetően az erőteljes jótékony hatások elfedték ezeket.

A koffein (1,3,7-trimetilpurin-2,6-dion) mind a kávé, mind a zöldtea kivonatban jelen van és a humán oszteoszarkóma MG63 sejtekben és fibroszarkóma HT1080 sejtekben is az intracelluláris cAMP szint növelésével a *PTEN* gént aktiválta. Ez a PI3-K/AKT/mTOR jelátviteli út gátlásához vezetett, ami proapoptikus hatású. Emellett JB6 sejtekben a koffein BAX és kaszpáz-3 jelátviteli utak aktiválásával P53 dependens apoptózist is indukál.

Ezzel szemben a HL-60 sejtes daganatmodellben a koffein LINE-1 hipometilációt okoz (a DNMT3 gátlásán keresztül). Ez bizonyára eltérő mechanizmussal történhet, mint a korábban említett rezveratrol és az EGCG DNMT1-et gátló antikarcinogén hatása.

Így a koffein kemopreventív hatása éppen a LINE-1 hipometilációt okozó hatása miatt kérdéses, viszont minden más molekuláris biológiai jelátviteli út az antikarcinogén hatás mellett szól. Ezen felül egy epidemiológiai vizsgálat szerint nincs összefüggés a koffein bevitel dózisa és a vizsgálat daganatok (prosztatata-, tüdő-, kolorektális- és petefészekrák) rizikója közt.

6. Az eredmények összefoglalása, következtetés

A flavonoid kivonat kivédte a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben, és a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns hipermetilációt okozott a májban és a lépben.

A zöldtea kivonat kivédte a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben, és a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns hipermetilációt okozott a májban, valamint a lépben.

A japán viaszbogyó kivonat kivédte a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában és lépében, és a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns hipermetilációt okozott a lépben.

A kávé kivonat kivédte a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben, és a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns hipermetilációt okozott a vesékben.

Az extra szűz olívaolaj kivédte a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában és lépében.

A TFA tovább erősítette a DMBA által indukált LINE-1 hipometilációt a nőstény CBA/Ca egerek májában és lépében.

Az általunk vizsgált DNS metilációs változások hozzájárulhatnak a vizsgált kemopreventív anyagok antikarcinogén, illetve a TFA esetében karcinogén hatásához, illetve biomarkerként szignifikánsan reprezentálják ezen folyamatokat. Továbbá a LINE-1 DNS hipometilációs mintázati tesztrendszer megfelelő molekuláris epidemiológiai biomarkerek tekinthetjük további potenciálisan kemopreventív anyagok epigenetikai hatásának vizsgálatához.

KÖZLEMÉNYEK LISTÁJA

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények

Szabo L, Molnar R, Tomesz A, Deutsch A, Darago R, Varjas T, Ritter Z, Szentpeteri JL, Andreidesz K, Mathe D, Hegedüs I, Sik A, Budan F, Kiss I. Olive Oil Improves While Trans Fatty Acids Further Aggravate the Hypomethylation of LINE-1 Retrotransposon DNA in an Environmental Carcinogen Model. *Nutrients*. 2022 Feb 21;14(4):908.

IF: 6,706

Szabo L, Molnar R, Tomesz A, Deutsch A, Darago R, Nowrasteh G, Varjas T, Nemeth B, Budan F, Kiss I. The effects of flavonoids, green tea polyphenols and coffee on DMBA induced LINE-1 DNA hypomethylation. *PLoS One*. 2021 Apr 20;16(4):e0250157.

IF: 3,752

Konferencia szereplések

Andreidesz K, Szabo L, Molnar R, Tomesz A, Darago R, Deutsch A, Varjas T, Ritter Zs, Szentpeteri LJ, Mathe D et al. A transz-zsírsavak súlyosbítják a LINE-1 retrotanszpozon DNS hipometilációt DMBA környezeti karcinogén modellben. 51. MEMBRÁN TRANSZPORT KONFERENCIA POSZTER ABSZTRAKTOK. 2022.

Budan F, Szabo L, Molnar R, Tomesz A, Varjas T, Ritter Zs, Szentpeteri LJ, Mathe D, Hegedus I, Sik A et al. Az extraszűz olíva olaj csökkenti a karcinogén DMBA 11-RTP DNS hipometiláló hatását. 51. MEMBRÁN TRANSZPORT KONFERENCIA POSZTER ABSZTRAKTOK. 2022.

Egyéb közlemények

Tomesz A, Szabo L, Molnar R, Deutsch A, Darago R, Raposa BL, Ghodratollah N, Varjas T, Nemeth B, Orsos Z, Pozsgai E, Szentpeteri JL, Budan F, Kiss I. Changes in miR-124-1, miR-212, miR-132, miR-134, and miR-155 Expression Patterns after 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene Treatment in CBA/Ca Mice. *Cells*. 2022 Mar 17;11(6):1020.

IF: 7,666

Molnar R, Szabo L, Tomesz A, Deutsch A, Darago R, Raposa BL, Ghodratollah N, Varjas T, Nemeth B, Orsos Z, Pozsgai E, Szentpeteri JL, Budan F, Kiss I. The Chemopreventive Effects of Polyphenols and Coffee, Based upon a DMBA Mouse Model with microRNA and mTOR Gene Expression Biomarkers. *Cells*. 2022 Apr 12;11(8):1300.

IF: 7,666

Molnar R, Szabo L, Tomesz A, Deutsch A, Darago R, Ghodratollah N, Varjas T, Nemeth B, Budan F, Kiss I. In vivo effects of olive oil and trans-fatty acids on miR-134, miR-132, miR-124-1, miR-9-3 and mTORC1 gene expression in a DMBA-treated mouse model. *PLoS One*. 2021 Feb 4;16(2):e0246022.

IF: 3,752

Tomesz A, Szabo L, Molnar R, Deutsch A, Darago R, Mathe D, Budan F, Ghodratollah N, Varjas T, Nemeth B, Kiss I. Effect of 7,12-Dimethylbenz(α)anthracene on the Expression of miR-330, miR-29a, miR-9-1, miR-9-3 and the mTORC1 Gene in CBA/Ca Mice. *In Vivo*. 2020 Sep-Oct;34(5):2337-2343.

IF: 2,09

Hegedüs I, Andreidesz K, Szentpéteri JL, Kaleta Z, Szabó L, Szigeti K, Gulyás B, Padmanabhan P, Budan F, Máthé D. The Utilization of Physiologically Active Molecular Components of Grape Seeds and Grape Marc. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(19):11165.

IF: 6,208