

Karcinogén és kemopreventív hatású anyagok tanulmányozására alkalmas,  
génexpresszió és mikroRNS expresszió változásokon alapuló korai  
biomarker vizsgálati panel kidolgozása

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

Tomesz András



Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar

Egészségtudományi Doktori Iskola

Pécs, 2022

**Pécsi Tudományegyetem**  
**Egészségtudományi Kar**  
**Egészségtudományi Doktori Iskola**

**Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Bódis József**

**Programvezető: Prof. Dr. Kiss István**

**Témavezető: Prof. Dr. Kiss István**

Karcinogén és kemopreventív hatású anyagok tanulmányozására alkalmas,  
génexpresszió és mikroRNS expresszió változásokon alapuló korai  
biomarker vizsgálati panel kidolgozása

**Doktori (Ph.D.) értekezés**

Tomesz András

Pécs, 2022

## TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	4
1. BEVEZETÉS.....	7
1.1. A daganatok kialakulását befolyásoló tényezők .....	9
1.1.1. Az örökletes tényezők szerepe.....	9
1.1.2. A sejtciklus zavara.....	10
1.1.3. Környezeti expozíciók.....	11
1.1.3.1. Fizikai és biológiai hatások.....	11
1.1.3.2. Kémiai karcinogének és a kémiai karcinogenezis.....	12
1.2. Molekuláris biomarkerek szerepe a daganatok prevenciójában.....	14
1.2.1. Mutációk vizsgálata .....	15
1.2.2. Génexpressziók vizsgálata .....	16
1.2.2.1. A vizsgálatban szereplő mTORC1 gén.....	17
1.2.3. MikroRNS expressziók vizsgálata .....	17
1.2.3.1. A miRNS-ek .....	18
1.2.3.2. A miRNS-ek biogenezeise .....	18
1.2.3.3. A miRNS-ek szerepe a génszabályozásban .....	19
1.2.3.4. A miRNS-ek mint biomarkerek .....	20
1.2.3.5. A vizsgálatban szereplő miRNS-ek .....	21
1.3. Célkitűzés .....	23
2. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	24
2.1. RNS izolálás .....	24
2.2. Reverz transzkripció polimeráz-láncreakció (RT-PCR).....	24
2.3. Számítás és statisztikai elemzés.....	25
3. EREDMÉNYEK.....	26
3.1. Az mTORC1 gén expressziójának változása .....	26
3.2. A vizsgált miRNS-ek expressziójának változása a DMBA kezelést követően .....	28
3.2.1. A vizsgált miRNS-ek expressziójának változása a májban.....	28
3.2.2. A vizsgált miRNS-ek expressziójának változása a lépben.....	31
3.2.3. A vizsgált miRNS-ek expressziójának változása a vesékben.....	34
4. MEGBESZÉLÉS .....	38
4.1. mTORC1.....	38

4.2. miR-132 .....	39
4.3. miR-212 .....	40
4.4. miR-124-1 .....	43
4.5. miR-155 .....	43
4.6. miR-330 .....	44
4.7. miR-29a .....	45
4.8. miR-9-1 és miR-9-3 .....	46
4.9. miR-134 .....	47
5. ÖSSZEFOGLALÁS .....	50
6. ÚJ EREDMÉNYEK .....	53
IRODALOMJEGYZÉK .....	54
FÜGGELÉK .....	70
KÖZLEMÉNYEK .....	71
A disszertáció alapját képző közlemények.....	71
További közlemények.....	71
Konferenciák .....	72
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	73

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

3' UTR	Three prime untranslated region
AGO-1-4	Argonaute protein
APC	Adenomatous Polyposis Coli
BCC	Basal cell carcinoma
CARHSP1	Calcium Regulated Heat Stable Protein 1
CDK	Cyclin-dependent kinase
CDK2	Cyclin-dependent kinase 2
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDK6	Cyclin-dependent kinase 6
CRC	Colorectal cancer
CYP	Cytochrome P450
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1
CYP1B1	Cytochrome P450 1B1
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
Dicer	Class 4 ribonuclease III enzyme
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthracene
Drosha	Class 2 ribonuclease III enzyme
dsRBD	Double-stranded RNA-binding domain
ER	Estrogen Receptor
FOXA1	Forkhead Box A1
GC	Gastric cancer
GCO	Global Cancer Observatory
GST	glutathione S-transferase
HB-EGF	Heparin-binding EGF-like growth factor
HBV	Hepatitis B virus
HCC	Hepatocellular carcinoma
HCV	Hepatitis C virus
HP	Helicobacter pylori
HPV	Human papillomavirus

IARC	International Agency for Research on Cancer
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGF-2	Insulin-like growth factor 2
IL-11	Interleukin 11
IL-6	Interleukin 6
ING4	Inhibitor Of Growth Family Member 4
LC	Lung cancer
LDL	Low-density lipoprotein
LDLR	Low-density lipoprotein receptor
LOXL2	Lysyl Oxidase Like 2
miRNS	mikroRNS
MMR	MisMatch Repair
MNU	N-metil-N-nitrozo-urea
mRNS	messenger RNS
mTORC1	Mammalian target of rapamycin complex 1
NA	N-nitrosamines
NAT	N-acetyltransferase
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NSCLC	Non-small-cell lung carcinoma
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
p27	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbon
PCa	Prostate cancer
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	Protein kinase C
pRb	Retinoblastoma protein
pri-miRNS	primary-miRNS
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RB1	Retinoblastoma 1 gene
RCC	Renal cell carcinoma
RhoA	Ras homolog family member A

RISC	RNA-induced silencing complex
RNSi	RNS-interferencia
ROS	Reactive Oxygen Species
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3
SOX	SRY-related HMG-box
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
TBX15	T-box transcription factor TBX15
TGF- $\alpha$	Transforming growth factor alpha
TGF- $\beta$ 1	Transforming growth factor beta 1
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
TP53INP1	Tumor protein p53 induced nuclear protein 1
TRAF6	TNF Receptor Associated Factor 6
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHL	von Hippel-Lindau
WHO	World Health Organization
XIAP	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis

## 1. BEVEZETÉS

Ez emberi szervezetben naponta 10-100 milliárd új sejt keletkezik [1]. Az ép genom biztosítása az utódsejtek számára elengedhetetlen a biológiai homeosztázis kontrollálása érdekében. A daganatos betegségek hátterében olyan biológiai változások állnak, melyek a környezeti és/vagy endogén hatások okozta mutációk felhalmozódásán keresztül a sejtek normális működésében zavart okoznak. A szabályozásban szerepet játszó fehérjék megváltozott mennyisége, funkcióvesztése vagy hiperaktivitása olyan nemkívánatos eseményeket eredményezhet, mint a sejtciklus ellenőrzésének megszűnése, a programozott sejthalál elkerülése, vagy a sejtdhézió elhagyása.

A rosszindulatú daganatok elleni küzdelem világszerte jelentős egészségügyi probléma és a várható élettartam növekedésének meghatározó akadálya, hiszen ez a betegség minden ötödik embert érinti élete során és minden nyolcadik férfi vagy tizenegyedik nő haláláért felelős. A Nemzetközi Rákkutató Ügynökség (IARC) és a Globális Rákmegfigyelő Intézet (GCO) által a daganatok incidenciájára és mortalitására vonatkozó becslések szerint 2020-ban világszerte 19,3 millió új rákos eset és csaknem 10 millió rákos elhalálozás történt [2].

A jelenlegi adatok alapján a daganatok átlagos öt éves túlélése nem éri el az 50%-ot az alkalmazott terápia töretlen fejlődése ellenére sem, így még inkább felértékelődnek a daganatos betegségek elleni küzdelemben a prevenció és korai diagnosztizálási lehetőségek. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) adatai alapján az összes malignus tumoros megbetegedés 30-50%-a megelőzhető lenne [3], valamint a korai diagnózissal általában növelhető a sikeres kezelés esélye.

Világviszonylatban a legtöbb, évente 1,8 millió halálesettel járó tumor a tüdődaganat (LC), mely a jóléti társadalmakban a vezető daganatos halálok. Az LC indukciójában résztvevő legfőbb tényezők közé például a dohányfüst, vagy a kipufogógáz olyan komponensei sorolhatók, mint a policiklusos aromás szénhidrogének (PAH), melyek *in vivo* káros hatásait laboratóriumi állatok, valamint emberek esetén is megfigyelték [4].



Az LC mellett a vastagbélrák (CRC) a legfőbb daganatos halálok, mely az összes tumoros megbetegedés 9,2%-át teszi ki. Bár a CRC kockázatát az esetek 2-5%-ában [5] olyan genetikai tényezők is növelhetik, mint a MisMatch Repair (MMR) [6] gének vagy az Adenomatous Polyposis Coli (APC) [7] gén csírvonal mutációja, számos egyéb tényező is szerepet játszik, mint az elhízás, a gyulladós bélbetegségek, a mozgásszegény életmód, a vörös húsok és/vagy feldolgozott húskészítmények fogyasztása, a dohányzás, az alkoholfogyasztás, az inzulinrezisztencia vagy a nemeket tekintve jellemzőbben a férfi nem [8].

A daganatos halálozások 8,2%-át a májdaganat (HCC) okozza, melynek legfőbb kockázati tényezői a krónikus Hepatitis B vírus (HBV) vagy a Hepatitis C vírus (HCV) fertőzés, az erős alkoholfogyasztás, vagy olyan anyagcsere-betegségek, mint az elhízás és/vagy a cukorbetegség [9].

A morbiditási és mortalitási mutatók alapján azonban a legtöbb halálesetért felelős tüdőrák csak az ötödik a daganatok letalitását tekintve, a hasnyálmirigyrákot, a májdaganatot, az agy és központi idegrendszer daganatait és a nyelőcsődaganatot követően [2]. Ezen tumortípusok esetén a magas halálozási arány okai a daganatok specifikus biológiájában, szöveti lokalizációjában, olykor a korai diagnózis nehézségeiben keresendők [10], a késői stádiumban való – akár tünetek megjelenését követő – diagnosztizálás ugyanis határozottan csökkenti az alkalmazott terápia hatékonyosságát [11].

Míg a becsült adatok szerint 2020-ban az összes megbetegedés 50%-a és a halálozások 58,3%-a Ázsiában következett be, ahol a világ népességének 59,5%-a lakik, addig az összes daganatos eset 22,8%-a és a halálozások 19,6%-a Európában fordult elő, annak ellenére hogy a világ népességének csupán a 9,7%-a él ezen a kontinensen [12]. Összességében tehát Európában a daganatos betegségek incidenciája magasabb a globális átlaghoz képest, mely azonban 8%-kal kedvezőbb gyógyulási kilátásokkal társul, ugyanis a mortalitás minden daganattípust figyelembe véve átlagosan 44%, az 52%-os globális átlaghoz képest [13]. A jobb eredményesség hátterében az egyre szélesebb körben elérhető szűrővizsgálatok, az alkalmazott diagnosztikus módszerek és a célzott terápia lehetőségei fejlődése állhat, melyek fontos elemei a betegségek

specifikus molekuláris biomarkerek vizsgálata – lehetőleg noninvazív módon – és gyors értékelése.

A magyar Nemzeti Rákregiszter adatai alapján 2010-et követően a daganatos betegségek előfordulása Magyarországon is töretlen növekedést mutat. A 2010-es év 81 858 esetszáma 2017-re egészen 104 970-ig emelkedett, mely összesen 28%-os, évente átlagosan 4%-os növekedés [14].

Magyarországon a daganatos megbetegedés a második leggyakoribb halálok, minden 4. haláleset hátterében daganatos betegség valamilyen formája áll. Az elmúlt évtized adatai alapján ez az arány inkább stagnál, minthogy javuló tendenciát mutatna. Bár a pillanatnyi mutatók a daganatos halálozások számában nem mutatnak számottevő változást, a megbetegedések növekvő előfordulása a mortalitási mutatók jövőbeli növekedését prognosztizálja.

A globalizációs hatásokkal és életmódbeli szokásokkal összefüggő kockázati tényezőket, valamint a jelenlegi tendenciákat figyelembe véve a daganatos morbiditás jelenlegi prognózisa 2040-re világviszonylatban 28,4 millió eset, ami a 2020-as becsült esetszámhoz képest 47%-os növekedést jelent [2]. Szükségszerű tehát daganatok kialakulásáért felelős hatások lehető legteljesebb megszüntetése, a széleskörű prevenció megoldások, a pontosabb diagnosztikai eljárások és a hatékonyabb terápiás módszerek együttes és folytonos fejlődése, valamint e területek eredményeinek mielőbbi gyakorlati alkalmazása lehetőleg globális szinten, nem csupán a jóléti társadalmakban.

### **1.1. A daganatok kialakulását befolyásoló tényezők**

A potenciálisan karcinogén anyagok és hatások nagyon széles köre ismert. A rosszindulatú daganatok kialakulásához a környezeti és endogén hatások, valamint az örökletes tényezők egyaránt hozzájárulhatnak. A betegség kialakulásában általában számos környezeti tényező, és ugyancsak több genetikai faktor vesz részt.

#### **1.1.1. Az örökletes tényezők szerepe**

A daganatok kialakulásának 10%-a örökletes mutációkhoz kapcsolódik [15], melyek meghatározóak lehetnek a daganat fenotípusos megjelenésének gyorsaságára, a

betegség patogenezisére és az esetleges gyógyulást követő későbbi biológiai eseményekre.

Például a gyermekeknél általában ötéves kor előtt előforduló retinoblasztóma, a fejlődő retina rosszindulatú daganata, mely az esetek 60%-ában sporadikus mutációk következménye, 40% esetén azonban örökletes, amikor is a Retinoblastoma 1 (RB1) gén egy mutáns allélja öröklődik egy normálisan működő alléllal együtt [16]. A retinoblasztóma kialakulásához végül mindkét esetben az RB1 gén mindkét alléljének elvesztése, ezáltal a sejtciklus negatív kontrolljában és a daganatsejtek progressziójában kulcsszerepet játszó [17] retinoblastoma tumorszuppresszor fehérje (pRb) funkcióvesztése vagy ritkán az n-Myc proto-onkogén aktiváló mutációja szükséges [18]. Az örökletes esetben azonban a daganat fenotípusos megjelenése gyorsabb (a sporadikus esetben átlagos 24 hónap helyett átlagosan csupán 15 hónap) és jellemzően kétoldali, tehát mindkét szemet érinti. Megfigyelték továbbá, hogy ilyenkor az esetleges gyógyulást követően az élet későbbi szakaszaiban más típusú daganatok kialakulásának a valószínűsége hatszor nagyobb (36%) a nem örökletes betegekhez képest (5,7%) [16,19].

Bár az örökletes genetikai tényezők hatással vannak a daganatfejlődésre és fokozott kockázatot jelentenek, a kulcsgének mutációjának felhalmozódásához szükség van további molekuláris eseményekre, például a sejtproliferáció során kialakuló és maradandó spontán genetikai hibákra, vagy további külső környezeti expozíciók káros hatásaira [20].

### **1.1.2. A sejtciklus zavara**

A genomi integritás fenntartása elengedhetetlen a malignus transzformáció elkerülése szempontjából. Bár a becslések szerint a DNS-replikáció hibaráta kevesebb, mint egy tévedés minden egymilliárd lemásolt bázisban [21], hibák mégis előfordulnak. Ezek szükségszerű kijavítására számos szabályozó mechanizmus ismert, melyek kontrollálják a DNS szintézist, a mitózist és a citokinézist [22]. Ha a hibásan szintetizált DNS kijavítását végző enzimek nem képesek a hibát korrigálni, a sejtnak szükségszerűen az apoptózis útjára kellene lépnie [23]. Ellenkező esetben a keletkező mutáció rögzülhet és tovább öröklődhet az utódsejtekbe, mely a mutációk felhalmozódásához, a

sejtciklus szabályozásában vagy a DNS javításában érintett gének sérülése esetén végül daganatok kialakulásához vezethet.

Előfordulhat tehát a sejtciklus zavarából adódó genetikai elváltozás, a mutációkat mégis a legtöbb esetben (80-90%-ban) a külső környezeti tényezők káros hatásai okozzák [20].

### **1.1.3. Környezeti expozíciók**

A környezeti karcinogén ágenseknek széles spektruma ismert, melyek általában DNS-károsodást váltanak ki, azaz mutagén, genotoxikus hatásúak. Epidemiológiai vizsgálatok eredményei alapján a rosszindulatú daganatok kialakulásáért jellemzően olyan életmódbeli tényezők tehetők felelőssé, mint az étrend összetétele [20], az obezitás folyamatosan növekvő tendenciái [24], a túlzott alkoholfogyasztás [25], vagy a dohányzás. Utóbbi esetében például egy nagyszabású prospektív kohorszvizsgálat, az 1951 és 2001 között zajlott British Doctors Study meggyőző statisztikai bizonyítékot szolgáltatott arra vonatkozóan, hogy a dohányzás növeli a tüdőrák kialakulásának kockázatát [26].

A környezetnek tehát óriási szerepe van a daganatok etiológiájában, legyen a környezeti expozíció kémiai, fizikai, vagy biológiai eredetű.

#### **1.1.3.1. Fizikai és biológiai hatások**

A fizikai tényezők közé tartozhatnak különböző ionizáló sugárzások, az ultraibolya sugárzás, különféle porok, rostok és kristályok (pl. azbeszt), de akár az ülőmunka is, míg a biológiai tényezők közé olyan patogéneket szokás sorolni, melyek elősegítik a karcinogenezist. Egyes vírusok direkt módon a DNS-be történő integráció útján fejtenek ki génszabályozó vagy onkogén hatást. Például a humán papillomavírus (HPV) genomja olyan onkogént tartalmaz, mely a fertőzött sejt osztódását serkenti, ezzel növeli a méhnyakrák kialakulásának a kockázatát [27]. Más patogének indirekten, például krónikus gyulladások által közvetítve támogatják daganatképződést. A *Helicobacter pylori* (HP) krónikus gyulladást okozva jelentősen megnöveli a nyombél- és a gyomorfekély, valamint a gyomorrák (GC) kialakulásának kockázatát [28]. A hepatitis vírusok okozta idült gyulladás, a karcinogenezisnek kedvező mikrokörnyezeti

változások és fokozott oxidatív stressz hatással vannak a sejtproliferációra növelve a májdaganat kialakulásának a kockázatát [29,30].

### **1.1.3.2. Kémiai karcinogének és a kémiai karcinogenezis**

A karcinogének legnagyobb csoportját a kémiai karcinogének adják. Egyes kémiai rákkeltő anyagok a DNS-hez közvetlenül, változatlan formában kötődve idéznek elő mutációt. Ilyen direkt hatású karcinogén például az N-metil-N-nitroso-urea (MNU), mely nitritekből képződik savas körülmények között (*in vitro*, de pácolt húsok fogyasztása esetén akár *in vivo* is) és képes DNS-adduktokat képezni, ezáltal tumort okozhat a vékonybélben, a vastagbélben és főként a gyomorban [31].

A legtöbb kémiai karcinogén anyag azonban indirekt karcinogén. Ilyenek például a szerves anyagok tökéletlen égésekor (pl. dohányfüst, kipufogógáz, faszénnel való grillezés stb.) keletkező PAH vegyületek, vagy az ipari élelmiszer feldolgozás során előforduló nitrózaminok (NA).

A prokarcinogének metabolizációs folyamatok eredményeként alakulnak át karcinogénekké, és daganatkeltő hatásukat csak a szükséges előzetes kémiai átalakulást követően képesek kifejteni [32]. Az aktiváló transzformációban kulcsszerepet játszó enzimek az I-es fázisú metabolizáló enzimek, melyek képesek új funkciós csoportot (pl. -OH, -SH, -NH<sub>2</sub>) kapcsolni prokarcinogén szubsztrátjaikhoz, vagy egy meglévő csoportjukat módosítani, ezáltal belőlük aktív, elektrofil metabolitokat létrehozni [33]. Az így keletkezett nagy reakcióképességű molekulák kötődhetnek a szervezetünk makromolekuláihoz és így DNS-, RNS-, vagy fehérjeadduktok jöhetnek létre. Az I-es fázisú metabolizáló enzimek legnagyobb szupercsaládja a citokróm P450 (CYP) enzimcsalád, mely számos endogén és exogén vegyület biotranszformációjának katalizálásában játszik szerepet [34,35,36].

Az I-es fázisú, aktiváló hatású metabolizáló enzimekkel összetett rendszerben működnek együtt a II-es fázisú metabolizáló enzimek. A II-es fázisú metabolizáló enzimek főként transzferázok (például N-acetil-transzferáz (NAT), vagy glutation-S-transzferáz (GST)), melyek a szubsztrájaikkal konjugátumot képezve

elminálják azokat. Közreműködésükkel az aktivált prokarcinogének jelentős része kiürül a szervezetből és csak kis hányaduk képes végül a DNS-hez kötődni.

A környezet és a genetika kölcsönhatásainak tipikus példája az egyéni érzékenység különbözősége a környezeti expozíciókkal szemben. Az iniciáció kialakulásában nem csupán az környezeti expozíció mértéke és koncentrációja játszik szerepet, hanem olyan genetikai polimorfizmusok is, melyek a környezetből a szervezetbe kerülő vegyületek karcinogén hatásait befolyásolják. Az I-es és II-es fázisú metabolizáló enzimek mindegyikének jellemzően több polimorfizmusa van jelen a populációban, ezáltal az egyének érzékenysége a különböző expozíciókra, végül egy betegség kialakulására nagy eltéréseket mutathat [37].

A karcinogenezis többlépcsős folyamatának potenciális kiindulópontjai lehetnek a DNS adduktok által létrehozott szerkezeti és funkcióbeli változások. Amennyiben a DNS-t érintő elváltozásokat (pl. bázis kicserélődéseket, deléciókat vagy inzerciókat) a DNS javító mechanizmusok nem képesek helyrehozni, permanens mutációk keletkezhetnek.

Ha proto-onkogéneket érintő aktiváló mutációk, vagy a tumorszuppresszor gének funkcióvesztését okozó inaktiváló mutációk keletkeznek, az irreverzibilisen megváltoztathatja a kódolt fehérjék aktivitását és/vagy mennyiségét, ami a később bekövetkező további mutációkkal együtt a sejtciklus szabályozásának zavarához vezethet. Ennek következtében a sejtek a normálisnál gyorsabban szaporodnak és továbbadják az általuk hordozott mutációkat.

A daganatkialakulásában olyan kémiai anyagok is részt vehetnek, melyek nem mutagének, önmagukban nem képesek daganatot okozni, de képesek szabályozni sejtciklus-kontrolláló gének működését és promóterkén gyorsítják az iniciált sejtek proliferációját, mely tovább növeli az újabb genetikai hibák létrejöttét [38]. A forbolészter például nem genotoxikus, de mitogén hatású a protein kináz C (PKC) serkentésével [39].

A mutációk egyre gyorsabb felhalmozódása végül az osztódási képesség további növekedéséhez, az apoptózis és a replikatív öregedés elkerüléséhez, angiogenezishez,

a sejt adhézió diszfunkciójához, a környező szövetek inváziójához és metasztázishoz vezethet [40-44].

Összességében tehát a kialakult gén-, vagy kromoszómaszintű genetikai eltérések meghatározzák a sérült sejtek biológiai tulajdonságait, más sejtekkel való interakciójukat, invazív és/vagy metasztázisképző képességüket és az esetlegesen alkalmazott terápiára adott válaszukat, így annak eredményességét.

A vizsgálatunkban használt 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) a környezetünkben gyakran előforduló PAH [45,46]. A PAH vegyületek jellemzően szerves anyagok tökéletlen égése során keletkeznek, így például a cigarettafüst vagy az autók által kibocsátott kipufogógáz a DMBA-expozíció jellegzetes és jelentős forrásai [47]. A DMBA sejtenyészetben és *in vivo* állatkísérletekben is gyakran használt genotoxikus karcinogén ágens [48], mivel a humán daganatokhoz szövettanilag hasonló tumorokat eredményez [49]. A DMBA prokarcinogén, melyet a CYP metabolizáló enzimek aktiválnak [50,51]. A keletkező metabolitok alkilálhatják a DNS-t vagy más celluláris makromolekulákat, így a DMBA részt vehet a karcinogenezis kezdeti fázisaiban, úgymint az iniciációban és a promócióban [52,53]. Mindemellett a DMBA fokozza a reaktív oxigéngyökök (ROS) képződését [54], mely hatás szintén hozzájárulhat a sejtek diszfunkciójához, vagy megváltozott viselkedéséhez [55]. Korábbi vizsgálatok rámutattak, hogy a DMBA már 24-48 órával a kezelést követően hatással van egyes gének (pl. H-RAS, c-Myc, p53) és miRNS-ek (pl. miR-21, miR-146a) expressziójára, melyek ilyen módon korai biomarkerként alkalmazhatók [56,57].

## **1.2. Molekuláris biomarkerek szerepe a daganatok prevenciójában**

Minden rosszindulatú daganat kialakulását megelőzik molekuláris biológiai jelenségek, például génexpressziós mintázatok átrendeződése. Ebben az időszakban a klinikai tünetek még nem jelennek meg, ezért a folyamat nehezen ismerhető fel.

A daganatok kialakulását meghatározó mutációkat, kromoszóma-rendellenességeket és/vagy a betegség fenotípusos megjelenését átfogóan vizsgálni rendkívül költséges és időigényes, ezért komoly érdek fűződik olyan biomarkereket összefogó vizsgálati

módszerek kidolgozásához, melyek a karcinogén hatások minél korábbi felismerését teszik lehetővé.

### **1.2.1. Mutációk vizsgálata**

A karcinogenezis kutatása során kezdetben a kémiai karcinogének által okozott genotoxikus és mutagén hatások detektálása, megismerése és megértése volt a legfőbb cél.

A CRC kialakulásakor például a karcinogenezis korai szakaszában tünetmentesen fejlődő premalignus adenomák megjelenését molekuláris szinten jelezheti a kolorektális daganatokban gyakran előforduló APC génmutáció [7]. Ennek detektálása lehetőséget ad a korai diagnózisra, mely növelheti a kezelések sikerességét, az olyan tünetek ugyanis, mint a vér a székletben, a fogyás, vagy a fáradékonyság a karcinogenezis már előrehaladott stádiumában jelennek meg, és ekkor az alkalmazott terápiák hatékonysága nagymértékben csökken [8,58,59].

A daganatképződés biomarkereivel kapcsolatos korai irodalmi adatokban tehát, a potenciális karcinogének vizsgálata elsősorban azok karcinogén hatásaira összpontosul, a vizsgálatok genotoxicitáson alapulnak és kromoszóma- vagy génszintű mutagenitást jeleznek.

A hagyományos karcinogenitási vizsgálatokban napjainkban is elsődleges szerepet tölt be az 1973-ban Bruce Ames által kifejlesztett és közzétett Ames-teszt, mely egy adott vegyület mutagén hatásának észlelésére a korábbiaknál gyorsabb, viszonylag költséghatékony és könnyen replikálható megoldást adott [60,61]. A hagyományos citogenetikai kromoszómaanalízis jellemző technikája a Giemsa kromoszómasávozás és festés. A módszerrel a sejt teljes kromoszómaállományáról kapunk információt, így felismerhetők a kromoszómaaberrációk, deléció, transzlokáció vagy duplikáció. Segítségével azonban csak az 5-10 Mb-nál nagyobb méretű eltérések mutathatók ki, melyek mikroszkóppal láthatóak [62].

A korai vizsgálati módszerek tehát a bekövetkezett mutációk azonosítására irányulnak és mutagén, genotoxikus hatású karcinogéneknek a vizsgálatát teszik lehetővé. Ahhoz azonban, hogy a mutációk elkerülhetők legyenek és mélyebben megismerjük a



karcinogenezist elindító és elősegítő mechanizmusokat, szükségessé vált a mutációt megelőző korai biológiai változások detektálása és megértése.

### **1.2.2. Génexpressziók vizsgálata**

A karcinogenitási vizsgálatok új területét nyitották meg a mutációk detektálásán túl a gének expresszióját befolyásoló hatások vizsgálatai. A génexpressziós változások számos kémiai, fizikai vagy biológiai karcinogén vegyület által okozott károsodást reprezentálhatnak mind sejttenyészetekben, mind *in vivo* állatkísérletes modellekben [63].

A Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Orvosi Népegészségtani Intézetében korábban végzett génexpressziós vizsgálatok rámutattak, hogy a környezeti daganatkeltő anyagok (a DMBA és az MNU) a c-Myc és a Ha-ras onkogének fokozott expresszióját idézik elő például a tüdőben és a csecsemőmirigyben a DMBA kezelést követően 6 és 12 órával, az MNU kezelést követően pedig már 3 órával. Emellett az MNU 12 órával a kezelés után növelte a p53 sejtciklus szabályozó és tumorszuppresszor gén kifejeződését. A génexpressziós minták vizsgálatával megfigyelhető volt a direkt karcinogén hatású MNU és metabolikusan aktivált DMBA eltérő mechanizmusa [53].

A mutációk és kromoszómaaberrációk vizsgálatain túl tehát, a daganatkialakulás folyamatának összetettebb, átfogóbb megértését teszi lehetővé a génexpressziós mintázatok, mint biomarkerek tanulmányozása. A mutációk keletkezésekor ugyanis a legtöbb esetben szintén megfigyelhetők eltérések a gének kifejeződésében, de génexpressziós szinten olyan hatások is megfigyelhetők, melyek a mutációktól függetlenek.

A karcinogén anyagok mellett nem minden esetben genotoxikusak, mégis jelentős hatásuk lehet a karcinogenezisben szerepet játszó gének működésének befolyásolásával a daganatképződésre. A sejtciklust kontrolláló tumorszuppresszor gének expressziójának csökkentése történhet egy egyébként nem mutagén epigenetikus hatás, például DNS-metiláció eredményeként is. A végeredmény ebben az esetben is a normálisan működő tumorszuppresszor fehérje mennyiségének

csökkenése, hatásának redukálása. A génkifejeződés megváltozásához tehát nem szükségszerű az adott gén mutációja.

A karcinogenezis különböző pontjain, az egészséges állapothoz viszonyított eltérő génexpressziós mintázatok korai biomarkerként jelezhetik a káros környezeti expozíciót, annak mértékét, lehetőséget nyújtanak a tumorgenezis stádiumainak detektálására, vagy a sejtek működésbeli változásainak kimutatására, a kiváltó okok pontosabb megértésére [64-66].

#### **1.2.2.1. A vizsgálatban szereplő mTORC1 gén**

Az mTORC1 (Mammalian target of rapamycin complex 1) a sejtnövekedés egyik fő szabályozója, szabályozza az aminosavszint ingadozásaira adott sejtreakciót [67], a sejtanyagcsere folyamatokat, a transzlációt [68]. A karcinogenezis szempontjából szintén figyelmet érdemel, hogy az mTORC1 és a lizoszómák közötti konvergencia koordinálja az autofágiát, megnövelve ezzel a sejtek túlélését tápanyaghiányos környezetben [69,70]. A daganatos sejtek ugyanis a megváltozott anyagcsere és osztódási potenciáljuk végett jellemzően tápanyaghiányban szenvednek [71,72]. Ezen túl például egér és gyümölcslégy modellekben *in vivo* is megfigyelték, hogy az mTOR-út vonal farmakológiai gátlása meghosszabbíthatja a tényleges élettartamot az autofágia és a transzláció szabályozásával [73,74]. Az mTORC1 aktiváló mutációit a humán daganatok széles körében azonosították és a sejtnövekedés egyik központi vezérlőjeként kulcsszerepet játszik a rosszindulatú daganatképződésben, de számos más életmóddal kapcsolatban álló betegség kialakulásában is, például a szív-ér rendszeri betegségek, az elhízás vagy a cukorbetegség [75,76].

#### **1.2.3. MikroRNS expressziók vizsgálata**

A változatos génexpressziós mintázatok megértésén túl a gének regulációjában közreműködő mikroRNS-ek (miRNS) hatásainak a feltérképezése további részletek megismerésére biztosít lehetőségeket, például géntermékek megjelenéseiről, releváns szabályozási útvonalak, valamint velük összefüggésben álló egymást akár kölcsönösen szabályozó miRNS-ek funkciójáról, azok módosulásairól, illetve, hogy azok mintázata milyen élettani folyamatokat tükröz. A folyamatok egzakt megismerése lehetőséget

nyújthat a génexpressziós mintázatoktól komplexebb és érzékenyebb miRNS expressziós mintázatok biomarkerként történő alkalmazására.

#### **1.2.3.1. A miRNS-ek**

A miRNS-ek növényekben, állatokban, gombákban és néhány vírusban megtalálható speciális 19-22 nukleotid hosszúságú erősen konzervált RNS molekulák, melyek a részben vagy teljesen komplementer messenger RNS-ek (mRNS) megfelelő 3' UTR-jéhez (three prime untranslated region) való kötődéssel képesek befolyásolni azok transzlációját, ezen keresztül a fehérjekódoló gének expresszióját, a fehérjeszintézist [77]. Bár egyes miRNS-ek extracellulárisan is előfordulhatnak, és kimutathatók különféle testfolyadékokban (pl. szérum, plazma, nyál, vizelet, anyatej), döntő többségük mégis a sejteken belül található [78].

#### **1.2.3.2. A miRNS-ek biogenezeise**

A miRNS-ek a humán genomban önállóan vagy klaszterekben csoportosulva helyezkednek el, biogenezisük az innen történő átírásukkal a DNS függő RNS polimeráz II vagy ritkábban a DNS függő RNS polimeráz III segítségével történik. A jelenleg ismert miRNS-eknek nagyjából a fele intragenikus és főként a fehérjekódoló gének intronjaiból, ritkábban azok exonjaiból készülnek. A többi miRNS intergenikus, host géntől függetlenül íródnak át és specifikus promóterek által szabályozottak [79]. A transzkripció eredményeként keletkező úgynevezett elsődleges átiratok a primary-miRNS-ek (pri-miRNS) [80].

Bár a miRNS-ek biogenezeise nem kanonikus útvonalakon (pl. tRNS-ekből) is létrejöhet [81], a kanonikus biogenezis útvonal a dominánsabb miRNS képző útvonal. Ebben az esetben a pri-miRNS-ek a génjeikből íródnak át, aztán a sejtmagban egy mikroprocesszornak nevezett heterotrimer fehérjekomplex kivágja ki belőlük a miRNS prekurzorát, a pre-miRNS-t. A mikroprocesszor-komplex legfőbb részei az endonukleolitikus hasítást végző Drosha (Class 2 ribonuclease III enzyme), illetve a Drosha-t kvázi pozicionáló DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) fehérje, de a vágás hatékonyságát más kapcsolódó fehérjék is befolyásolhatják [82]. Ezt követően a

hajtút képző, 70-100 nukleotid hosszúságú pre-miRNS-t a sejtmagból Exportin-5 transzport fehérje a sejtplazmába szállítja [83].

A citoplazmában újabb hasítás következik, melyet a Dicer (Class 4 ribonuclease III enzyme) enzim végez egy dupla szálú RNS kötő fehérje (dsRBD, Double-stranded RNA-binding domain) közreműködésével. A pre-miRNS hurok (loop) régiójának eltávolításával egy kis RNS molekula miRNA:miRNA\* duplex keletkezik [84].

A duplex mindkét szála funkcionális miRNS-ként működhet, mégis csak egy szál épül be a RISC-be (RNA-induced silencing complex), mely végül a génszabályozás kulcsfontosságú eszközeként működik [85]. A keletkező multiprotein komplex katalitikusan aktív Argonaute (AGO-1-4) fehérjéje végül annak az mRNS transzkriptumnak a hasítását fogja elvégezni, mellyel a komplexbe épült miRNS vezetőszál közel, vagy teljes egészében komplementer. Részleges egyezés esetén a RISC génszabályozó hatása (az RNS-interferencia (RNSi)) a mRNS lebontása helyett később, a transzláció elnyomásával is megtörténhet [85-87].

#### **1.2.3.3. A miRNS-ek szerepe a génszabályozásban**

A miRNS-ek a humán génkifejeződés megközelítőleg 30%-50%-át szabályozzák [88,89], ezáltal olyan, a daganatképződéssel kapcsolatosan fontos sejtbiológiai folyamatokat befolyásolnak, mint a sejtciklus [90], a sejtdifferenciálódás vagy az apoptózis [91].

A miRNS-ek szabályozó hatásai rendkívül változatosak lehetnek, ugyanis egy miRNS több target génre lehet hatással. Emellett nem csak a miRNS-ek fejtenek ki regulációs hatást, hanem a miRNS-ek biogenezisét is befolyásolják más tényezők.

A daganatképződéssel kapcsolatosan a miRNS-ek onko vagy tumorszuppresszor hatást is kifejthetnek az általuk szabályozott gének természetétől függően [92]. Normális körülmények között a tumorszuppresszor miRNS-ek onkogének regulációját végzik, csökkentve az aktív onkogén hatású fehérjék mennyiségét, ebből adódóan ezen miRNS-ek funkcióvesztése onkogének fokozott transzlációjához vezethet. Egyes miRNS-ek közvetlenül szabályozzák az onkogének és/vagy tumorszuppresszor gének expresszióját, mint például a MET proto-onkogént direkt szabályozó miR-199a [93]. Más miRNS-ek az onkogének vagy tumorszuppresszor gének közvetlen célpontjai.

Például a sejtciklus egyik fő proapoptikus szabályozója a p53 tumorszuppresszor fehérje, mely szabályozza a miR-34 expresszióját a miR-34 lokusz upstream p53-függő elemén keresztül [94,95]. Ezen kívül számos mikroRNS részt vesz a tumorsejtek proliferációjában, az apoptózisban, az invázióban és a metasztázisban, például a miR-134 fokozza a Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (p21) kifejeződést, ezzel szabályozva a sejtnövekedést és csökkentve a sejtburjánzást [96,97]. A szabályozás bonyolultságát mutatja, hogy egyes miRNS-ek egyszerre fejthetnek ki onko és tumorszuppresszor hatást is, mivel egy miRNS több mRNS-el lehet részben vagy egészben komplementer. Bizonyos körülmények között a miR-125 mint tumorszuppresszor képes csökkenteni a MUC1 és a Bcl-2 gének apoptózisgátló (tehát onkogén) hatásait [98,99], emellett elnyomja a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor (VEGF) expresszióját gátolva ezzel a tumor proliferációját és az áttétképzést [100]. Azonban vizsgálatok azt is kimutatták, hogy a miR-125 képes tumor promótereként hatni, ezzel elősegíteni a tumorgenezist [98], és a STARD13 GTPáz-aktiváló fehérjén keresztül elősegíti a metasztázis kialakulását bazális sejtes karcinóma (BCC) esetén [101]. Az ellenkező hatások lehetnek tumorspecifikusak, de lehetségesek dózisfüggő eltérések is. Például a miR-155-5p esetén megfigyelték, hogy a magas expressziója gátolta a GC sejtek proliferációját és elősegítette az apoptózist, míg ezzel ellentétben a csökkent kifejeződése elősegítette a proliferációt és növelte a sejtek rezisztenciáját az alkalmazott terápiás szerrel (cisplatin) szemben [102]. Ez alapján a miR-155-5p magas szintje előnyös lehet, míg alacsony szintje inkább káros hatású tumorelles szempontról [103].

#### **1.2.3.4. A miRNS-ek mint biomarkerek**

A miRNS-ek közül sokról elmondható, hogy törékeny genomi régiókban vannak jelen és a malignusan transzformált mintákban gyakran megfigyelt amplifikáció, deléción vagy transzlokáció következtében többnyire megváltozott expressziós mintázatot mutatnak [104,105].

Mindemellett kísérletes vizsgálatokon és klinikai szövettani minták elemzésén alapuló bizonyítékok arra utalnak, hogy minden karcinogén hatás esetében megfigyelhetők specifikusan expresszált miRNS-ek [106] és mivel a miRNS-ek a szérumban stabilak, így

potenciálisan korai epigenetikai biomarkerekként szolgálhatnak különböző daganatok és egyéb betegségek kimutatására [107].

#### **1.2.3.5. A vizsgálatban szereplő miRNS-ek**

A vizsgálatba bevont miRNS-ekről (miR-9-1, miR-9-3, miR-29a, miR-124-1, miR-132, miR-134, miR-155, miR-212, miR-330) már korábban leírták, hogy megváltozott expressziót mutatnak számos malignus daganatban és szerepük van különböző jelátviteli utakon keresztül onkogének vagy tumorszuppresszor gének szabályozásában, a sejtek növekedésében, proliferációjában, inváziójában, migrációjában, a metasztázis képzésében vagy az apoptózisban.

A miR-9 kritikus szerepet játszik a tumorgenezisben azáltal, hogy elősegíti a tumor invázióját és metasztázisát [108]. A sejt-sejt adhézióért felelős transzmembrán fehérje, az E-cadherin alulszabályozásával elősegíti a karcinómasejt mozgékonyágát, invazivitását, valamint aktiválja a  $\beta$ -katenin jelátvitelt, ami hozzájárul a VEGF fokozott kifejeződéséhez, végeredményében az angiogenezishez [109]. Emellett szignifikánsan túlexpresszált több daganattípusban [110-112].

A miR-29a különféle fiziológiai folyamatok szabályozásában vesz részt, beleértve a vírusreplikációt, a gyógyszerrezisztenciát [113], a karcinogenezis szempontjából pedig a sejtproliferációt [114], a differenciálódást [115], az apoptózist [116], a fibrózist [117], az angiogenezist [118] és a metasztázisképzést [119]. Érzékenysége és specifitásának köszönhetően a miR-29a potenciális terápiás célpontként és ígéretes biomarkerként szolgálhat különböző daganatok esetén [115].

A miR-124-1 tumorszuppresszor hatású miRNS azáltal, hogy gátolja a sejtciklust szabályozó CDK6 (Cyclin-dependent kinase 6) transzlációját, valamint csökkenti a pRb foszforilációját [120]. Megfigyelt továbbá a tumorsejtekben a miR-124-1 gyakori funkcióvesztése hipermetiláció következtében [121], és ez összefüggést mutat a rossz prognózisra utaló klinikopatológiai paraméterekkel [122].

A miR-132 daganatspecifikusan onko és tumorszuppresszor hatást is kifejthet. Onkogén hatást figyeltek meg a hasnyálmirigy-karcinóma esetén, ahol elősegíti a rákos sejtek proliferációját, invázióját és migrációját a PTEN (Phosphatase and tensin

homolog) tumorszuppresszor gén gátlásával [123]. Nem kissejtes tüdődaganat (NSCLC) esetén azonban a miR-132 gátolja az NSCLC sejtek migrációját és invázióját [124], valamint ismert a CRC sejtek esetén proliferációt gátló hatása, és a programozott sejthalál indukálása [125]. Ez utóbbi tumortípusokban tehát inkább tumorszuppresszor hatást fejt ki.

A miR-134-ről kimutatták, hogy fokozza a p21 expresszióját és elnyomja a ciklin D1, a ciklin D2 és CDK4 (Cyclin-dependent kinase 4) fehérjék kifejeződését melyek a sejtciklus előremozdítói és számos emberi ráksejtben felülszabályozódtak, ezáltal csökkenti a sejtburjánzást [96] és fokozza a programozott sejthalált [126]. Megfigyelt metasztázis-szuppresszor hatása is hepatocelluláris karcinómában a  $\beta$ 1 integrin alulszabályozásával [127].

Tanulmányok igazolják a miR-155 szerepét a gyulladások kialakulásában azáltal, hogy a transzformáló növekedési faktor béta 1 (TGF- $\beta$ 1) fehérje közreműködésével szabályozza a kollagén szintézist [128]. A miR-155 szerepet játszik a veleszületett és adaptív immunválaszok szabályozásában és szignifikánsan túlexpresszálódik a méhnyakrákos szövetekben a normál szövetekhez képest [129]. Ismert továbbá, hogy a miR-155 a Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) gén expressziójának gátlásával elnyomja a daganatos sejtek szaporodását és fokozza az apoptózist [130].

A miR-212 túlzott expressziója elnyomja a prosztatadaganat (PCa) sejtek proliferációját és invázióját, elősegíti a PCa sejtek apoptózist [131]. A miR-212 által szabályozott fehérjék hatással vannak a tumorgenezis különböző pontjaira, ideértve a sejtproliferációt, az inváziót, az áttétképzést és az apoptózist [132]. A SOX4 transzkripciós faktor például a miR-212 célpontjaként részt vesz különböző daganatsejtek inváziójában, migrációjában, és metasztázisában [133]. Megfigyelt továbbá, hogy a miR-212 a rákos sejtek kemoterápiával vagy sugárterápiával szembeni érzékenységét is befolyásolhatja [134].

A miR-330 gátolja a CRC sejtek szaporodását azáltal, hogy elnyomja a BACH1 gén expressziót poszttranszkripciós szinten [135]. Emellett tumorszuppresszor hatású olyan célgének regulációjával, mint a Musashi-1, melynek túlzott expressziója összefügg a malignitás és a proliferatív aktivitás mértékével [136,137]. A túlzottan expresszált

miR-330 azonban elősegítheti a sejtek mezenchimális átalakulását, proliferációját, invázióját és apoptózisát a PRRX1 gén által közvetített Wnt/ $\beta$ -catenin jelátviteli út gátlásán keresztül [138].

Ezen miRNS-ek és az mTORC1 gén DMBA-val való kölcsönhatásainak vizsgálata fontos információkat nyújthat a kémiai karcinogének által indukált daganatok patogenezisének hátterében álló mechanizmusokról. Az eredményeink megértésével a vizsgált miRNS-ek és az mTORC1 további, a daganatképződésben feltételezett szerepét ismerhetjük meg, valamint értékelhetjük korai biomarkerként való felhasználásuk lehetőségét egy génekből álló vizsgálati panel kidolgozásában. Végül a primer, szekunder és terciér prevenció eszközeiként alkalmazva új lehetőségek nyílhatnak a daganatos betegségek incidencia- vagy mortalitási mutatóinak további csökkentésére.

### **1.3. Célkitűzés**

A daganatos betegségek természetéből adódóan a betegség kialakulása elleni küzdelemben egyre nagyobb jelentőséggel bír a prevenció, mely területen szükségeszerű a karcinogén anyagok által okozott hatásokat/károsodásokat jelző molekuláris biológiai jelenségek minél korábbi felismerése, jóval a klinikai tünetek megjelenése előtt.

A vizsgálatunk célja ezzel összhangban,

1. a kiválasztott kilenc miRNS (miR-9-1, miR-9-3, miR-29a, miR-124-1, miR-132, miR-134, miR-155, miR-212, miR-330) és az mTORC1 gén megváltozott expressziós mintázatainak korai biomarkereként történő értékelése a DMBA okozta karcinogén hatások kimutatására 24 órával a DMBA kezelést követően.
2. továbbá az mTORC1 gén és a vizsgált miRNS-ek DMBA expozíciót követő kölcsönhatásainak feltárása.
3. az eredmények alapján a vizsgált miRNS-ek és az mTORC1 gén felhasználásával egy olyan vizsgálati panel összeállítása, mely alkalmas a karcinogén folyamatok korai jeleinek azonosítására, vagy a bizonyítottan karcinogén és feltételezetten kemopreventív anyagok együttes használatával antikarcinogén anyagok gyors vizsgálatára is.



## **2. ANYAG ÉS MÓDSZER**

A vizsgálat során CBA/Ca egerek két csoportját használtuk. Mind a kontroll-, mind a DMBA-kezelt csoport 12 (6-8 hetes) egyedből (6 hím, 6 nőstény) állt. A DMBA kezelt csoport intraperitoneálisan 20 mg / ttkg DMBA-t kapott 0.1 ml kukoricaolajban (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) feloldva, míg a kontrollcsoport önmagában 0.1 ml kukoricaolajat. 24 órás DMBA-expozíciót követően nyaki diszlokáció után a boncolás során eltávolítottuk az állatok máját, veséit és lépét, és az alább leírtak szerint azokból RNS izolálást végeztünk.

A laboratóriumi állatokra vonatkozó irányelveknek megfelelően az egerek humánus ellátásban részesültek. A kísérletet a hatályos etikai előírásoknak megfelelően végeztük. (Etikai engedélyszám: BA02/2000-79/2017)

### **2.1. RNS izolálás**

A teljes celluláris RNS-t TRIZOL reagenssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) izoláltuk a gyártó utasításainak megfelelően. Az RNS-minőséget abszorpciós fotometriával ellenőriztük, és a továbbiakhoz csak azokat az RNS-mintákat használtunk, ahol 260/280 nm esetén  $A > 2.0$  volt.

### **2.2. Reverz transzkripció polimeráz-lánreakció (RT-PCR)**

A one-step PCR-t, beleértve a reverz transzkripciót és a cél amplifikációt, a Kapa SYBR FAST One-step qPCR kit (Kapa Biosystems, Wilmington, MA, USA) alkalmazásával végeztük 96 lyukú plate-en, LightCycler 480 qPCR (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) platformon.

A hőmérsékleti programot az alábbiak szerint állítottuk be: a mintákat 5 percig inkubáltuk 42 °C-on és 3 percig 95 °C-on, majd 45 cikluson keresztül (95 °C – 5 s, 56 °C – 15 s, 72 °C – 5 s), az egyes ciklusok végén fluoreszcens leolvasást végeztünk. Minden egyes futtatást olvadási görbe analízissel végeztünk (95 °C – 5 s, 65 °C – 60 s, 97 °C ∞) az amplifikáció specifitásának megerősítése érdekében. A reakcióelegy a következő volt: 10 µl KAPA SYBR FASTqPCR Master Mix, 0,4 µl KAPA RT Mix, 0,4 µl dUTP, 0,4 µl primerek, 5 µl templát miRNS, 20 µl ösztérfogatra kiegészítve steril bidesztillált vízzel.

Az mTORC1 gén, a vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, a miR-9-3, a miR-29a, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134, a miR-155, a miR-212 és a miR-330), valamint a belső kontroll gén (mouse U6), primer szekvenciáit az 1. táblázat foglalja össze.

**1. Táblázat: A vizsgálat során használt primer szekvenciák.**

	FORWARD	REVERSE
miR-134	TGTGACTGGTTGACCAGAGG	GTGACTAGGTGGCCACAG
miR-132	ACCGTGGCTTTCGATTGTTA	CGACCATGGCTGTAGACTGTT
miR-124-1	TCTCTCTCCGTGTTACAGC	ACCGCGTGCCTTAATTGTAT
miR-212	GGCACCTTGGCTCTAGACTG	GCCGTGACTGGAGACTGTTA
miR-155	GACTGTTAATGCTAATCGTGATAG	GTGCAGGGTCCGAGGTATTC
miR-330	GACCCTTGGCGATCTCTG	CTGTGCTTTGCTCGTTGGAT
miR-29a	CCCCTTAGAGGATGACTGATTC	AACCGATTCAGATGGTGCT
miR-9-1	CGGGGTTGGTTGTTATCTTT	TGGGGTTATTTTACTTTCGGTTA
miR-9-3	GCCCGTTTCTCTCTTTGGTT	TCTAGCTTTATGACGGCTCTGTGG
mTORC1	AAGGCCTGATGGGATTTGG	TGTCAAGTACACGGGGCAAG
mouse U6	CGCTTCGGCAGCACATATAC	TTCACGAATTTGCGTGTCAT

A primereket az Integrated DNA Technologies (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, Iowa, USA) szintetizálta, a szekvenciák korábbi publikációkból származnak [139,140].

### 2.3. Számítás és statisztikai elemzés

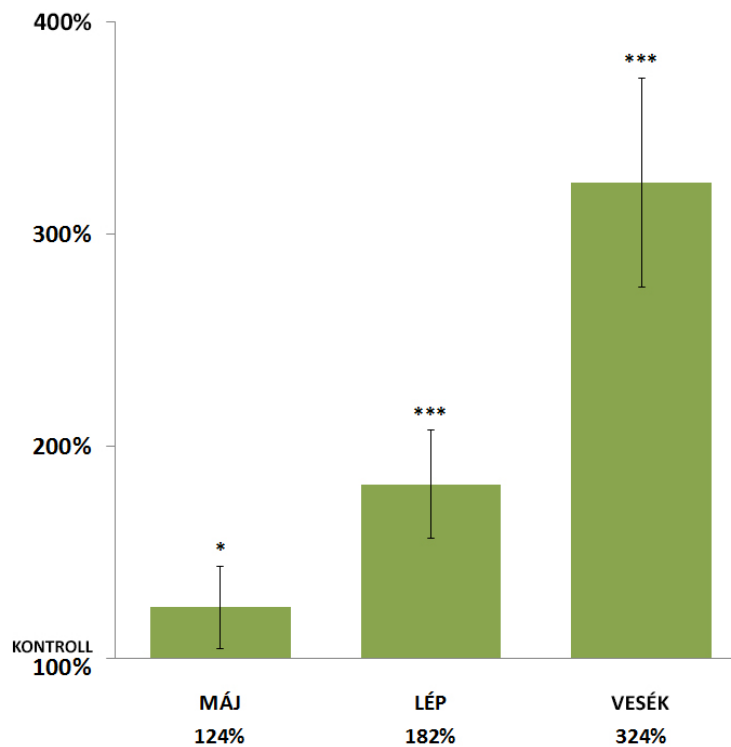
A relatív miRNS expressziós szinteket a  $2^{-\Delta\Delta CT}$  módszerrel számítottuk ki és hasonlítottuk össze. Az eredményeloszlás vizsgálatára szolgáló statisztikai elemzés során a Kolmogorov–Smirnov tesztet használtuk. Az átlagok összehasonlítására Levene-típusú T-próbát használtunk. A számításokhoz és az elemzésekhez az IBM SPSS 21 (International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA) statisztikai szoftvert használtuk. Statisztikailag szignifikáns szintnek a  $p < 0,05$  értékeket tekintettük.

### **3. EREDMÉNYEK**

Mind a negatív kontroll, mind a kezelt csoport esetén meghatároztuk a vizsgált miRNS-ek és az mTORC1 gén expresszióit 24 órával a DMBA kezelést követően. Az eredmények feldolgozása nem csupán a kezelt és kontrollcsoport átlagos eredményeit összegzi, hanem a nemek szerinti és szervek szerinti elváltozásokat is annak érdekében, hogy a minél mélyebb összefüggéseket ismerhessünk meg a DMBA expozíció okozta miRNS és génexpressziós változások kölcsönhatásairól. A kontrollcsoporthoz képest az eltéréseket százalékos formában határoztuk meg, ahol a kezeletlen kontrollt tekintettük 100%-nak.

#### **3.1. Az mTORC1 gén expressziójának változása**

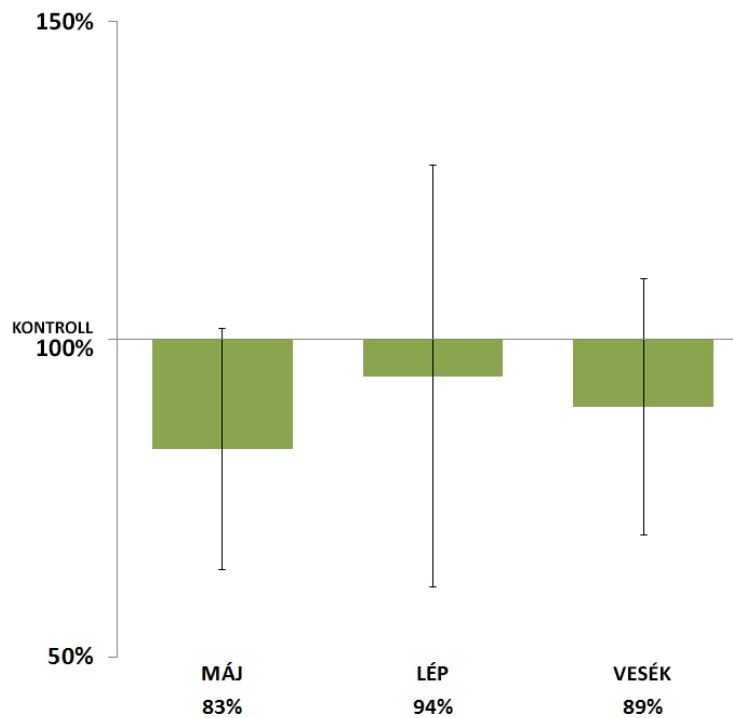
Megfigyeltük, hogy a nőstény állatok esetén az mTORC1 gén expressziója a DMBA kezelést követően 24 órával a minden vizsgált szervben emelkedett. Az 1. ábra megmutatja, hogy a kontrollcsoport értékeihez képest a májban 124% (SD=19,6%), a lépben 182% (SD=25,4%), a vesékben pedig 324%-os (SD=49,2%) értéket tapasztaltunk. Mindhárom szervben statisztikailag szignifikánsak voltak a változások, a máj esetén a  $p$ -érték 0,024 ( $p < 0,05$ ), ennél erősebben a lépben 0,0001 ( $p < 0,001$ ), a vesékben pedig 0,000002 ( $p < 0,001$ ).



**1. Ábra: Az mTORC1 gén expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően nőstény CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).**

A nőstény egereknél kapott eredményeink szerint tehát a vizsgált szervek közül a vesék voltak a DMBA expozícióra a legszenzitívebbek, de összességében minden szervet figyelembe véve a DMBA egyértelmű, erős hatással volt az mTORC1 kifejeződésére.

Ahogy az a 2. ábrán látható, a hím állatok esetén ellenkező hatásokat tapasztaltunk. A karcinogén expozíciót követően az mTORC1 génkifejeződése csendesült, mely változás minden vizsgált szervben egyirányú volt. A legnagyobb átlagos változást a májban tapasztaltunk, ahol a kontroll 100%-os értékéhez képest 83%-ra csökkent a génexpresszió mértéke. A vesékben 11%-os csökkenést, míg a lépben csekélyebb 6%-os csökkenést tapasztaltunk. A tapasztalt szórások rendkívül erőteljesek az átlagos változások mértékéhez képest, a máj esetén 19%, a lép esetén 33,2%, a vesékben pedig 20%.



**2. Ábra:** Az mTORC1 gén expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően hím CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben.

A hímek szerveiben mért elváltozások bár egyirányúak, statisztikai szignifikanciájuk nem éri el a kívánt mértéket, mindhárom szervben  $p > 0,05$ , a májban 0,113, a lépben 0,741, a vesékben 0,389.

### 3.2. A vizsgált miRNS-ek expressziójának változása a DMBA kezelést követően

A DMBA kezelés nem csupán a vizsgált mTORC1 gén expressziójára volt hatással, egyértelmű változások voltak megfigyelhetők a vizsgálatba bevont miRNS-ek kifejeződésében is az összes vizsgált szervben.

#### 3.2.1. A vizsgált miRNS-ek expressziójának változása a májban

A DMBA hatására 24 órával a kezelést követően megfigyelhető volt a májban a vizsgált miRNS-ek kifejeződésének megváltozása mind a hím, mind a nőstény állatok esetén a kontrollcsoportéhoz képest.

A nőstények májában a miR-9-1-et leszámítva minden vizsgált miRNS esetén erősödő expressziós mintázatot tapasztaltunk. A miR-9-1 egyedüli csökkenő eredménye

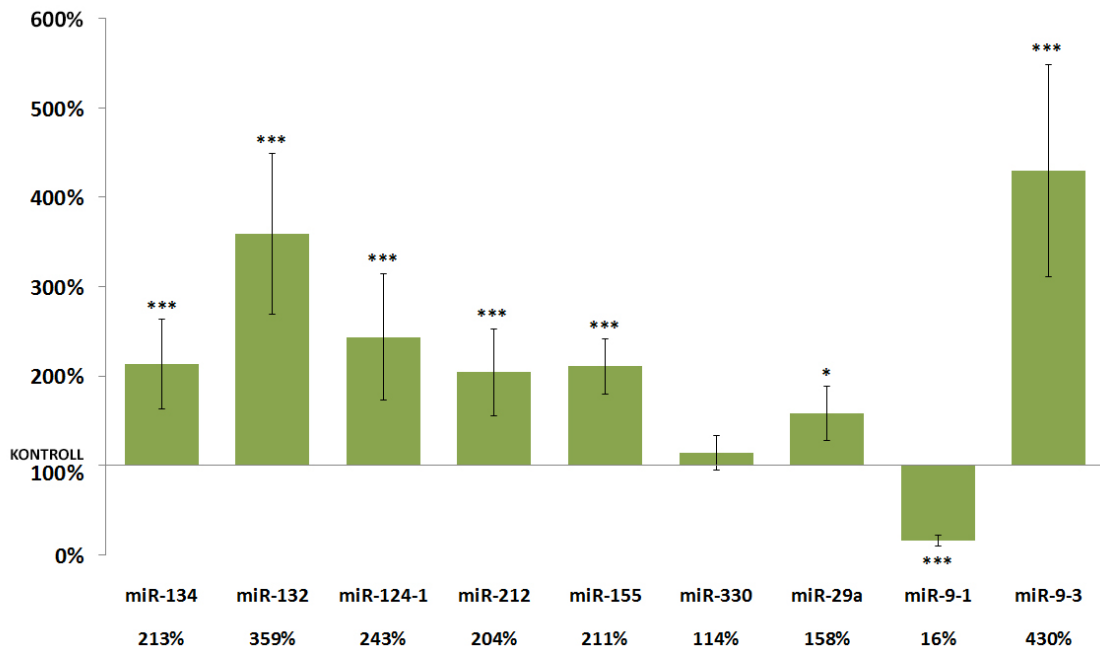
azonban figyelemreméltó, hiszen erőteljes 84%-os csökkenés, melynek a szórása csekély mértékű, csupán 6,5%, és statisztikailag erősen szignifikáns ( $p=0,0003$ ).

A kontroll eredményekhez képest a legcsekélyebb változást a miR-330-nál tapasztaltunk. Az emelkedés mindössze átlagosan 14%-os, ennél azonban valamivel nagyobb 19%-os szórással. Emellett ezen miRNS kifejeződésének a változása volt az egyetlen, melynek a statisztikai szignifikanciája nem érte el az alapvetően elvárt  $p<0,05$ -ös határértéket (0,18).

A nőstények májában miR-330-on kívül minden további, a vizsgálatban szereplő miRNS statisztikailag szignifikáns eredményt adott a DMBA kezelés hatására a kontroll értékekhez képest. Ezek a szignifikanciák ráadásul jellemzően erős  $p<0,001$  értéket mutattak. Kivételt csak a legcsekélyebb növekedést mutató miR-29a képezett, ahol az 58%-os (SD=30%) növekedéshez  $p=0,002$  ( $p<0,05$ ) érték társult, megközelítve, de át nem lépve a  $p<0,001$ -es határt.

A legerősebb eltérést a miR-9-3 kifejeződésében figyeltünk meg 330%-os ( $p=0,00005$ ) átlagos emelkedéssel a kontrollhoz képest, 118%-os szórással. Ezt a miR-132 követte a 100%-os kontroll mellett 359%-os ( $p=0,00004$ ) értékkel, melyhez 90%-os szórás társult. A miR-124-1, a miR-134, a miR-155 és miR-212 esetén kapott értékek több mint kétszer magasabbak voltak a kontrollcsoport azonos génjeihez képest. A miR-124-1 70%-os szórással 243%-ra ( $p=0,0007$ ), a miR-134 50%-os szórással 213%-ra ( $p=0,0003$ ), a miR-155 31%-os szórással 211%-ra ( $p=0,00001$ ), a miR-212 pedig 49%-os szórással 204%-ra ( $p=0,0006$ ) emelkedett.

Összességében a nőstény egerek májában mért miRNS expressziós változások, ahogy azt a 3. ábra mutatja, jellemzően erőteljesek és statisztikailag szignifikánsak voltak.

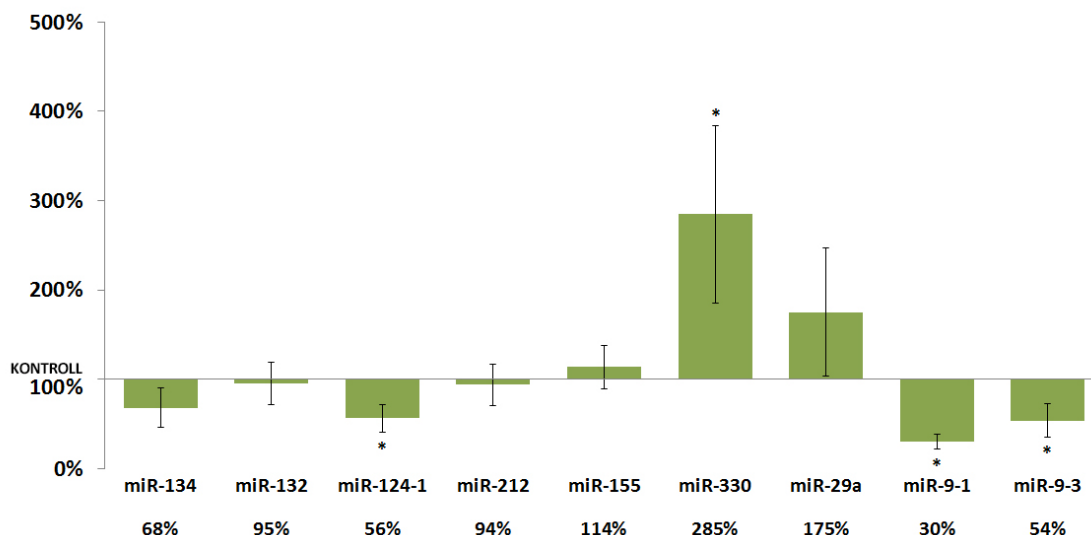


**3. Ábra: A vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, a miR-9-3, a miR-29a, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134, a miR-155, a miR-212 és a miR-330) expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően nőtény CBA/Ca egerek májában (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).**

A hím egerek májában megfigyelt miRNS expressziós mintázat nagy különbségeket mutatott a nőtények azonos szervéhez képest (4. ábra). Az eltérések csekélyebbek voltak a kontrollcsoporthoz képest, változatos, de inkább csökkenő irányúak, a változás mértékéhez képest általában jelentős szórással.

A vizsgált miRNS-ek közül a miR-132, a miR-212 és a miR-155 esetén csekély eltéréseket tapasztaltunk. Negatív irányú volt a miR-132 5%-os csökkenéssel ( $p=0,73$ ) és 24%-os szórással, valamint a miR-212 6%-os csökkenéssel ( $p=0,63$ ) és 23%-os szórással, a miR-155 esetén azonban 14%-os növekedés ( $p=0,36$ ) volt megfigyelhető 25%-os szórással.

Bár a miR-29a 75%-os növekedést ( $SD=72\%$ ,  $p=0,052$ ), a miR-134 pedig 32%-os csökkenést ( $SD=22\%$ ,  $p=0,058$ ) mutatott a kontroll eredményekhez képest, a miR-132, a miR-212 és a miR-155 mellett e két miRNS eredményei nem feleltek meg a statisztikai szignifikancia kapcsán támasztott ( $p < 0,05$ ) követelménynek.



**4. Ábra: A vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, a miR-9-3, a miR-29a, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134, a miR-155, a miR-212 és a miR-330) expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően hím CBA/Ca egerek májában (\* $p < 0,05$ ).**

A vizsgálatban szereplő kilenc miRNS közül csupán négy érte el a  $p < 0,05$  statisztikai szignifikancia értéket (miR-330, miR-124-1, miR-9-1 és miR-9-3), de ezek közül egy sem felelt meg a nőstény csoport májában gyakran tapasztalt  $p < 0,001$  értéknek. A miR-330 esetén pozitív irányú 185%-os változásához (SD=99%) 0,002-es szignifikancia szintet tapasztaltunk, mely a hím egerek májában mért legnagyobb változás, és annak ellenére, hogy nem éri el  $p < 0,001$  értéket, erősen szignifikáns eredmények tekinthető. A további három statisztikailag szignifikáns eredményt mutató miRNS esetén expresszió csökkenés volt megfigyelhető a kontrollhoz képest. A miR-124-1-nél 44%-os (SD=15%), a miR-9-3-nál 46%-os (SD=19%), a miR-9-1-nél pedig erőteljesebb 70%-os (SD=8%) negatív irányú eltérést tapasztaltunk. Utóbbi kettő esetén a  $p$ -érték megközelítette a  $p < 0,001$  értéket, míg a miR-9-3 esetén  $p = 0,004$ , addig a miR-9-1-nél  $p = 0,002$  volt tapasztalható. A miR-124-1 esetén ugyanez az érték 0,021 volt.

### **3.2.2. A vizsgált miRNS-ek expressziójának változása a lépben**

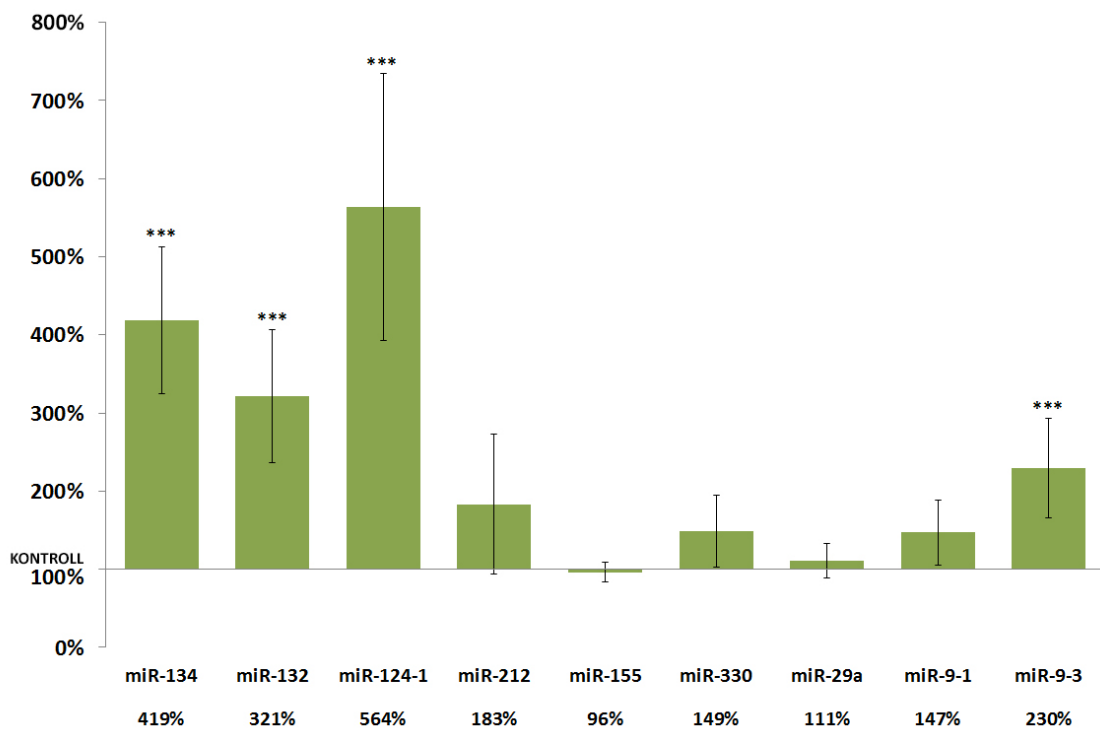
A nőstény egerek lépében jellemzően pozitív irányú expresszió változások voltak megfigyelhetők a kontroll értékekhez képest, ahogy ezt az 5. ábra szemlélteti. A kilenc



vizsgált miRNS-ből csupán egy, a miR-155 mutatott expresszió csökkenést csekély mértékben (4%), 13%-os szórással és  $p=0,64$  szignifikancia értékkel.

A miR-155 mellett a miR-29a, a miR-9-1, a miR-330 és a miR-212 statisztikai szignifikanciája sem érte el a  $p<0,05$  értéket. Ezen miRNS-ek mért értékei a 100%-os kontrollhoz képest pozitívak irányúak voltak. A miR-29a eredménye 111% 22%-os szórással és 0,45-ös  $p$ -értékkel, a miR-9-1-é 147% 41%-os szórással és 0,053-as  $p$ -értékkel, a miR-330-é 149% 47%-os szórással és 0,06-os  $p$ -értékkel, a miR-212-é pedig 183% 89%-os szórással és 0,059-es  $p$ -értékkel.

A további négy vizsgált miRNS esetén rendkívül erős ( $p<0,001$ ) statisztikai szignifikanciát tapasztaltunk. A  $p$ -érték a miR-9-3 esetén 0,0006, a miR-132 esetén 0,0001, a miR-134 esetén 0,00001, a miR-124-1 esetén pedig 0,00006 volt.

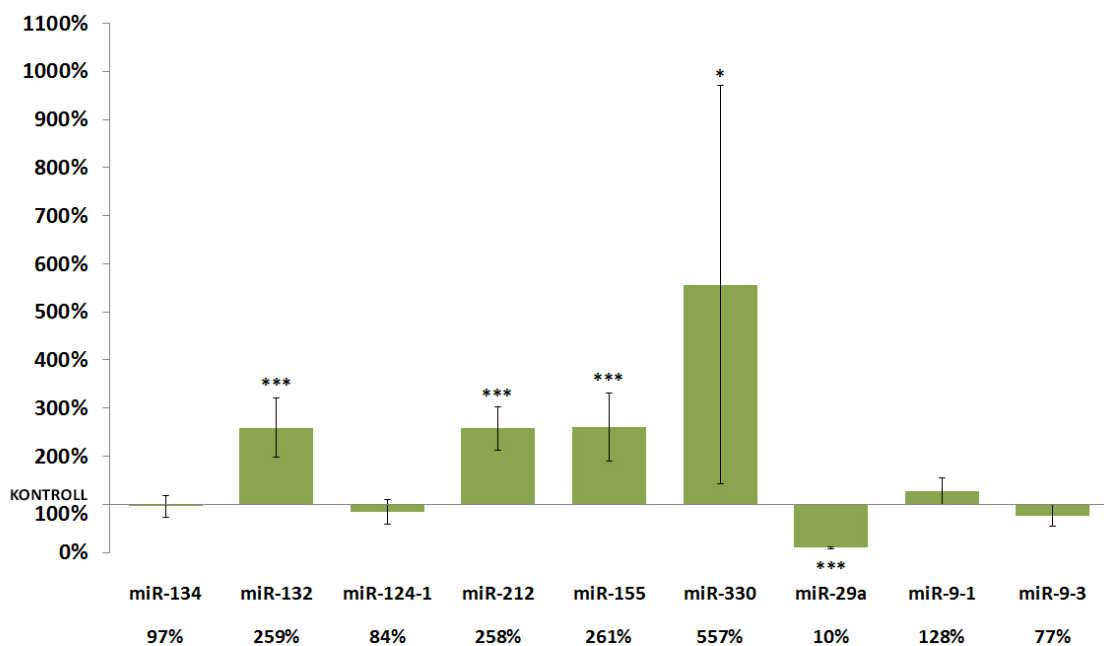


**5. Ábra: A vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, a miR-9-3, a miR-29a, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134, a miR-155, a miR-212 és a miR-330) expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően nőtény CBA/Ca egerek lépében (\*\*\*) $p<0,001$ ).**

A nőtények lépében a legnagyobb eltérést a miR-124-1 expresszió változásaiban tapasztaltunk a kontrollhoz képest, melynek mértéke 464% (SD=170%) volt, ezt

követte a miR-134 319%-os (SD=94%) értéke és a miR-132 221%-os (SD=85%) értéke. A legkisebb, még statisztikailag szignifikáns értéket a miR-9-3 esetén figyeltük meg 230% (SD=64%).

A 6. ábrán látható, hogy a hím egerek lépében a kilenc vizsgált miRNS közül öt esetén (miR-132, miR-212, miR-155, miR-330 és miR-29a) tapasztaltunk statisztikailag szignifikáns eltérést a kontrollcsoporthoz képest. Míg ez az érték a miR-330 esetén 0,02 ( $p < 0,05$ ) volt, addig a miR-132-nél 0,0003, a miR-212-nél 0,00002, a miR-155-nél 0,0004, a miR-29a-nál pedig 0,00004 volt, tehát ez utóbbi esetekben a  $p < 0,001$ .



**6. Ábra: A vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, a miR-9-3, a miR-29a, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134, a miR-155, a miR-212 és a miR-330) expressziójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően hím CBA/Ca egerek lépében (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).**

A szignifikáns változást mutató miRNS-ek közül a miR-29a expressziójának az erőteljes csökkenését tapasztaltuk 10%-ra csupán 2%-os szórással. A másik négy esetben a kifejeződés növekedése volt megfigyelhető, a legnagyobb mértékben a miR-330-nál 557%-ra erős 413%-os szórással. Ezt követően nagyon hasonló eredményekkel következett a miR-155 (261%, SD=71%), a miR-132 (259%, SD=61%), majd a miR-212 (258%, SD=45%).

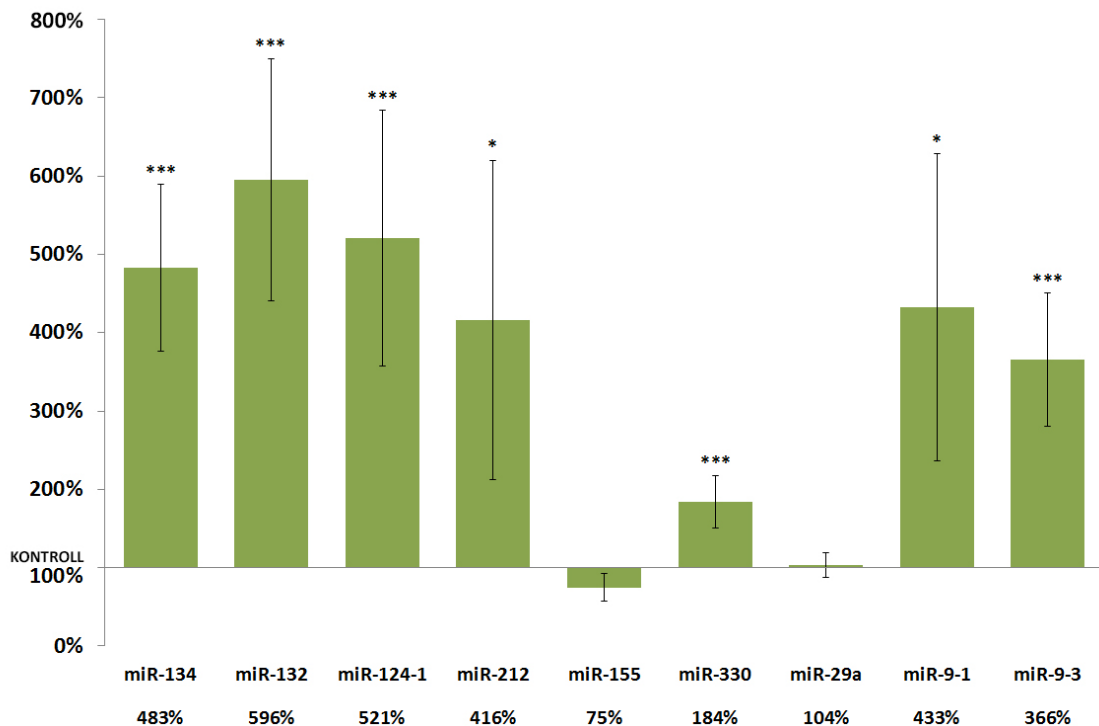
A hím egerek lépében a maradék négy miRNS expressziója csupán csekély mértékű eltérést mutatott a kontrollhoz képest, melyek emellett nem voltak statisztikailag szignifikánsak. Átlagosan a miR-134 3%-kal csökkent (SD=23%,  $p=0,81$ ), a miR-124-1 16%-kal csökkent (SD=25%,  $p=0,24$ ), a miR-9-3 23%-kal csökkent (SD=22%,  $p=0,15$ ), míg a miR-9-1 28%-kal emelkedett (SD=28%,  $p=0,075$ ).

### **3.2.3. A vizsgált miRNS-ek expressziójának változása a vesékben**

A nőstény egerek veséiben jellemzően erős pozitív eltéréseket tapasztaltunk kezelt csoportban a kontrollhoz képest (7. ábra).

A legkisebb változásokat a miR-29a és miR-155 miRNS-ek esetén tapasztaltuk, mely eredmények azonban nem voltak statisztikailag szignifikánsak. A miR-155 volt az egyetlen, ahol negatív irányú változás volt megfigyelhető, a csökkenés mértéke 25%-v volt (SD=17%) 0,06  $p$ -értékkel, míg a miR-29a-nál esetén elenyésző, 4%-os emelkedést tapasztaltunk (SD=16%,  $p=0,7$ ).

A statisztikailag szignifikáns eredmények közül a legkisebb eltérést a miR-330 hozta, mely a kontrollcsoporthoz képest 84%-kal emelkedett, a szórása 33%, míg a  $p$ -értéke 0,0007 ( $p<0,001$ ) volt. A három legerősebb emelkedés a miR-132, a miR-124-1 és a miR-134 esetén volt megfigyelhető.

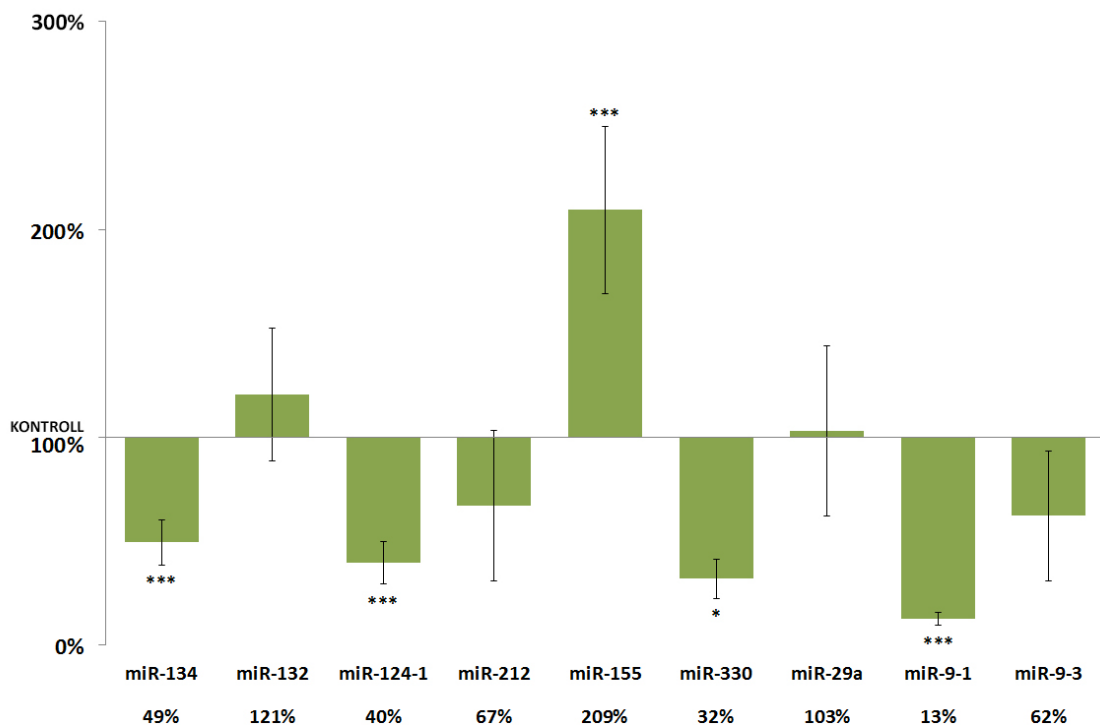


7. Ábra: A vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, a miR-9-3, a miR-29a, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134, a miR-155, a miR-212 és a miR-330) expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően nőstény CBA/Ca egerek veséiben (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

A miR-132 növekedése 496% (SD=154%) volt 0,00002  $p$ -értékkel, a miR-124-1 421%-kal emelkedett (SD=163%) 0,0001  $p$ -értékkel, míg a miR-134 esetében a pozitív irányú eltérés 383% (SD=106%) volt 0,000006  $p$ -értékkel. A miR-9-3 esetén a  $p$ -érték 0,0003 ( $p < 0,001$ ) és az emelkedése a kontrollhoz képest 266% (SD=85%). Ezen miR-ek tehát statisztikailag erősen szignifikáns ( $p < 0,001$ ) eredményeket mutattak, de a további két vizsgált miRNS (miR-212 és miR-9-1), melyeknél  $p < 0,05$  eredmény született is erősnek tekinthető, hiszen a  $p$ -érték a miR-212 esetén 0,004, míg a miR-9-1 esetében csupán 0,002. Emellett mindkettő határozott expresszió változást mutatott a DMBA kezelést követően, a miR-212 értéke 416% (SD=204%) volt, a miR-9-1 értéke pedig 433% (SD=196%).

A hímek veséiben tapasztalt miRNS expressziós változások rendkívül változatosak voltak, melyet a 8. ábra szemléltet. Négy esetben nem kaptunk statisztikailag szignifikáns eredményt. A 100%-os kontroll mellett a miR-132 értéke 121% 32%-os szórással és 0,2  $p$ -értékkel, a miR-212 eredménye 67% 36%-os szórással és

0,09  $p$ -értékkel, a miR-29a értéke 103% 41%-os szórással és 0,88  $p$ -értékkel, a miR-9-3 eredménye pedig 62% 31%-os szórással és 0,054  $p$ -értékkel.



**8. Ábra: A vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, a miR-9-3, a miR-29a, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134, a miR-155, a miR-212 és a miR-330) expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően hím CBA/Ca egerek veséiben (\* $p$ <0,05; \*\*\* $p$ <0,001).**

Ezen miRNS-eknél erősebb kifejeződést mutattak a statisztikailag szignifikáns eredményt hozó miRNS-ek, a miR-134, a miR-124-1, a miR-155, a miR-330 és a miR-9-1. A legerősebb változás a kontrollhoz képest a miR-155 esetén volt megfigyelhető 109% (SD=40%), mely az egyetlen növekvő irányú szignifikáns változás a hím egerek veséiben erős  $p$ -értékkel ( $p$ =0,0003 tehát  $p$ <0,001). A többi szignifikáns eredményt hozó miRNS kifejeződésében csökkenés volt tapasztalható. A legnagyobb mértékben a miR-9-1 csökkent, melynek átlagos értéke a 100%-os kontrollhoz képest 13%-ra (SD=3%) esett le ( $p$ =0,000002). Ezt követte a miR-330 32%-kal (SD=9%), ahol  $p$ =0,0015, majd a miR-124-1 40%-os (SD=10%) eredménnyel és 0,00005  $p$ -értékkel, végül a miR-134 49%-os (SD=11%) eredménnyel, ami 0,00006  $p$ -értékkel társul.

Összességében a kezelt csoport eredményei alapján kijelenthető, hogy a DMBA kezelés 24 óra elteltével hatással van a vizsgált miRNS-ek és az mTORC1 kifejeződésére a kontrollcsoporthoz képest, melyek mértéke és iránya azonban specifikus a vizsgált gén, miRNS, szövet és/vagy nem szerint.

#### **4. MEGBESZÉLÉS**

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy a vizsgálatunkba bevont kilenc miRNS (miR-9-1, miR-9-3, miR-29a, miR-124-1, miR-132, miR-134, miR-155, miR-212, miR-330) és az mTORC1 gén 24 óra elteltével eltérő expressziós mintázatot mutattak a DMBA kezelt csoportban a kontrollhoz képest. Azonban a mintázatok sokszor ellentmondásos változatossága és a statisztikai szignifikancia mutatók alapján az is látható, hogy a célunkban szereplő vizsgálati panelben nem minden vizsgált miRNS és/vagy gén használható.

##### **4.1. mTORC1**

A rosszindulatú humán daganatos betegségek széles körében ismeretesek az mTOR jelátviteli utat aktiváló mutációk, és ez összhangban van az mTOR bizonyított daganat-elősegítő hatásával [75,141]. Az mTOR-jelátvitel aktiválása ugyanis számos onkogén folyamatot indukál, beleértve a daganatsejtek növekedésének, túlélésének és proliferációjának elősegítését [142].

Az mTORC1 potenciális onkogén szerepe a nőstények esetén jelen vizsgálati modellben is bizonyítást nyert, ugyanis a DMBA hatására 24 óra elteltével a nőstény állatokban az mTORC1 expresszió szignifikáns emelkedését tapasztaltunk. Egyes DMBA indukálta daganattípusokban (pl. emlődaganat) megfigyelt a TGF- $\alpha$  (Transforming growth factor alpha), az IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) és az IGF-2 (Insulin-like growth factor 2) magas expressziója, mely összefüggésben áll az ösztrogén hatásával [143]. Az mTORC1 azonban közvetítő szerepet játszik a növekedési faktorok, például az TGF- $\alpha$ , IGF-1 vagy a IGF-2 által serkentett sejt proliferációban [76,144-146]. Erre csendesítő hatással lehet a PTEN tumorszuppresszor gén erősebb kifejeződése, a tesztoszteron hiányában magas expressziót mutató PTEN [147] ugyanis az mTORC1 inhibitora [76]. Ezen gátlás közvetlen negatív visszacsatolás nélküli [76], tehát egy ezt felülíró negatív visszacsatolós szabályozó mechanizmus állhat a jelenség hátterében, mely további vizsgálatok célpontja lehet.

Mindemellett a várakozásunkkal szemben, a hím állatokban a mTORC1 gén – az irodalmi adatok által alátámasztott karcinogenezist támogató mechanizmusa ellenére

– nem mutatott a kontrollhoz képest szignifikáns eltérést. Ugyanakkor, mivel a nőstény állatok májában, lépében és veséiben az mTORC1 gén expressziója statisztikailag szignifikánsan nőtt a DMBA kezelés hatására, azt a nőstény állatok esetén a jelen vizsgálatunkban alkalmazott modellben a karcinogének vizsgálatára alkalmasnak ítéltük.

#### **4.2. miR-132**

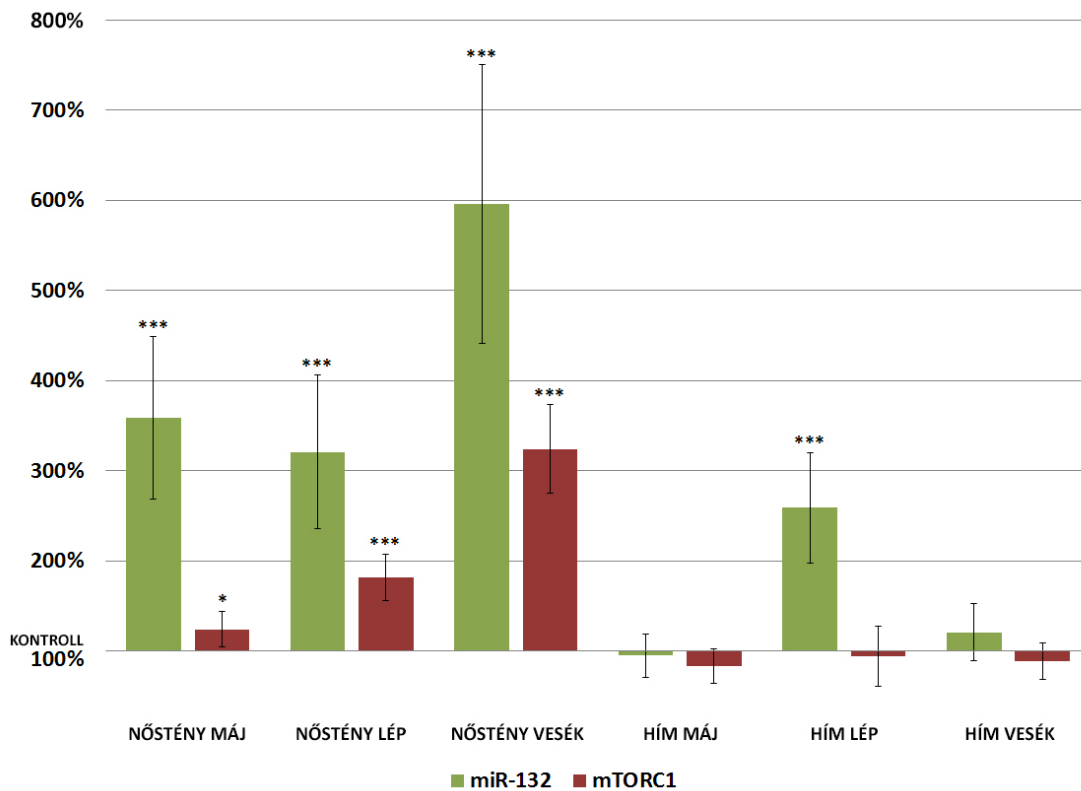
Bár a hím egerek májában és veséiben csupán csekély mértékű és nem szignifikáns elváltozások történtek, a lépben és a nőstények esetén mind a három vizsgált szervben a miR-132 jelentős, statisztikailag szignifikáns overexpresszióját tapasztaltuk.

Ismeretes, hogy a miR-132 a DMBA hatására indukálódó SOX (SRY-related HMG-boksz 4) transzkripciós faktor elnyomásával szabályozza májdaganatsejtek szaporodását, apoptózisát, migrációját és invázióját [148,149]. A miR-132 emellett gátolja a Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) kifejeződését, mely a DMBA hatására szintén megnövekedett expressziót mutat [150].

Ismert továbbá, hogy a DMBA hatására dóziszfüggő módon növekszik a TGF- $\beta$ 1 szintje [151], a TGF- $\beta$ 1 fokozott kifejeződése pedig növeli a miR-132 expressziót [152]. A miR-132 azonban blokkolja a DMBA által aktivált TGF- $\beta$ 1/Smad2/3 jelátvitelt [153]. Ez alapján tehát a TGF- $\beta$ 1 és a miR-132 közötti kölcsönös visszacsatolás áll fenn, mely aktivitására a DMBA erősítő, míg a miR-132 csendesítő hatással van.

Korábbi irodalmak arra is rámutattak, hogy a miR-132 elnyomja a daganatképződés előmozdításában részt vevő, DMBA hatására aktiválódó Akt/mTOR jelátviteli utat [154]. Ahogy a 9. ábrán látható, jelen vizsgálatban csak a nőstények esetén tapasztaltuk az mTORC1 szignifikáns növekedését a DMBA expozíciót követően, mely az irodalmi adatokkal összhangban megmagyarázhatja, hogy a miR-132 expressziós változások (feltehetően a fokozott mTORC1 kifejeződés regulálására) is inkább a nőstény csoportban voltak szignifikánsak.





**9. Ábra: A miR-132 és az mTORC1 expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Az mTORC1 expressziós növekedésére válaszként emelkedett a miR-132 kifejeződése.**

Összességében a vizsgálatunkban szignifikánsan megfigyelt miR-132 expressziós növekedések, korai válaszreakciók lehetnek az olyan DMBA indukálta jelátviteli eseményekre, mint a SOX, TGF- $\beta$ 1 vagy az mTOR aktiváció. Figyelembe véve a hímek esetén megfigyelt eltéréseket, megállapíthatjuk, hogy jelen eredmények alapján a miR-132 biomarkerként történő használata a hímek esetén nem lehetséges. A nőstényeknél azonban jelentős és statisztikailag erősen szignifikáns növekedéseket tapasztaltunk, korrelálva az irodalmi adatokkal, tehát a miR-132 biomarkerként nemi specitással, a nőstény egerek esetén használható.

#### 4.3. miR-212

*In vitro* és *in vivo* vizsgálatok megerősítik a miR-212 összetett szerepét a karcinogenezis folyamatában. Gátolja a GC sejtek szaporodását [155], képes elnyomni a pajzsmirigyrák sejtjeinek növekedését [156] és LC esetében elnyomja az aberráns sejtek fejlődését és

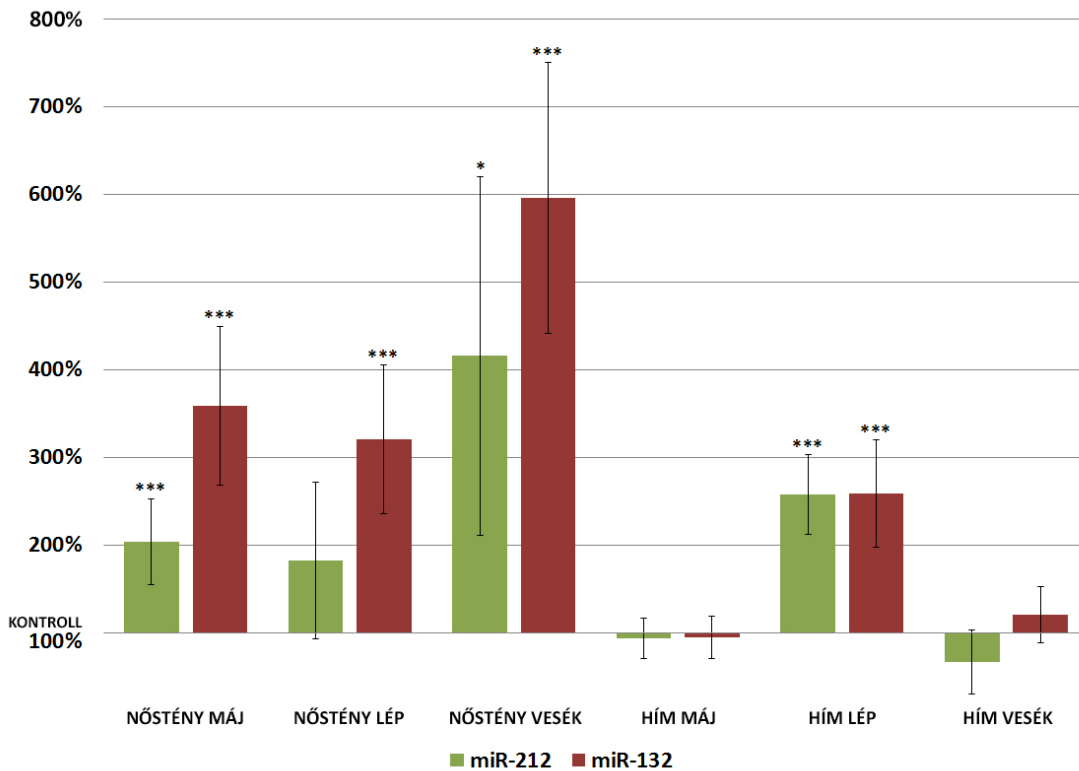
befolyásolja a sejtciklust a p21 és a ciklin D1 célzásával [157]. Biomarkerként megfigyelt, hogy túlzott expressziója GC esetén a nyirokcsomó áttét jelzője [132], valamint HCC-s betegeknél jelentősen csökken az expressziója a szérumban, ami szorosan összefügg a HCC kialakulásával, progressziójával és áttétképzésével [158].

Hasonlóképpen bebizonyosodott, hogy a vesesejtes karcinóma (RCC) esetén a miR-212 gátolja az RCC sejtek szaporodását, migrációját és invázióját és tumorszuppresszor hatást fejt ki a TBX15 (T-box transcription factor TBX15) alulszabályozásával [159,160]. Emellett a miR-212 az RCC sejtekben apoptózis szabályozó, azáltal, hogy a miR-212 közvetlen downstream célpontja a XIAP (X-Linked Inhibitor Of Apoptosis) és expressziós szintje negatívan korrelált az RCC szövetekben a XIAP kifejeződésével [160].

A miR-212 HCC esetén a FOXA1 (Forkhead Box A1) gén expressziójának gátlásával elnyomja a tumor növekedését [161], mely hatás azonban nonspecifikus, ugyanis a FOXA1 elengedhetetlen mind az ösztrogén, mind az androgén jelátviteli folyamatokhoz és a hímnem esetén gyakrabban kialakuló HCC-ben a szexuális dimorfizmus központi szabályozójaként működik [162]. Jelen vizsgálatban a miR-212 expresszió májszövetekben tapasztalt eredményei bár nemek szerint ellentétes (a hímek esetén csökkenő a nőstényeknél növekvő) irányúak, a FOXA1 regulációjával mindkét esetben inkább a daganat kialakulását előre mozdító hatásúak, ugyanis az expresszió növekedés a nőstények esetén a FOXA1 elnyomásával csökkenti az ösztrogén védő hatását, míg a hímek esetén a csökkent miR-212 szint segíti az androgén jelátvitel HCC esetén megfigyelt onkogén hatását. Ezzel korrelál az a korábbi megfigyelés, miszerint a FOXA1 elnyomása a nőstények esetén több és nagyobb daganatos sejtállományt, míg a hímeknél a tumornövekedés csökkenését eredményezte [163]. Ez rávilágít a HCC esetén fennálló, a nemi hormonok és fehérjék által közvetített kölcsönhatásokra, mely pontos megértéséhez további vizsgálatok szükségesek a résztvevő gének szabályozásban szerepet játszó miRNS-ek (pl. miR-212) hatásait illetően.

A miR-212 a vizsgálatunkban szereplő másik miRNS-rel, a miR-132-vel szorosan kapcsolódó erősen konzervált úgynevezett tandem miRNS [164], több közös downstream célmolekulával (pl. HB-EGF (Heparin-binding EGF-like growth factor))

[165,166], pRb [167]), így részben azonos hatásokkal. Ennek megfelelően a vizsgálatunkban a DMBA kezelést követően 24 órával a miR-212 expressziós változásai rendkívül hasonló mintázatot mutattak a miR-132 eltéréseivel, melyet a 10. ábra szemléltet.



**10. Ábra: A miR-132 és a miR-212 tandem miRNS-ek hasonló expressziós mintázata 24 órával a DMBA kezelést követően CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).**

Mégis annak ellenére, hogy a miR-212 expressziójában szignifikáns és erőteljes növekedést tapasztaltunk a nőstények májában és veséiben, valamint a hímek lépében, az összes kapott eredmény alapján (mely magába foglalja az összes vizsgált szervet mind a két nem esetén) a miR-212 biomarkerként történő használatát szignifikancia hiánya miatt jelen vizsgálatban elvetettük. Az eredményeink és az irodalmi adatok alapján azonban a későbbiekben célszerűnek tartjuk a miR-212 esetén a vizsgálatunk nagyobb elemszámmal történő megismétlését.

#### **4.4. miR-124-1**

A miR-124-1 tumorszupresszor hatása több mechanizmuson keresztül is megfigyelt. A miR-124-1 közvetlen célpontja a CASC3 fehérje, melyen keresztül képes inaktiválni a p38-MAPK, a JNK vagy az ERK jelutakat, gátolva ezzel a sejtek proliferációját [168].

Az Interleukin 11 (IL-11) túlzott expressziója számos ráktípus esetén megfigyelt, és kapcsolatot teremthet a gyulladások és a daganatok kialakulása között [169]. Az IL-11 emellett a miR-124-1 egyik célgénje, és a miR-124-1 az IL-11 downregulációján keresztül képes gátolni a sejtproliferációt, valamint a migrációt [170]. A miR-124-1 tumorszupresszor hatását figyelték meg továbbá a sejtciklushoz kapcsolódó Ciklin D1, a CDK2 (Cyclin-dependent kinase 2), a CDK4, valamint a CDK6 gátlásán keresztül is [171,172].

Emellett a DNS károsodás által kiváltott nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) aktiváció a hatékony tumorelles terápia egyik fő akadály, a miR-124-1 azonban elnyomja a TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor 6) expresszióját, ezzel gátolja az NF- $\kappa$ B jelátviteli utat [173].

Az ezek alapján a karcinogén expozíciót követően várt expressziós növekedés azonban csak a nőstény csoport esetén jelentkezett, ahol mindhárom vizsgált szervben erősen szignifikáns és jelentős növekedés volt tapasztalható, így a miR-124-1-et biomarkerként a nőstények esetén találtunk használhatónak.

A hímek esetén azonban a DMBA kezelés a miR-124-1 szintjének a csökkenését okozta, mely emellett nem minden szervben volt szignifikáns. A DMBA aktiválja a STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) transzkripciós faktort [174], melynek a miR-124-el szemben elnyomó hatása van [175], emellett STAT3 indukáló hatást a tesztoszteron esetén is megfigyeltek, mely a DMBA-val koherensen megmagyarázhatja a hím csoport esetén tapasztalt miR-124-1 downregulációt [176] a nőstények esetén tapasztalt emelkedéssel szemben.

#### **4.5. miR-155**

*In vivo* megfigyelt a miR-155 expresszió emelkedés különböző szövetekben (máj, lép, tüdő, vese) DMBA kezelést követően 3 és 6 órával [57]. Az eredményeink ezzel

korrelálva a DMBA expozíciót követően 24 órával is erős növekedést mutattak a hímek lépében és veséiben, valamint a nőstények májában. Egyirányú, pozitív változást az összes vizsgált szerv közül azonban egyedül a májban tapasztaltunk mindkét nem esetén, bár a hímeknél nem szignifikáns módon, ami megmagyarázható az ösztrogének miR-155 expressziót serkentő hatásával. Emellett a DMBA metabolikus aktivációját CYP enzimek végzik, főként a citokróm P450 1A1 (CYP1A1) és 1B1 (CYP1B1), amelyek a májban jellemzően nagy mennyiségben szintetizálódnak, így a DMBA hatása a miR-155 expresszióra ebben a szervben gyorsabban, dominánsabban érvényesülhet [177]. Megfigyelt továbbá, hogy a miR-155 expresszió májkárosodás esetén megemelkedik és védő hatást fejt ki az NF- $\kappa$ B jelátvitel elnyomásával [178], valamint olyan gyulladáso mediátorok csökkentésével, mint a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ) vagy az Interleukin 6 (IL-6). A TNF- $\alpha$  szintjének emelkedése egyébként fokozza a miR-155 expresszióját, mely a CARHSP1 (Calcium Regulated Heat Stable Protein 1) közreműködésével csökkenti a TNF- $\alpha$  mRNS stabilitását [179]. A miR-155 tehát egy negatív visszacsatolási hurokkal enyhíti a krónikus gyulladást a miR-155-CARHSP1-TNF- $\alpha$  útvonalon keresztül.

Emellett azonban a miR-155-öt a humán daganatok különböző típusaiban oncomiRNS-ként is azonosították, mely fokozott expressziójával gátolja olyan tumorszuppresszor targetek aktivitását, mint a TP53INP1 (Tumor protein p53 induced nuclear protein 1), a RhoA (Ras homolog family member A) GTP kötő fehérje, vagy a VHL (von Hippel-Lindau) tumorszuppresszor fehérje [180-182].

Az irodalomban és a vizsgálatunk során tapasztalt változatos adatok egyaránt rávilágítanak a miR-155 bonyolult működésére a karcinogenezis szempontjából akár onko és tumorszuppresszor módon. A változások pontos megértéséhez és a miR-155 szintet befolyásoló mechanizmusok pontos felderítéséhez azonban további vizsgálatok szükségesek, ezért jelen eredmények alapján a miR-155 korai biomarkerként a célunkként kitűzött vizsgálati panelben nem használható.

#### **4.6. miR-330**

A DMBA kezelés eredményeként a nőstény egerek lépében és a májában a miR-330 tumorszuppresszor expresszió kisebb mértékű növekedése volt megfigyelhető, mint a

hím egerek esetén. Ennek oka lehet a korábban említett proapoptikus PTEN tumorszuppresszor gén magas expressziója tesztoszteron hiányában [147], aminek a génterméke csökkenti a DMBA hatására fokozottan expresszáldó c-Myc fehérjék [53] által kifejtett onkogén hatást. Myc fehérjecsald onkogén hatásának csökkentése az ING4 (Inhibitor Of Growth Family Member 4) esetén is ismert [183], a miR-330 azonban gátolja az ING4 gén expresszióját és így – ebből a szempontból vizsgálva – akár a daganat-kialakulást elősegítő hatású is lehetne [184].

A nőstény egerek veséjében mért miR-330 tumorszuppresszor expressziójának emelkedése összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy az ösztrogén hatására megnövekedett RCC rizikóját csökkenti [185].

Egyébként ismeretes, hogy a DMBA okozta hiperkoleszterinémia [186] esetén az LDL-koleszterin (LDL) szintje nő, ami az LDL-receptor gén (LDLR) expressziójának a csökkenését okozhatja, míg a LDLR és a miR-330 egymás expresszióját keresztbeszabályozza [187].

Eredményeink és az irodalmi adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a miR-330 expressziós szintje biomarkerként főként a hím állatok esetén lehetne alkalmazható. Azonban az irodalmi adatok alapján a nemi hormonok sokrétű hatásai és a negatív visszacsatolási mechanizmus által történő szabályozás miatt, a miR-330 expresszió biomarkerként történő felhasználhatósága kérdéses és pontos funkcióinak felderítése további vizsgálatokat igényel.

#### **4.7. miR-29a**

A miR-29a részt vesz a sejtek proliferációjában, differenciálódásában, apoptózisában, angiogenezisében, metasztázisában, gyógyszerrezisztenciájában [115] és több daganattípusban alulszabályozott [188].

A DMBA expozíciót követően 12 órával megfigyelték a c-Myc génextpresszió fokozódását [53]. A Myc proto-onkogén azonban a miR-29a kifejeződését elnyomja például hasnyálmirigyrákban, mely LOXL2 (Lysyl Oxidase Like 2) reguláció csökkenését eredményezi, ezzel segítve a tumorképződést [189]. A LOXL2 ugyanis szerepet játszik a daganatsejtek inváziójában, a metasztázisképzésben, az angiogenezisben, valamint a

malignus transzformációban [190]. A miR-29a-nak tehát hatása van a DMBA daganatképző potenciáljára a Myc/miR-29a/LOXL2 útvonalon keresztül.

A DMBA expozíció, növeli a TGF- $\beta$ 1 mennyiségét, ami a csökkenti a miR-29a expresszióját [191,192]. Ugyanakkor a TGF- $\beta$ 1 onkogén hatása mellett az ezzel ellenkező tumorszuppresszor hatását is megfigyelték éppen a májsejtekben [193,194]. Például Zhang és mtsai. egérmodellben vizsgálva arra az eredményre jutottak, hogy a TGF- $\beta$ 1 hiányában spontán daganat képződik [195]. A TGF- $\beta$ 1 hatásainak változatos megnyilvánulásait megmagyarázza a miRNS-ek képessége a TGF- $\beta$ 1 szint regulálására [196], ami feltehetően a tumorszuppresszor miR-29a esetén egymást kölcsönösen keresztbe szabályozó jelleggel történik. Ez rávilágít arra, hogy más szabályozó faktorok a miR-29a-hoz képest erősebb hatással is bírhatnak a DMBA TGF- $\beta$ 1 által közvetített hatásait illetően.

Irodalmi adatok szerint a miR-29a számos sejtbiológiai folyamatban vesz részt, melyek még nincsenek teljesen feltárva. Figyelembe véve, hogy a miR-29a expresszió szignifikáns csökkenése az általunk vizsgált szervek közül jelentősen csak a hím állatok lépében volt tapasztalható, valamint, hogy a mechanizmus szabályozása összetett, látszólag ellentmondásos és még mindig nem feltárt, a miR-29a expresszió, mint biomarker, az általunk használt állatmodellben nem jöhet szóba.

#### **4.8. miR-9-1 és miR-9-3**

Irodalmi adatok szerint a miR-9 tumorszuppresszorként gátolja a HCC progresszióját, továbbá a miR-9-1 expressziója szignifikánsan csökkent a HCC szövetekben és negatív korrelációban áll a HCC teljes túlélési idejével [197,198]. Ismert, hogy a miR-9-1 csendesítése fokozza az onkogének expresszióját, melyet az általa regulált RUNX1-RUNX1T1 transzkripció faktor komplex indukál [199]. Továbbá igazolták, hogy a miR-9 csökkenés korai biomarkerként szolgál különböző rosszindulatú daganatok, például az emlőrák kialakulásakor [111]. A miR-9-3 lókuszra ható (és a DMBA hatására növelt expressziójú) c-Myc és n-Myc onkoproteinek a tumorsejtekben a miR-9 expressziójának növekedését okozzák, ami (ezúttal onkogéneket támogató módon viselkedve) az E-cadherin amplifikációján keresztül a c-Myc expressziójának további növekedését okozza, és ezen keresztül elősegíti a hepatocelluláris karcinóma

képződését [109,200]. Ezt a megállapítást alátámasztja az a tény, hogy a nőstény egerek májában jelentős különbséget találtunk a miR-9-1 és a miR-9-3 expressziója között.

A nőstény csoportban a miR-9-3 expressziója a védő jellegű ösztrogén ellenére is növekedett a DMBA kezelés után 24 órával minden vizsgált szervben, ellentétben a miR-9-1-gyel, ahol a májban csökkenést tapasztaltunk. Ahogy az irodalmi adatok alapján feltételezhető volt, a miR-9-3 a saját vizsgálatunk eredményei szerint is jól használható biomarkerként nőstény egyedek esetén. Így a miR-9-3 vizsgálatával, a DMBA kezelést feltételezeten kemopreventív anyagokkal kiegészítve, valószínűleg újabb molekuláris epidemiológiai összefüggéseket fedezhetünk fel. A miR-9-1 esetén általában, vagy a miR-9-3 esetén a hímeknél tapasztalt expressziós változások biomarkerként történő használatát azonban jelen vizsgálati eredmények alapján szignifikancia hiánya miatt elvetettük.

#### **4.9. miR-134**

Egyre több bizonyíték jelzi a miR-134 jelentős tumorszupresszor szerepét a karcinogenezisben. A miR-134 erős kifejeződése a c-Myc onkogén, a Cyclin E és a Cyclin D1 sejtciklus szabályozó fehérjék csökkent expressziós szintjét okozza, és a miR-134-el azonos irányú Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27) expresszió növekedés is megfigyelt, mely a CDK (Cyclin-dependent kinase) megkötésével szintén gátolja a sejtciklust [201,202]. Emellett tumorszupresszor hatást fejt ki olyan intracelluláris jelátviteli útvonalak szabályozásával is, mint a RAS/MAPK/ERK útvonal, vagy a RAS/PI3K/AKT jelátvitel, melyek befolyásolják a sejtek proliferációját, invázióját és apoptózisát [203,204]. Mindemellett a miR-134 alacsonyabb szintje negatívan befolyásolja több daganatos betegség prognózisát [97].

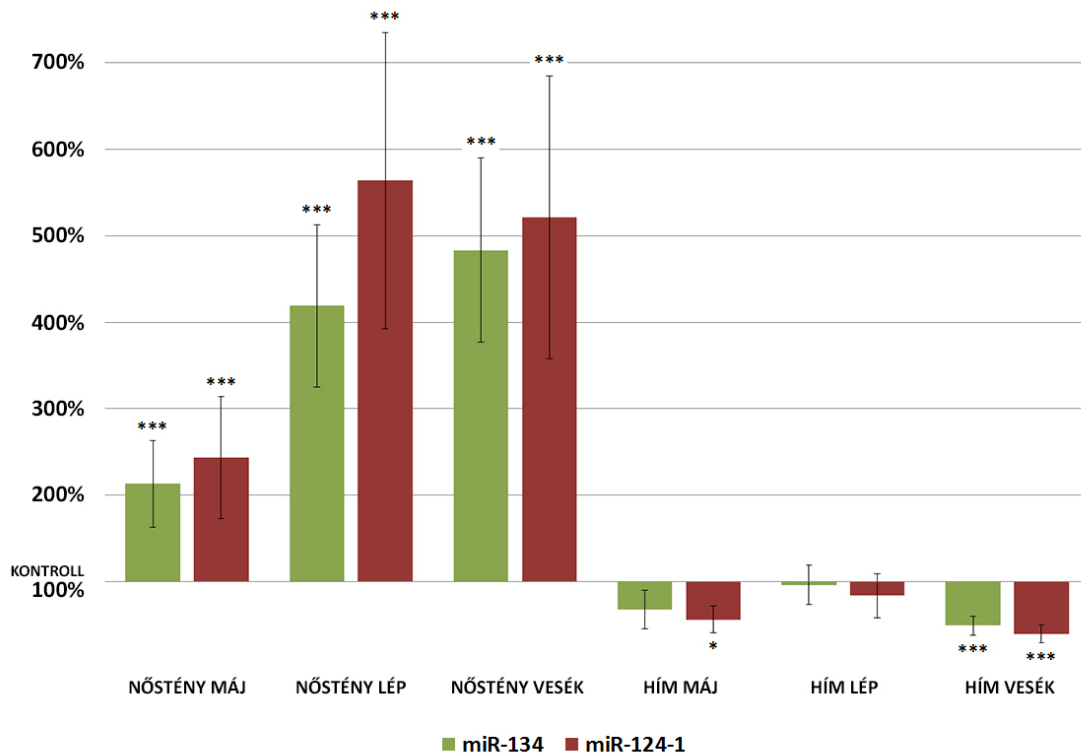
Az irodalmi adatok szerint a miR-134 jelentősen csökkent expressziót mutat RCC szövetekben [203], ezzel korrelál, hogy a hím egerek veséiben szignifikáns miR-134 expresszió csökkenést tapasztaltunk 24 órával a DMBA expozíciót követően. Mindemellett csökkenés volt megfigyelhető – bár nem statisztikailag szignifikánsan – a többi vizsgált szervben is, így a hím egerek esetén a miR-134 tumorszupresszor hatása csekélyebb mértékben érvényesült. A nőstények veséiben ezzel éppen ellenkezőleg,



jelentős növekedést okozott a DMBA kezelés 24 óra elteltével, mely egyaránt megfigyelhető volt a májban és a lépben is.

Az egyértelmű és jelentős nemi eltérések hátterében a miR-134 olyan upstream regulátorai állhatnak, mint az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktor, melynek aberráns aktivációja megfigyelt a rosszindulatú daganatos sejtvonalakon [205]. A DMBA növeli az NF- $\kappa$ B expresszióját [206], mely olyan további downstream gének működését szabályozza, amelyek kulcsszerepet játszanak a rák kialakulásában, a proliferációban, migrációban vagy az apoptózisban [207,208]. Az NF- $\kappa$ B többek között a miR-134 inhibitora is [209], tehát a DMBA az NF- $\kappa$ B erősebb expresszióján keresztül csökkentheti a miR-134 kifejeződését, mely megmagyarázhatja a hím egerek esetén megfigyelt csökkenéseket. A nőstény egerek esetén azonban az ösztrogén receptor (ER) gátolja az NF- $\kappa$ B aktivációt [210], így gátolja annak represszív hatását a miR-134-re, mely ebben az esetben az expresszió határozott növekedéséhez vezethetett.

Megfigyelt továbbá, hogy a vizsgálatunkban szereplő miR-124-1 növelt expressziója, a TRAF6 szabályozásával az NF- $\kappa$ B -re szintén csendesítő hatással van [173], ezáltal csökkenti a miR-134 NF- $\kappa$ B által közvetített inhibícióját. Ennek megnyilvánulása eredményeinkben is megfigyelhető (11. ábra), ugyanis a miR-134 és a miR-124-1 rendkívül hasonló expressziós mintázatát tapasztaltuk. Ezek alapján feltételezhető, hogy a miR-124-1 az TRAF6/NF- $\kappa$ B útvonalon szabályozza a miR-134 expresszióját [173,209].

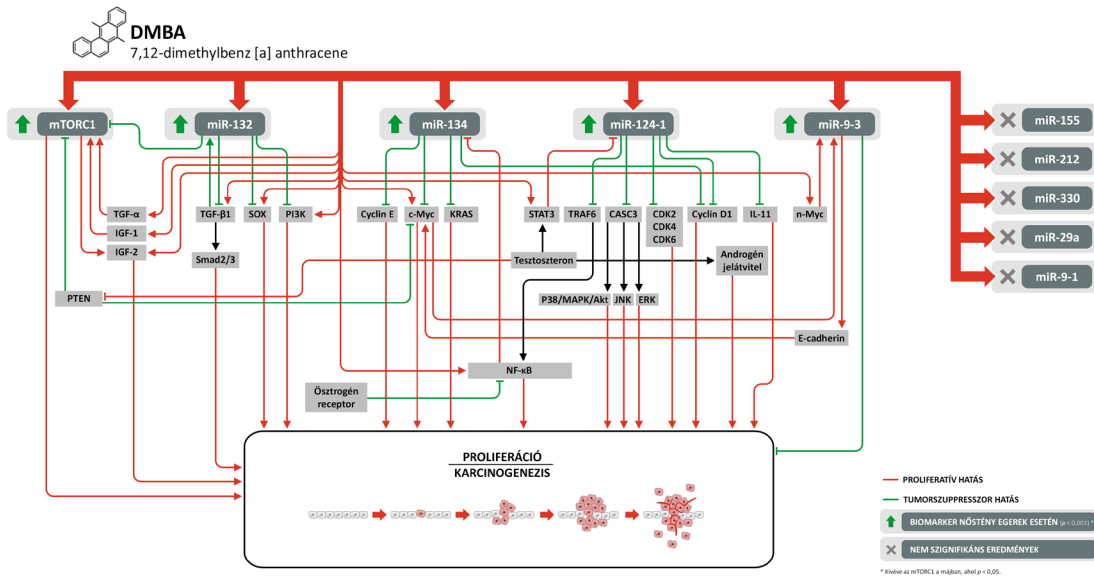


**11. Ábra: A miR-134 és a miR-124-1 expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).**

Figyelembe véve a nemi jellegű hormonális különbségek hatását és a vizsgált szervekben tapasztalt statisztikailag szignifikáns határozott növekedéseket, végül a miR-134 expresszióját biomarkerként csak a nőstény egyedek esetén találtuk használhatónak.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

Összességében véve az mTORC1 gén és a vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, miR-9-3, miR-29a, miR-124-1, miR-132, miR-134, miR-155, miR-212, miR-330) közül konzekvens és jelentős változást, mely statisztikailag szignifikáns mértékű és azonos irányú minden vizsgált szervben, a nőstény egerek miR-134, miR-132, miR-124-1, miR-9-3 miRNS-ei és az mTORC1 gén esetén tapasztaltunk (12. ábra). Ezen lényeges vizsgálati szempontok a többi miRNS esetén, vagy általában a hím állatok vizsgált szerveiben kevésbé teljesültek, melynek hátterében olyan eltérő szabályozási mechanizmusok és nemekre jellemző hormonális különbségek állhatnak (például az ösztrogén és a tesztoszteron hatásai), melyek felderítéséhez további vizsgálatok szükségesek.



**12. ÁBRA:** A vizsgálat során alkalmas biomarkernek ítélt miR-9-3, miR-124-1, miR-132, miR-134 és mTORC1 expressziók változásai 24 órával a DMBA kezelést követően és a szakirodalmi adatok alapján érintett, a megbeszélésben kifejtett releváns jelátviteli útvonalak (az ábra nagyobb méretben megtalálható a függelékben).

Eredményeink hangsúlyozzák, hogy míg a génexpressziós és miRNS expressziós változások érzékeny biomarkerek, és a klasszikus genotoxicitási tesztekkel ellentétben képesek kimutatni a karcinogén expozíció kisebb vagy korai jeleit, befolyásolhatják őket potenciális zavaró tényezők. Így egy korai karcinogenitási tesztrendszer kidolgozása a használt gének és miRNS-ek gondos kiválasztását igényli, mivel akár a

nemi jellegű hormonális különbségek is jelentősen befolyásolhatják az expressziós mintázatokat. A miRNS-ek és gének emellett direkt módon vagy olykor közvetve más géntermékek közreműködésén keresztül egymás kifejeződését/hatását is befolyásolják, melyet több tekintetben, a vizsgálatunkban szereplő gén és miRNS-ek esetén is megfigyelhettünk: például feltehetően az mTORC1 expressziós növekedésére válaszként emelkedik a miR-132 kifejeződése, a miR-124-1 pedig a TRAF6/NF- $\kappa$ B útvonalon szabályozza a miR-134 expresszióját. Ezen jelátviteli kölcsönhatások pontos felderítése és megismerése újabb vizsgálatok célpontja lehet.

A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134 miRNS-eket és a mTORC1 gént (ellentétben a miR-330, a miR-29a, a miR-9-1, miR-212 és a miR-155 miRNS-ekkel) biomarkerként alkalmasnak találtunk nőstény egyedek esetén a DMBA vagy a hozzá hasonló potenciális kémiai karcinogén anyagok gyors vizsgálatára [211,212].

Mindemellett ugyanez a modell alkalmazható kemopreventív hatások tanulmányozására is, a DMBA és a feltételezett kemopreventív anyagok egyidejű alkalmazása mellett annak a megfigyelésével, hogy a vizsgálatba bevont anyagok mennyire képesek csökkenteni/megakadályozni a DMBA által kiváltott gén és miRNS expressziós növekedéseket 24 óra elteltével. A céljainkkal összhangban tehát, a kutatásunkban megtervezett vizsgálati panel kialakítása a miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132 és a miR-134 miRNS-ek, valamint az mTORC1 gén bevonásával megvalósult.

A karcinogenezis molekuláris folyamatainak a komplexitása szükségessé teszi a tesztrendszerek kiterjesztését a jelátviteli utak és szabályozók lehető legszélesebb körére. A miR-9-3, miR-124-1, miR-132 és miR-134 miRNS-ek és az mTORC1 gén olyan jelátviteli utakban érintettek, mint a RAS/MAPK/ERK, RAS/PI3K/AKT, p38 MAPK, vagy a JNK, melyek már a karcinogenezis korai fázisában jellemzően magasabb aktivitást mutatnak. Emellett ez a négy miRNS szabályozza különböző növekedési faktorok, növekedési faktor receptorok, szignál transzdukciós proteinek, transzkripciós faktorok, sejtciklus szabályozók, tumorszuppresszor gének, gyulladáshoz mediátorok és közvetett módon akár további miRNS-ek szintézisét, melyek kulcsszerppel bírnak a proliferációs aktivitásban és/vagy a karcinogenezis folyamatában. A vizsgálati panelünkkel, a karcinogenezisben részt vevő jelátviteli utak és szabályozó fehérjék széles érintettsége

végezt, a hagyományos génextpressziós modelleknél komplexebben, nagyobb érzékenységgel detektálhatók a kémiai karcinogének által indukált korai molekuláris folyamatok és a kemopreventív anyagok védő jellegű hatásai. Az egyelemű gén vagy miRNS experssiós vizsgálatokkal összehasonlítva, ez a robusztus elemzési stratégia lehetővé teszi a feltételezett karcinogén expozíció hatékonyabb kvalitatív és kvantitatív észlelését. Mindemellett, ha szükségessé válik a későbbiekben, a modell tovább optimalizálható további miRNS-ek és gének bevonásával és azok súlyában fennálló lehetséges különbségek feltárásával.

A gyakorlatban alkalmazva, a karcinogenezis prediktív jelzésére kialakított 5 biomarkeren alapuló vizsgálati panel értékes eszközként szolgálhat további vizsgálatokhoz, karcinogén expozíciók detektálásához, valamint kemopreventív és/vagy komplementer terápiás tumorsuppresszor vegyületek felderítéséhez, így a primer, szekunder és terciér prevenció eszközeként használva, új lehetőségeket nyithat meg a daganatok incidenciájának és mortalitásának csökkentése terén.

## 6. ÚJ EREDMÉNYEK

Kutatásunk során igazolást nyertek az alábbi új eredmények:

1. Az mTORC1 gén expressziója statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a nőstény CBA/Ca egerek májában\*, lépében\*\*\* és veséiben\*\*\* 24 órával a DMBA expozíciót követően (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).
2. A miR-9-3 miRNS expressziója statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a nőstény CBA/Ca egerek májában\*\*\*, lépében\*\*\* és veséiben\*\*\* 24 órával a DMBA expozíciót követően (\*\*\* $p < 0,001$ ).
3. A miR-124-1 miRNS expressziója statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a nőstény CBA/Ca egerek májában\*\*\*, lépében\*\*\* és veséiben\*\*\* 24 órával a DMBA expozíciót követően (\*\*\* $p < 0,001$ ).
4. A miR-132 miRNS expressziója statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a nőstény CBA/Ca egerek májában\*\*\*, lépében\*\*\* és veséiben\*\*\* 24 órával a DMBA expozíciót követően (\*\*\* $p < 0,001$ ).
5. A miR-134 miRNS expressziója statisztikailag szignifikáns növekedést mutat a nőstény CBA/Ca egerek májában\*\*\*, lépében\*\*\* és veséiben\*\*\* 24 órával a DMBA expozíciót követően (\*\*\* $p < 0,001$ ).
6. A miR-9-3, a miR-124-1, a miR-132, és a miR-134 miRNS-ek, valamint az mTORC1 gén expressziójának növekedése korai biomarkerként jelzi a nőstény CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben a DMBA okozta karcinogén hatást 24 órával az expozíciót követően.

## IRODALOMJEGYZÉK

1. Nagata S. Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annu Rev Immunol.* 2018 Apr 26;36:489–517.
2. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2021 Feb 4.
3. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M; Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet.* 2005 Nov 19;366(9499):1784–93.
4. Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jul 21;91(14):1194–210.
5. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010 Jun;138(6):2044–58.
6. Pellat A, Netter J, Perkins G, Cohen R, Coulet F, Parc Y, Svrcek M, Duval A, André T. Syndrome de Lynch : quoi de neuf ? [Lynch syndrome: What is new?]. *Bull Cancer.* 2019 Jul Aug;106(7 8):647–655. French.
7. Fodde R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2002 May;38(7):867–71.
8. Thanikachalam K, Khan G. Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients.* 2019 Jan 14;11(1):164.
9. Yang WS, Zeng XF, Liu ZN, Zhao QH, Tan YT, Gao J, Li HL, Xiang YB. Diet and liver cancer risk: a narrative review of epidemiological evidence. *Br J Nutr.* 2020 Aug 14;124(3):330–340.
10. Zhang L, Sanagapalli S, Stoita A. Challenges in diagnosis of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2018 May 21;24(19):2047–2060.
11. Brenner H, Jansen L, Ulrich A, Chang Claude J, Hoffmeister M. Survival of patients with symptom and screening detected colorectal cancer. *Oncotarget.* 2016 Jul 12;7(28):44695–44704
12. Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E, Malvezzi M. European cancer mortality predictions for the year 2020 with a focus on prostate cancer. *Ann Oncol.* 2020 May;31(5):650–658
13. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. World Health Organization of the United Nations, International Agency for Research on Cancer. 2020 Febr. 20.
14. A magyar Nemzeti Rákregiszter adatbázisa. Forrás: <http://stat.nrr.hu> Szűrés dátuma: 2021.02.23.
15. Van Cott C. Cancer genetics. *Surg Clin North Am.* 2020 Jun;100(3):483–498.
16. Lohmann DR, Gallie BL. Retinoblastoma. 2000 Jul 18 [updated 2018 Nov 21]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, Amemiya

- A, editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2020.
17. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006 Aug 28;25(38):5220–7.
  18. Gudiseva HV, Berry JL, Polski A, Tummina SJ, O'Brien JM. Next generation technologies and strategies for the management of retinoblastoma. *Genes (Basel)*. 2019 Dec 11;10(12):1032.
  19. Kleinerman RA, Tucker MA, Tarone RE, Abramson DH, Seddon JM, Stovall M, Li FP, Fraumeni JF Jr. Risk of new cancers after radiotherapy in long term survivors of retinoblastoma: an extended follow up. *J Clin Oncol*. 2005 Apr 1;23(10):2272–9
  20. Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer review paper. *Ann Agric Environ Med*. 2019 Mar 22;26(1):1–7.
  21. McCulloch SD, Kunkel TA. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases. *Cell Res*. 2008 Jan;18(1):148–61
  22. López Sáez JF, de la Torre C, Pincheira J, Giménez Martín G. Cell proliferation and cancer. *Histol Histopathol*. 1998 Oct;13(4):1197–214.
  23. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 Sep 26;30(1):87.
  24. Avgerinos KI, Spyrou N, Mantzoros CS, Dalamaga M. Obesity and cancer risk: Emerging biological mechanisms and perspectives. *Metabolism*. 2019 Mar;92:121–135.
  25. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006 Feb;7(2):149–56.
  26. Doll R, Peto R, Boreham J, Sutherland I. Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ*. 2004 Jun 26;328(7455):1519.
  27. Schiffman M, Doorbar J, Wentzensen N, de Sanjosé S, Fakhry C, Monk BJ, Stanley MA, Franceschi S. Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2016 Dec 1;2:16086.
  28. Wroblewski LE, Peek RM Jr, Wilson KT. Helicobacter pylori and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Oct;23(4):713–39
  29. Kensler TW, Qian GS, Chen JG, Groopman JD. Translational strategies for cancer prevention in liver. *Nat Rev Cancer*. 2003 May;3(5):321–9
  30. Berta E, Egresi A, Bacsárdi A, Gáspár Z, Lengyel G, Hagymási K. Hepatitis C-vírus-fertőzés és hepatocarcinogenesis [Hepatitis C virus infection and hepatocarcinogenesis]. *Orv Hetil*. 2019 Jun;160(22):846–853.
  31. Faustino Rocha AI, Ferreira R, Oliveira PA, Gama A, Ginja M. N Methyl N nitrosourea as a mammary carcinogenic agent. *Tumour Biol*. 2015 Dec;36(12):9095–117.
  32. Guengerich FP, Shimada T. Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mutat Res*. 1998 May 25;400(1–2):201–13.



33. Iyanagi T. Molecular mechanism of phase I and phase II drug metabolizing enzymes: implications for detoxification. *Int Rev Cytol.* 2007;260:35–112.
34. Yu Z, Tian X, Peng Y, Sun Z, Wang C, Tang N, Li B, Jian Y, Wang W, Huo X, Ma X. Mitochondrial cytochrome P450 (CYP) 1B1 is responsible for melatonin induced apoptosis in neural cancer cells. *J Pineal Res.* 2018 Aug;65(1):e12478.
35. Guengerich FP. Cytochrome P450 2E1 and its roles in disease. *Chem Biol Interact.* 2020 May 1;322:109056.
36. Ji L, Schüürmann G. Computational biotransformation profile of paracetamol catalyzed by cytochrome P450. *Chem Res Toxicol.* 2015 Apr 20;28(4):585–96.
37. Zhou SF, Liu JP, Chowbay B. Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. *Drug Metab Rev.* 2009;41(2):89–295.
38. Fujiki H, Suganuma M. Tumor promoters microcystin LR, nodularin and TNF  $\alpha$  and human cancer development. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011 Jan;11(1):4–18.
39. Blumberg PM. Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.* 1988 Jan 1;48(1):1-8.
40. Goldar S, Khaniani MS, Derakhshan SM, Baradaran B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(6):2129–44.
41. Martin GS. Cell signaling and cancer. *Cancer Cell.* 2003 Sep;4(3):167–74.
42. Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology.* 2005;69 Suppl 3:4–10.
43. Janiszewska M, Primi MC, Izard T. Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J Biol Chem.* 2020 Feb 21;295(8):2495–2505.
44. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990 Jun 1;61(5):759–67.
45. Bosland MC, Prinsen MK. Induction of dorsolateral prostate adenocarcinomas and other accessory sex gland lesions in male Wistar rats by a single administration of N methyl N nitrosourea, 7,12 dimethylbenz(a)anthracene, and 3,2' dimethyl 4 aminobiphenyl after sequential treatment with cyproterone acetate and testosterone propionate. *Cancer Res.* 1990 Feb 1;50(3):691–9.
46. El Sohemy A, Archer MC. Inhibition of N methyl N nitrosourea and 7,12 dimethylbenz[a] anthracene induced rat mammary tumorigenesis by dietary cholesterol is independent of Ha Ras mutations. *Carcinogenesis.* 2000 Apr;21(4):827–31.
47. Lee LL, Lee JS, Waldman SD, Casper RF, Grynepas MD. Polycyclic aromatic hydrocarbons present in cigarette smoke cause bone loss in an ovariectomized rat model. *Bone.* 2002 Jun;30(6):917-23.
48. Currier N, Solomon SE, Demicco EG, Chang DL, Farago M, Ying H, Dominguez I, Sonenshein GE, Cardiff RD, Xiao ZX, Sherr DH, Seldin DC. Oncogenic signaling

- pathways activated in DMBA-induced mouse mammary tumors. *Toxicol Pathol.* 2005;33(6):726-37.
49. Li N, Chen X, Liao J, Yang G, Wang S, Josephson Y, Han C, Chen J, Huang MT, Yang CS. Inhibition of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. *Carcinogenesis.* 2002 Aug;23(8):1307-13.
  50. Gao J, Lauer FT, Dunaway S, Burchiel SW. Cytochrome P450 1B1 is required for 7,12 dimethylbenz(a) anthracene (DMBA) induced spleen cell immunotoxicity. *Toxicol Sci.* 2005 Jul;86(1):68–74.
  51. Lindhe O, Granberg L, Brandt I. Target cells for cytochrome p450 catalysed irreversible binding of 7,12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in rodent adrenal glands. *Arch Toxicol.* 2002 Aug;76(8):460–6.
  52. Budán F, Varjas T, Nowrasteh G, Varga Z, Boncz I, Cseh J, Prantner I, Antal T, Pázsit E, Gobel G, Bauer M, Gracza T, Perjési P, Ember I, Gyöngyi Z. Early modification of c-myc, Ha-ras and p53 expressions by N-methyl-N-nitrosourea. *In Vivo.* 2008 Nov-Dec;22(6):793-7.
  53. Budán F, Varjas T, Nowrasteh G, Prantner I, Varga Z, Ember A, Cseh J, Gombos K, Pázsit E, Gobel G, Bauer M, Gracza T, Arany I, Perjési P, Ember I, Kiss I. Early modification of c myc, Ha ras and p53 expressions by chemical carcinogens (DMBA, MNU). *In Vivo.* 2009 Jul Aug;23(4):591–8.
  54. Hosny S, Sahyon H, Youssef M, Negm A. Oleanolic Acid Suppressed DMBA-Induced Liver Carcinogenesis through Induction of Mitochondrial-Mediated Apoptosis and Autophagy. *Nutr Cancer.* 2021;73(6):968-982.
  55. Li R, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex).* 2016;1(1):9-21.
  56. Ember I, Kiss I, Pusztai Z. Effect of 7,12 dimethylbenz(a)anthracene on onco/suppressor gene action in vivo: a short term experiment. *Anticancer Res.* 1998 Jan Feb;18(1A):445–7.
  57. Juhász K, Gombos K, Szirmai M, Révész P, Magda I, Gocze K, Ember I. DMBA induces deregulation of miRNA expression of let-7, miR-21 and miR-146a in CBA/CA mice. *In Vivo.* 2012 Jan-Feb;26(1):113–7.
  58. Weitz J, Koch M, Debus J, Höhler T, Galle PR, Büchler MW. Colorectal cancer. *Lancet.* 2005 Jan 8 14;365(9454):153–65.
  59. Haraldsdottir S, Einarsdottir HM, Smaradottir A, Gunnlaugsson A, Halfdanarson TR. Krabbamein í ristli og endaðarmi [Colorectal cancer review]. *Laeknabladid.* 2014 Feb;100(2):75–82. Icelandic.
  60. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2000 Nov 20;455(1 2):29–60.
  61. Zeiger E. The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals. *Mutat Res.* 2019 May;841:43–48.

62. Dolan M. The role of the Giemsa stain in cytogenetics. *Biotech Histochem.* 2011 Apr;86(2):94–7.
63. Perri F, Longo F, Giuliano M, Sabbatino F, Favia G, Ionna F, Addeo R, Della Vittoria Scarpati G, Di Lorenzo G, Pisconti S. Epigenetic control of gene expression: Potential implications for cancer treatment. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017 Mar;111:166–172.
64. Frenk S, Houseley J. Gene expression hallmarks of cellular ageing. *Biogerontology.* 2018 Dec;19(6):547–566.
65. Kwa M, Makris A, Esteva FJ. Clinical utility of gene expression signatures in early stage breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017 Oct;14(10):595–610.
66. Yang ZY, Liu XY, Shu J, Zhang H, Ren YQ, Xu ZB, Liang Y. Multi view based integrative analysis of gene expression data for identifying biomarkers. *Sci Rep.* 2019 Sep 18;9(1):13504.
67. Rabanal Ruiz Y, Otten EG, Korolchuk VI. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem.* 2017 Dec 12;61(6):565–584.
68. Thoreen CC. The molecular basis of mTORC1 regulated translation. *Biochem Soc Trans.* 2017 Feb 8;45(1):213–221.
69. Condon KJ, Sabatini DM. Nutrient regulation of mTORC1 at a glance. *J Cell Sci.* 2019 Nov 13;132(21):jcs222570.
70. Kim LC, Cook RS, Chen J. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene.* 2017 Apr 20;36(16):2191–2201.
71. Yoshida GJ. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J Exp Clin Cancer Res.* 2015 Oct 6;34:111.
72. Maan M, Peters JM, Dutta M, Patterson AD. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018 Oct 7;504(3):582–589.
73. Bjedov I, Toivonen JM, Kerr F, Slack C, Jacobson J, Foley A, Partridge L. Mechanisms of life span extension by rapamycin in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Cell Metab.* 2010 Jan;11(1):35–46.
74. Wu JJ, Liu J, Chen EB, Wang JJ, Cao L, Narayan N, Fergusson MM, Rovira II, Allen M, Springer DA, Lago CU, Zhang S, DuBois W, Ward T, deCabo R, Gavrilova O, Mock B, Finkel T. Increased mammalian lifespan and a segmental and tissue specific slowing of aging after genetic reduction of mTOR expression. *Cell Rep.* 2013 Sep 12;4(5):913–20.
75. Sato T, Nakashima A, Guo L, Coffman K, Tamanoi F. Single amino acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene.* 2010 May 6;29(18):2746–52.
76. Hall MN. mTOR what does it do? *Transplant Proc.* 2008 Dec;40(10 Suppl):S5–8.
77. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell.* 2018 Mar 22;173(1):20–51.
78. Zhu H, Fan GC. Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease. *Am J Cardiovasc Dis.* 2011 Jul 30;1(2):138–149.

79. de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, Åström G, Babina M, Bertin N, Burroughs AM, Carlisle AJ, Daub CO, Detmar M, Deviatiiarov R, Fort A, Gebhard C, Goldowitz D, Guhl S, Ha TJ, Harshbarger J, Hasegawa A, Hashimoto K, Herlyn M, Heutink P, Hitchens KJ, Hon CC, Huang E, Ishizu Y, Kai C, Kasukawa T, Klinken P, Lassmann T, Lecellier CH, Lee W, Lizio M, Makeev V, Mathelier A, Medvedeva YA, Mejhert N, Mungall CJ, Noma S, Ohshima M, Okada Hatakeyama M, Persson H, Rizzu P, Roudnicky F, Sætrom P, Sato H, Severin J, Shin JW, Swoboda RK, Tarui H, Toyoda H, Vitting Seerup K, Winteringham L, Yamaguchi Y, Yasuzawa K, Yoneda M, Yumoto N, Zabierowski S, Zhang PG, Wells CA, Summers KM, Kawaji H, Sandelin A, Rehli M; FANTOM Consortium, Hayashizaki Y, Carninci P, Forrest ARR, de Hoon MJL. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. *Nat Biotechnol.* 2017 Sep;35(9):872–878.
80. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell.* 2007 Jul 13;130(1):89–100.
81. Stavast CJ, Erkeland SJ. The Non-Canonical Aspects of MicroRNAs: Many Roads to Gene Regulation. *Cells.* 2019 Nov 19;8(11):1465.
82. Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. *Mol Cell.* 2010 May 14;38(3):323–32.
83. Murchison EP, Hannon GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Jun;16(3):223–9.
84. Lund E, Dahlberg JE. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2006;71:59–66.
85. Santhekadur PK, Kumar DP. RISC assembly and post transcriptional gene regulation in Hepatocellular Carcinoma. *Genes Dis.* 2019 Sep 17;7(2):199–204.
86. Pratt AJ, MacRae IJ. The RNA induced silencing complex: a versatile gene silencing machine. *J Biol Chem.* 2009 Jul 3;284(27):17897–901.
87. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018 Aug 3;9:402.
88. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009 Jan 23;136(2):215–33.
89. Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. *Nat Genet.* 2006 Jun;38 Suppl:S8–13.
90. Bueno MJ, Malumbres M. MicroRNAs and the cell cycle. *Biochim Biophys Acta.* 2011 May;1812(5):592–601.
91. Bueno MJ, Pérez de Castro I, Malumbres M. Control of cell proliferation pathways by microRNAs. *Cell Cycle.* 2008 Oct;7(20):3143–8.
92. Ji Q, Hao X, Meng Y, Zhang M, Desano J, Fan D, Xu L. Restoration of tumor suppressor miR 34 inhibits human p53 mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer.* 2008 Sep 21;8:266.

93. Kim S, Lee UJ, Kim MN, Lee EJ, Kim JY, Lee MY, Choung S, Kim YJ, Choi YC. MicroRNA miR 199a\* regulates the MET proto oncogene and the downstream extracellular signal regulated kinase 2 (ERK2). *J Biol Chem*. 2008 Jun 27;283(26):18158–66.
94. He C, Xiong J, Xu X, Lu W, Liu L, Xiao D, Wang D. Functional elucidation of MiR 34 in osteosarcoma cells and primary tumor samples. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 9;388(1):35–40.
95. Corney DC, Flesken Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA 34b and MicroRNA 34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion independent growth. *Cancer Res*. 2007 Sep 15;67(18):8433–8.
96. Sun CC, Li SJ, Li DJ. Hsa miR 134 suppresses non small cell lung cancer (NSCLC) development through down regulation of CCND1. *Oncotarget*. 2016 Jun 14;7(24):35960–35978.
97. Pan JY, Zhang F, Sun CC, Li SJ, Li G, Gong FY, Bo T, He J, Hua RX, Hu WD, Yuan ZP, Wang X, He QQ, Li DJ. miR 134: A Human Cancer Suppressor? *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017 Mar 17;6:140–149.
98. Sun YM, Lin KY, Chen YQ. Diverse functions of miR 125 family in different cell contexts. *J Hematol Oncol*. 2013 Jan 15;6:6.
99. Rajabi H, Jin C, Ahmad R, McClary C, Joshi MD, Kufe D. MUCIN 1 ONCOPROTEIN EXPRESSION IS SUPPRESSED BY THE miR 125b ONCOMIR. *Genes Cancer*. 2010 Jan 1;1(1):62–68.
100. Bi Q, Tang S, Xia L, Du R, Fan R, Gao L, Jin J, Liang S, Chen Z, Xu G, Nie Y, Wu K, Liu J, Shi Y, Ding J, Fan D. Ectopic expression of MiR 125a inhibits the proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma by targeting MMP11 and VEGF. *PLoS One*. 2012;7(6):e40169.
101. Tang F, Zhang R, He Y, Zou M, Guo L, Xi T. MicroRNA 125b induces metastasis by targeting STARD13 in MCF 7 and MDA MB 231 breast cancer cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e35435.
102. Li S, Zhang T, Zhou X, Du Z, Chen F, Luo J, Liu Q. The tumor suppressor role of miR 155 5p in gastric cancer. *Oncol Lett*. 2018 Aug;16(2):2709–2714.
103. Michaille JJ, Awad H, Fortman EC, Efanov AA, Tili E. miR 155 expression in antitumor immunity: The higher the better? *Genes Chromosomes Cancer*. 2019 Apr;58(4):208–218.
104. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 2;101(9):2999–3004.
105. Visone R, Croce CM. MiRNAs and cancer. *Am J Pathol*. 2009 Apr;174(4):1131–8.
106. Li M, Huo X, Davuljigari CB, Dai Q, Xu X. MicroRNAs and their role in environmental chemical carcinogenesis. *Environ Geochem Health*. 2019 Feb;41(1):225–247.

107. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Wang J, Zen K, Zhang J, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008 Oct;18(10):997–1006.
108. Xu XZ, Li XA, Luo Y, Liu JF, Wu HW, Huang G. MiR 9 promotes synovial sarcoma cell migration and invasion by directly targeting CDH1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2019 Jul;112:61–71.
109. Ma L, Young J, Prabhala H, Pan E, Mestdagh P, Muth D, Teruya Feldstein J, Reinhardt F, Onder TT, Valastyan S, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J, Weinberg RA. miR 9, a MYC/MYCN activated microRNA, regulates E cadherin and cancer metastasis. *Nat Cell Biol.* 2010 Mar;12(3):247–56.
110. Yu PY, Balkhi MY, Ladner KJ, Alder H, Yu L, Mo X, Kraybill WG, Guttridge DC, Iwenofu OH. A selective screening platform reveals unique global expression patterns of microRNAs in a cohort of human soft tissue sarcomas. *Lab Invest.* 2016 Apr;96(4):481–91.
111. Orangi E, Motovali Bashi M. Evaluation of miRNA 9 and miRNA 34a as potential biomarkers for diagnosis of breast cancer in Iranian women. *Gene.* 2019 Mar 1;687:272–279.
112. Yanaihara N, Noguchi Y, Saito M, Takenaka M, Takakura S, Yamada K, Okamoto A. MicroRNA Gene Expression Signature Driven by miR 9 Overexpression in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *PLoS One.* 2016 Sep 9;11(9):e0162584.
113. Nagano H, Tomimaru Y, Eguchi H, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Kobayashi S, Mori M, Doki Y. MicroRNA 29a induces resistance to gemcitabine through the Wnt/ $\beta$  catenin signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Int J Oncol.* 2013 Oct;43(4):1066–72.
114. Zhu XC, Dong QZ, Zhang XF, Deng B, Jia HL, Ye QH, Qin LX, Wu XZ. microRNA 29a suppresses cell proliferation by targeting SPARC in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med.* 2012 Dec;30(6):1321–6.
115. Wang JY, Zhang Q, Wang DD, Yan W, Sha HH, Zhao JH, Yang SJ, Zhang HD, Hou JC, Xu HZ, He YJ, Hu JH, Zhong SL, Tang JH. MiR 29a: a potential therapeutic target and promising biomarker in tumors. *Biosci Rep.* 2018 Feb 8;38(1):BSR20171265.
116. Desjobert C, Renalier MH, Bergalet J, Dejean E, Joseph N, Kruczynski A, Soulier J, Espinos E, Meggetto F, Cavaillé J, Delsol G, Lamant L. MiR 29a down regulation in ALK positive anaplastic large cell lymphomas contributes to apoptosis blockade through MCL 1 overexpression. *Blood.* 2011 Jun 16;117(24):6627–37.
117. Yang YL, Wang FS, Li SC, Tiao MM, Huang YH. MicroRNA 29a Alleviates Bile Duct Ligation Exacerbation of Hepatic Fibrosis in Mice through Epigenetic Control of Methyltransferases. *Int J Mol Sci.* 2017 Jan 18;18(1):192.
118. Jia P, Cai H, Liu X, Chen J, Ma J, Wang P, Liu Y, Zheng J, Xue Y. Long non coding RNA H19 regulates glioma angiogenesis and the biological behavior of glioma

- associated endothelial cells by inhibiting microRNA 29a. *Cancer Lett.* 2016 Oct 28;381(2):359–69.
119. Wang H, Li C, Jian Z, Ou Y, Ou J. TGF  $\beta$ 1 Reduces miR 29a Expression to Promote Tumorigenicity and Metastasis of Cholangiocarcinoma by Targeting HDAC4. *PLoS One.* 2015 Oct 6;10(10):e0136703.
  120. Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, Fraga MF, Cerrato C, Setién F, Casado S, Suarez Gauthier A, Sanchez Cespedes M, Git A, Spiteri I, Das PP, Caldas C, Miska E, Esteller M. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* 2007 Feb 15;67(4):1424–9.
  121. Furuta M, Kozaki KI, Tanaka S, Arii S, Imoto I, Inazawa J. miR 124 and miR 203 are epigenetically silenced tumor suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 2010 May;31(5):766–76.
  122. Tian Z, Li Z, Zhu Y, Meng L, Liu F, Sang M, Wang G. Hypermethylation mediated inactivation of miR 124 predicts poor prognosis and promotes tumor growth at least partially through targeting EZH2/H3K27me3 in ESCC. *Clin Exp Metastasis.* 2019 Aug;36(4):381–391.
  123. Zhang H, Liu A, Feng X, Tian L, Bo W, Wang H, Hu Y. MiR 132 promotes the proliferation, invasion and migration of human pancreatic carcinoma by inhibition of the tumor suppressor gene PTEN. *Prog Biophys Mol Biol.* 2019 Nov;148:65–72.
  124. Guo H, Zhang X, Chen Q, Bao Y, Dong C, Wang X. miR 132 suppresses the migration and invasion of lung cancer cells by blocking USP9X induced epithelial mesenchymal transition. *Am J Transl Res.* 2018 Jan 15;10(1):224–234.
  125. Liu Y, Zhang M. miR 132 Regulates Adriamycin Resistance in Colorectal Cancer Cells Through Targeting Extracellular Signal Regulated Kinase 1. *Cancer Biother Radiopharm.* 2019 Aug;34(6):398–404.
  126. Qin Q, Wei F, Zhang J, Wang X, Li B. miR 134 inhibits non small cell lung cancer growth by targeting the epidermal growth factor receptor. *J Cell Mol Med.* 2016 Oct;20(10):1974–83.
  127. Zha R, Guo W, Zhang Z, Qiu Z, Wang Q, Ding J, Huang S, Chen T, Gu J, Yao M, He X. Genome wide screening identified that miR 134 acts as a metastasis suppressor by targeting integrin  $\beta$ 1 in hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2014 Feb 3;9(2):e87665.
  128. Eissa MG, Artlett CM. The MicroRNA miR 155 Is Essential in Fibrosis. *Noncoding RNA.* 2019 Mar 12;5(1):23.
  129. Park S, Eom K, Kim J, Bang H, Wang HY, Ahn S, Kim G, Jang H, Kim S, Lee D, Park KH, Lee H. MiR 9, miR 21, and miR 155 as potential biomarkers for HPV positive and negative cervical cancer. *BMC Cancer.* 2017 Sep 21;17(1):658.
  130. Wang J, Guo J, Fan H. MiR 155 regulates the proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells through targeting SOCS3. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 Jun;23(12):5168–5175.

131. Zhou Y, Ji Z, Yan W, Zhou Z, Li H. The biological functions and mechanism of miR 212 in prostate cancer proliferation, migration and invasion via targeting Engrailed 2. *Oncol Rep.* 2017 Sep;38(3):1411–1419.
132. Chen W, Song J, Bian H, Yang X, Xie X, Zhu Q, Qin C, Qi J. The functions and targets of miR 212 as a potential biomarker of cancer diagnosis and therapy. *J Cell Mol Med.* 2020 Feb;24(4):2392–2401.
133. Hanieh H, Ahmed EA, Vishnubalaji R, Alajez NM. SOX4: Epigenetic regulation and role in tumorigenesis. *Semin Cancer Biol.* 2020 Dec;67(Pt 1):91–104.
134. Xie M, Fu Z, Cao J, Liu Y, Wu J, Li Q, Chen Y. MicroRNA 132 and microRNA 212 mediate doxorubicin resistance by down regulating the PTEN AKT/NF  $\kappa$ B signaling pathway in breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jun;102:286–294.
135. Shirjang S, Mansoori B, Mohammadi A, Shajari N, H G Duijf P, Najafi S, Abedi Gaballu F, Nofouzi K, Baradaran B. miR 330 regulates colorectal cancer oncogenesis by targeting BACH1. *Adv Pharm Bull.* 2020 Jul;10(3):444–451.
136. Guan A, Wang H, Li X, Xie H, Wang R, Zhu Y, Li R. MiR 330 3p inhibits gastric cancer progression through targeting MSI1. *Am J Transl Res.* 2016 Nov 15;8(11):4802–4811.
137. Glazer RI, Vo DT, Penalva LO. Musashi1: an RBP with versatile functions in normal and cancer stem cells. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012 Jan 1;17:54–64.
138. Ma B, Ma J, Yang Y, He X, Pan X, Wang Z, Qian Y. Effects of miR 330 3p on Invasion, Migration and EMT of Gastric Cancer Cells by Targeting PRRX1 Mediated Wnt/ $\beta$  Catenin Signaling Pathway. *Onco Targets Ther.* 2020 Apr 22;13:3411–3423.
139. Shor B, Cavender D, Harris C. A kinase dead knock in mutation in mTOR leads to early embryonic lethality and is dispensable for the immune system in heterozygous mice. *BMC Immunol.* 2009 May 20;10:28.
140. Uchida S, Hara K, Kobayashi A, Funato H, Hobara T, Otsuki K, Yamagata H, McEwen BS, Watanabe Y. Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4 mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J Neurosci.* 2010 Nov 10;30(45):15007–18.
141. Grabiner BC, Nardi V, Birsoy K, Possemato R, Shen K, Sinha S, Jordan A, Beck AH, Sabatini DM. A diverse array of cancer associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity. *Cancer Discov.* 2014 May;4(5):554–63.
142. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012 Apr 13;149(2):274–93.
143. Ruggeri BA, Klurfeld DM, Kritchevsky D, Frick KK. Steady state mRNA expression for growth factors in DMBA induced rat mammary tumors. *Cancer Lett.* 1990 Dec 3;55(2):89–93.
144. Wang C, Lv X, Jiang C, Cordes CM, Fu L, Lele SM, Davis JS. Transforming growth factor alpha (TGF $\alpha$ ) regulates granulosa cell tumor (GCT) cell proliferation and



- migration through activation of multiple pathways. *PLoS One*. 2012;7(11):e48299.
145. Dai N, Rapley J, Angel M, Yanik MF, Blower MD, Avruch J. mTOR phosphorylates IMP2 to promote IGF2 mRNA translation by internal ribosomal entry. *Genes Dev*. 2011 Jun 1;25(11):1159-72.
  146. Dai N, Christiansen J, Nielsen FC, Avruch J. mTOR complex 2 phosphorylates IMP1 cotranslationally to promote IGF2 production and the proliferation of mouse embryonic fibroblasts. *Genes Dev*. 2013 Feb 1;27(3):301-12.
  147. Ma J, Fan Y, Zhang J, Feng S, Hu Z, Qiu W, Long K, Jin L, Tang Q, Wang X, Zhou Q, Gu Y, Xiao W, Liu L, Li X, Li M. Testosterone Dependent miR 26a 5p and let 7g 5p Act as Signaling Mediators to Regulate Sperm Apoptosis via Targeting PTEN and PMAIP1. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 18;19(4):1233.
  148. Huang J, Lu D, Xiang T, Wu X, Ge S, Wang Y, Wang J, Cheng N. MicroRNA 132 3p regulates cell proliferation, apoptosis, migration and invasion of liver cancer by targeting Sox4. *Oncol Lett*. 2020 Apr;19(4):3173–3180.
  149. Foronda M, Martínez P, Schoeftner S, Gómez López G, Schneider R, Flores JM, Pisano DG, Blasco MA. Sox4 links tumor suppression to accelerated aging in mice by modulating stem cell activation. *Cell Rep*. 2014 Jul 24;8(2):487–500.
  150. Liu K, Li X, Cao Y, Ge Y, Wang J, Shi B. MiR 132 inhibits cell proliferation, invasion and migration of hepatocellular carcinoma by targeting PIK3R3. *Int J Oncol*. 2015 Oct;47(4):1585–93.
  151. Kong YH, Xu SP. Salidroside prevents skin carcinogenesis induced by DMBA/TPA in a mouse model through suppression of inflammation and promotion of apoptosis. *Oncol Rep*. 2018 Jun;39(6):2513–2526.
  152. Wang Y, Han B, Wang Y, Wang C, Zhang H, Xue J, Wang X, Niu T, Niu Z, Chen Y. Mesenchymal stem cell secreted extracellular vesicles carrying TGF  $\beta$ 1 up regulate miR 132 and promote mouse M2 macrophage polarization. *J Cell Mol Med*. 2020 Nov;24(21):12750–12764.
  153. Chen L, Zhu Q, Lu L, Liu Y. MiR 132 inhibits migration and invasion and increases chemosensitivity of cisplatin resistant oral squamous cell carcinoma cells via targeting TGF  $\beta$ 1. *Bioengineered*. 2020 Dec;11(1):91–102.
  154. Sobinoff AP, Mahony M, Nixon B, Roman SD, McLaughlin EA. Understanding the Villain: DMBA induced preantral ovotoxicity involves selective follicular destruction and primordial follicle activation through PI3K/Akt and mTOR signaling. *Toxicol Sci*. 2011 Oct;123(2):563–75.
  155. Wada R, Akiyama Y, Hashimoto Y, Fukamachi H, Yuasa Y. miR 212 is downregulated and suppresses methyl CpG binding protein MeCP2 in human gastric cancer. *Int J Cancer*. 2010 Sep 1;127(5):1106–14.
  156. Chen T, Lu M, Zhou X, Pan X, Han Y, Zhang Y, Ye B, Dong J, Li P. miR-132 and miR-212 cluster function as a tumor suppressor in thyroid cancer cells by CSDE1

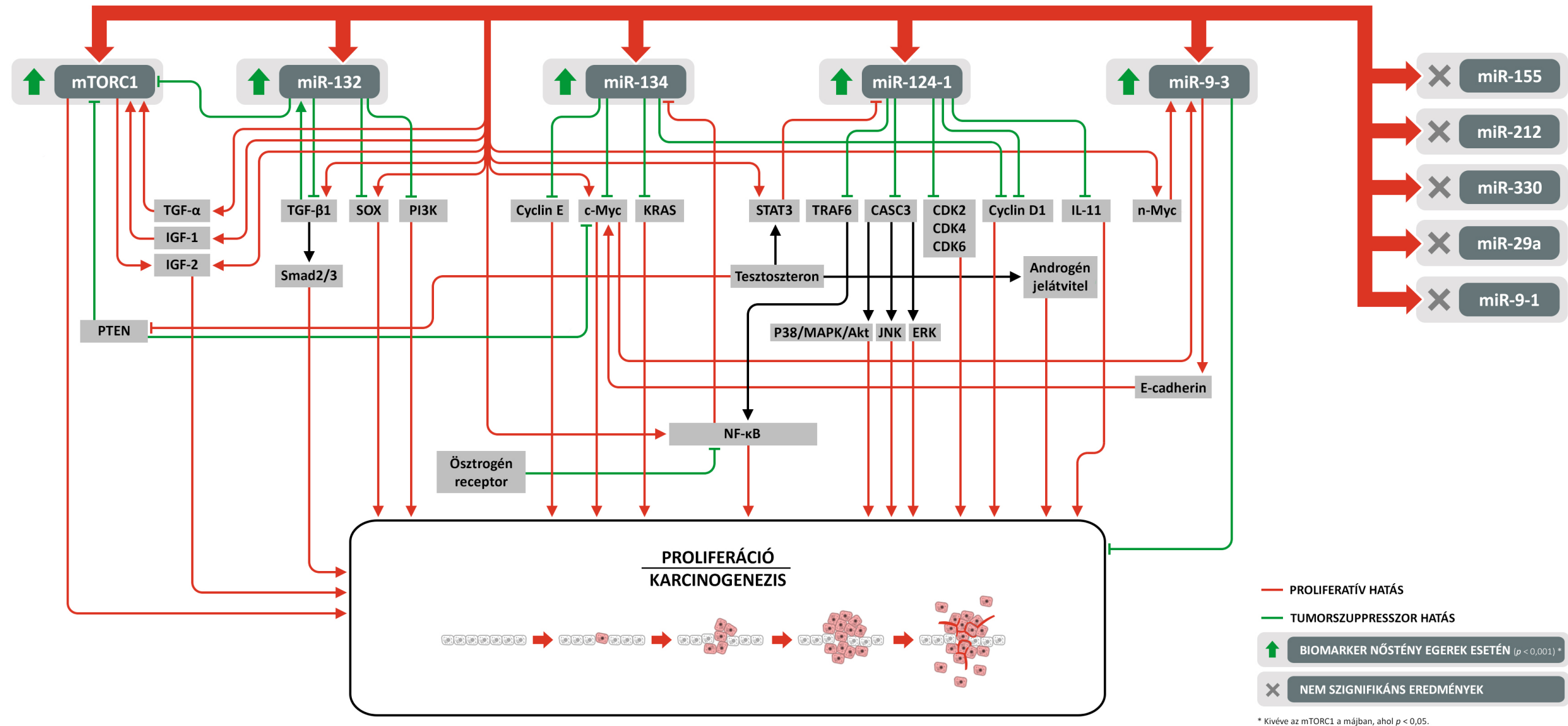
- mediated post-transcriptional program. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018 Feb 1;11(2):963-971.
157. Jiang X, Chen X, Chen L, Ma Y, Zhou L, Qi Q, Liu Y, Zhang S, Luo J, Zhou X. Upregulation of the miR 212/132 cluster suppresses proliferation of human lung cancer cells. *Oncol Rep*. 2015 Feb;33(2):705–12.
  158. Sha M, Wang B, Xiao L, Ye J, Wang J, Luan ZY. [Expression of miR 212 and miR 132 in serum of patients with primary liver cancer and their targeted regulation of GP73]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. 2017 Dec 20;25(12):920-926. Chinese.
  159. Deng JH, Zheng GY, Li HZ, Ji ZG. MiR 212 5p inhibits the malignant behavior of clear cell renal cell carcinoma cells by targeting TBX15. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019 Dec;23(24):10699–10707.
  160. Gu C, Wang Z, Jin Z, Li G, Kou Y, Jia Z, Yang J, Tian F. MicroRNA 212 inhibits the proliferation, migration and invasion of renal cell carcinoma by targeting X linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP). *Oncotarget*. 2017 Sep 8;8(54):92119–92133.
  161. Dou C, Wang Y, Li C, Liu Z, Jia Y, Li Q, Yang W, Yao Y, Liu Q, Tu K. MicroRNA 212 suppresses tumor growth of human hepatocellular carcinoma by targeting FOXA1. *Oncotarget*. 2015 May 30;6(15):13216–28.
  162. Zhao Y, Li Z. Interplay of estrogen receptors and FOXA factors in the liver cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Dec 15;418 Pt 3(0 3):334–9.
  163. Li Z, Tuteja G, Schug J, Kaestner KH. Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1 2):72–83.
  164. Wanet A, Tacheny A, Arnould T, Renard P. miR 212/132 expression and functions: within and beyond the neuronal compartment. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jun;40(11):4742–53.
  165. Hatakeyama H, Cheng H, Wirth P, Counsell A, Marcrom SR, Wood CB, Pohlmann PR, Gilbert J, Murphy B, Yarbrough WG, Wheeler DL, Harari PM, Guo Y, Shyr Y, Slebos RJ, Chung CH. Regulation of heparin binding EGF like growth factor by miR 212 and acquired cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2010 Sep 13;5(9):e12702.
  166. Molnár V, Érsek B, Wiener Z, Tömböl Z, Szabó PM, Igaz P, Falus A. MicroRNA 132 targets HB EGF upon IgE mediated activation in murine and human mast cells. *Cell Mol Life Sci*. 2012 Mar;69(5):793–808.
  167. Park JK, Henry JC, Jiang J, Esau C, Gusev Y, Lerner MR, Postier RG, Brackett DJ, Schmittgen TD. miR 132 and miR 212 are increased in pancreatic cancer and target the retinoblastoma tumor suppressor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011 Mar 25;406(4):518–23.
  168. Xu L, Dai W, Li J, He L, Wang F, Xia Y, Chen K, Li S, Liu T, Lu J, Zhou Y, Wang Y, Guo C. Methylation regulated miR 124 1 suppresses tumorigenesis in hepatocellular carcinoma by targeting CASC3. *Oncotarget*. 2016 May 3;7(18):26027–41.

169. Xu DH, Zhu Z, Wakefield MR, Xiao H, Bai Q, Fang Y. The role of IL 11 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* 2016 Apr 10;373(2):156–63.
170. Yu L, Wang S, Lin X, Lu Y, Gu P. MicroRNA 124a inhibits cell proliferation and migration in liver cancer by regulating interleukin 11. *Mol Med Rep.* 2018 Mar;17(3):3972–3978.
171. Liu X, Kang J, Sun S, Luo Y, Ji X, Zeng X, Zhao S. iASPP, a microRNA 124 target, is aberrantly expressed in astrocytoma and regulates malignant glioma cell migration and viability. *Mol Med Rep.* 2018 Jan;17(1):1970–1978.
172. Kawano S, Nakamachi Y. miR 124a as a key regulator of proliferation and MCP 1 secretion in synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2011 Mar;70 Suppl 1:i88–91.
173. Xie C, Zhang LZ, Chen ZL, Zhong WJ, Fang JH, Zhu Y, Xiao MH, Guo ZW, Zhao N, He X, Zhuang SM. A hMTR4 PDIA3P1 miR 125/124 TRAF6 Regulatory Axis and Its Function in NF kappa B Signaling and Chemoresistance. *Hepatology.* 2020 May;71(5):1660–1677.
174. Kwon YJ, Ye DJ, Baek HS, Chun YJ. 7,12 Dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene increases cell proliferation and invasion through induction of Wnt/ $\beta$  catenin signaling and EMT process. *Environ Toxicol.* 2018 Jul;33(7):729–742.
175. Pang Y, Wu J, Li X, Wang C, Wang M, Liu J, Yang G. NEAT1/miR 124/STAT3 feedback loop promotes breast cancer progression. *Int J Oncol.* 2019 Sep;55(3):745–754.
176. Ho CH, Lu YC, Fan CK, Yu HJ, Liu HT, Wu CC, Chen KC, Liu SP, Cheng PC. Testosterone regulates the intracellular bacterial community formation of uropathogenic *Escherichia coli* in prostate cells via STAT3. *Int J Med Microbiol.* 2020 Oct;310(7):151450.
177. Granberg AL, Brunström B, Brandt I. Cytochrome P450 dependent binding of 7,12 dimethylbenz[ $a$ ]anthracene (DMBA) and benzo[ $a$ ]pyrene (B[ $a$ ]P) in murine heart, lung, and liver endothelial cells. *Arch Toxicol.* 2000 Dec;74(10):593–601.
178. Yuan K, Zhang X, Lv L, Zhang J, Liang W, Wang P. Fine tuning the expression of microRNA 155 controls acetaminophen induced liver inflammation. *Int Immunopharmacol.* 2016 Nov;40:339–346.
179. Li X, Kong D, Chen H, Liu S, Hu H, Wu T, Wang J, Chen W, Ning Y, Li Y, Lu Z. miR 155 acts as an anti inflammatory factor in atherosclerosis associated foam cell formation by repressing calcium regulated heat stable protein 1. *Sci Rep.* 2016 Feb 22;6:21789.
180. Zanesi N, Pekarsky Y, Trapasso F, Calin G, Croce CM. MicroRNAs in mouse models of lymphoid malignancies. *J Nucleic Acids Investig.* 2010;1(1):36–40.
181. Kong W, He L, Richards EJ, Challa S, Xu CX, Permeth Wey J, Lancaster JM, Coppola D, Sellers TA, Djeu JY, Cheng JQ. Upregulation of miRNA 155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with poor prognosis and triple negative breast cancer. *Oncogene.* 2014 Feb 6;33(6):679–89.

182. Gironella M, Seux M, Xie MJ, Cano C, Tomasini R, Gommeaux J, Garcia S, Nowak J, Yeung ML, Jeang KT, Chaix A, Fazli L, Motoo Y, Wang Q, Rocchi P, Russo A, Gleave M, Dagorn JC, Iovanna JL, Carrier A, Pébusque MJ, Dusetti NJ. Tumor protein 53 induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR 155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Oct 9;104(41):16170–5.
183. Berger PL, Frank SB, Schulz VV, Nollet EA, Edick MJ, Holly B, Chang TT, Hostetter G, Kim S, Miranti CK. Transient induction of ING4 by Myc drives prostate epithelial cell differentiation and its disruption drives prostate tumorigenesis. *Cancer Res*. 2014 Jun 15;74(12):3357–68.
184. Hu X, Feng Y, Sun L, Qu L, Sun C. Roles of microRNA 330 and Its Target Gene ING4 in the Development of Aggressive Phenotype in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Dig Dis Sci*. 2017 Mar;62(3):715–722.
185. Moyad MA. Obesity, interrelated mechanisms, and exposures and kidney cancer. *Semin Urol Oncol*. 2001 Nov;19(4):270–9.
186. Iqbal J, Minhajuddin M, Beg ZH. Suppression of 7,12 dimethylbenz[alpha]anthracene induced carcinogenesis and hypercholesterolaemia in rats by tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil. *Eur J Cancer Prev*. 2003 Dec;12(6):447–53.
187. Zhang GM, Wang MY, Liu YN, Zhu Y, Wan FN, Wei QY, Ye DW. Functional variants in the low density lipoprotein receptor gene are associated with clear cell renal cell carcinoma susceptibility. *Carcinogenesis*. 2017 Dec 7;38(12):1241–1248.
188. Orosz E, Kiss I, Gyöngyi Z, Varjas T. Expression of Circulating miR 155, miR 21, miR 221, miR 30a, miR 34a and miR 29a: Comparison of Colonic and Rectal Cancer. *In Vivo*. 2018 Nov Dec;32(6):1333–1337.
189. Dey S, Kwon JJ, Liu S, Hodge GA, Taleb S, Zimmers TA, Wan J, Kota J. miR 29a Is Repressed by MYC in Pancreatic Cancer and Its Restoration Drives Tumor Suppressive Effects via Downregulation of LOXL2. *Mol Cancer Res*. 2020 Feb;18(2):311–323.
190. Wu L, Zhu Y. The function and mechanisms of action of LOXL2 in cancer (Review). *Int J Mol Med*. 2015 Nov;36(5):1200–4.
191. Johnson AT, Kaufmann YC, Luo S, Todorova V, Klimberg VS. Effect of glutamine on glutathione, IGF I, and TGF beta 1. *J Surg Res*. 2003 May 15;111(2):222–8.
192. Kriegel AJ, Liu Y, Fang Y, Ding X, Liang M. The miR 29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. *Physiol Genomics*. 2012 Feb 27;44(4):237–44.
193. Akhurst RJ. TGF beta antagonists: why suppress a tumor suppressor? *J Clin Invest*. 2002 Jun;109(12):1533–6.
194. Carr BI, Hayashi I, Branum EL, Moses HL. Inhibition of DNA synthesis in rat hepatocytes by platelet derived type beta transforming growth factor. *Cancer Res*. 1986 May;46(5):2330–4.

195. Zhang Y, Wen G, Shao G, Wang C, Lin C, Fang H, Balajee AS, Bhagat G, Hei TK, Zhao Y. TGFBI deficiency predisposes mice to spontaneous tumor development. *Cancer Res.* 2009 Jan 1;69(1):37–44.
196. Suzuki HI. MicroRNA Control of TGF  $\beta$  Signaling. *Int J Mol Sci.* 2018 Jun 28;19(7):1901.
197. Zhang J, Cheng J, Zeng Z, Wang Y, Li X, Xie Q, Jia J, Yan Y, Guo Z, Gao J, Yao M, Chen X, Lu F. Comprehensive profiling of novel microRNA 9 targets and a tumor suppressor role of microRNA 9 via targeting IGF2BP1 in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2015 Dec 8;6(39):42040–52.
198. Zhang J, Chong CC, Chen GG, Lai PB. A Seven microRNA Expression Signature Predicts Survival in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One.* 2015 Jun 5;10(6):e0128628.
199. Fu L, Shi J, Liu A, Zhou L, Jiang M, Fu H, Xu K, Li D, Deng A, Zhang Q, Pang Y, Guo Y, Hu K, Zhou J, Wang Y, Huang W, Jing Y, Dou L, Wang L, Xu K, Ke X, Nervi C, Li Y, Yu L. A minicircuitry of microRNA 9 1 and RUNX1 RUNX1T1 contributes to leukemogenesis in t(8;21) acute myeloid leukemia. *Int J Cancer.* 2017 Feb 1;140(3):653–661.
200. Morin PJ. beta catenin signaling and cancer. *Bioessays.* 1999 Dec;21(12):1021–30.
201. Razavipour SF, Harikumar KB, Slingerland JM. p27 as a Transcriptional Regulator: New Roles in Development and Cancer. *Cancer Res.* 2020 Sep 1;80(17):3451–3458.
202. Ahn H, Im E, Lee DY, Lee HJ, Jung JH, Kim SH. Antitumor Effect of Pyrogallol via miR 134 Mediated S Phase Arrest and Inhibition of PI3K/AKT/Skp2/cMyc Signaling in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 2019 Aug 16;20(16):3985.
203. Liu Y, Zhang M, Qian J, Bao M, Meng X, Zhang S, Zhang L, Zhao R, Li S, Cao Q, Li P, Ju X, Lu Q, Li J, Shao P, Qin C, Yin C. miR 134 functions as a tumor suppressor in cell proliferation and epithelial to mesenchymal Transition by targeting KRAS in renal cell carcinoma cells. *DNA Cell Biol.* 2015 Jun;34(6):429–36.
204. Vitiello PP, Cardone C, Martini G, Ciardiello D, Belli V, Matrone N, Barra G, Napolitano S, Della Corte C, Turano M, Furia M, Troiani T, Morgillo F, De Vita F, Ciardiello F, Martinelli E. Receptor tyrosine kinase dependent PI3K activation is an escape mechanism to vertical suppression of the EGFR/RAS/MAPK pathway in KRAS mutated human colorectal cancer cell lines. *J Exp Clin Cancer Res.* 2019 Jan 28;38(1):41.
205. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Matias Guiu X. NF  $\kappa$ B in development and progression of human cancer. *Virchows Arch.* 2005 May;446(5):475–82.
206. Karnam KC, Ellutla M, Bodduluru LN, Kasala ER, Uppulapu SK, Kalyankumarraju M, Lahkar M. Preventive effect of berberine against DMBA induced breast cancer in female Sprague Dawley rats. *Biomed Pharmacother.* 2017 Aug;92:207–214.

207. Karin M. Nuclear factor kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):431–6.
208. Baud V, Karin M. Is NF kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Jan;8(1):33–40.
209. Shuang T, Wang M, Zhou Y, Shi C, Wang D. NF κB1, c Rel, and ELK1 inhibit miR 134 expression leading to TAB1 upregulation in paclitaxel resistant human ovarian cancer. *Oncotarget*. 2017 Apr 11;8(15):24853–24868.
210. Biswas DK, Singh S, Shi Q, Pardee AB, Iglehart JD. Crossroads of estrogen receptor and NF kappaB signaling. *Sci STKE*. 2005 Jun 14;2005(288):pe27.
211. 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.
212. 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.



12. Ábra: A vizgálat során alkalmas biomarkernek ítélt miR-9-3, miR-124-1, miR-132, miR-134 és mTORC1 expressziók változásai 24 órával a DMBA kezelést követően és a szakirodalmi adatok alapján érintett, a megbeszélésben kifejtett releváns jelátviteli útvonalak.

## KÖZLEMÉNYEK

### A disszertáció alapját képező 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

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

### További közlemények

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

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.



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.

### **Konferenciák**

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 I1-RTP DNS hipometiláló hatását. 51. MEMBRÁN TRANSZPORT KONFERENCIA POSZTER ABSZTRAKTOK. 2022.

## **KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Kiss Istvánnak a szüntelen biztatást, a szakmai iránymutatást, és a rengeteg konzultációt, valamint hálás vagyok doktorandusz társaimnak, Szabó Lászlónak és Molnár Richárdnak minden támogatásukért. Nélkülük ez az értekezés aligha készült volna el jelenlegi formájában és nekik köszönhetően – minden nehézség ellenére – az elmúlt évek munkája egy izgalmas kaland volt, melyre jó szívvel gondolok.

Emellett köszönöm a Pécsi Tudomány Egyetem Orvosi Népegészségtani Intézet dolgozóinak a kísérletek kivitelezésében nyújtott segítségüket.

Végül, de nem utolsó sorban hálával tartozom a családomnak, Melindának és Nimródnek. Mellettük minden akadály kisebbnek tűnt.

## Doktori értekezés benyújtása és nyilatkozat a dolgozat eredetiségéről

Alulírott

név: Tomesz András  
anyja neve: Veres Eszter  
születési hely, idő: Kazincbarcika, 1984.03.07.

„Karcinogén és kemopreventív hatású anyagok tanulmányozására alkalmas, génexpresszió és mikroRNS expresszió változásokon alapuló korai biomarker vizsgálati panel kidolgozása” című doktori értekezésemet a mai napon benyújtom a Pécsi Tudományegyetem, Egészségtudományi Kar, Egészségtudományi Doktori Iskola részére. Program száma: PR-6. Téma száma: O-22.

Témavezető neve: Prof. Dr. Kiss István

Egyúttal nyilatkozom, hogy jelen eljárás során benyújtott doktori értekezésemet

- korábban más doktori iskolába (sem hazai, sem külföldi egyetemen) nem nyújtottam be,
- fokozatszerzési eljárásra jelentkezésemet két éven belül nem utasították el,
- az elmúlt két esztendőben nem volt sikertelen doktori eljárásom,
- öt éven belül doktori fokozatom visszavonására nem került sor,
- értekezésem önálló munka, más szellemi alkotását sajátomként nem mutattam be, az irodalmi hivatkozások egyértelműek és teljeseek, az értekezés elkészítésénél hamis vagy hamisított adatokat nem használtam.

Dátum: 2022.08.08.

doktorjelölt aláírása

témavezető aláírás