

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

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Tomesz András



Doktori Iskolavezető: Prof. Dr. Bódis József

Programvezető: Prof. Dr. Kiss István

Témavezető: Prof. Dr. Kiss István

Pécsi Tudományegyetem Egészségtudományi Kar

Egészségtudományi Doktori Iskola

Pécs, 2022

1. BEVEZETÉS

A 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 jelenlegi adatok alapján a daganatok átlagos ötéves túlélése nem éri el az 50%-ot az alkalmazott terápiák 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, valamint a korai diagnózissal általában növelhető a sikeres kezelés esélye. Szükségszerű tehát daganatok kialakulásáért felelős hatások minél korábbi felismerése.

1.1. A daganatok kialakulását befolyásoló tényezők

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, melyek meghatározóak lehetnek a daganat fenotípusos megjelenésének gyorsaságára, a betegség patogenezisére és az esetleges gyógyulást követő későbbi biológiai eseményekre. A kulcsgének mutációjának felhalmozódásához azonban szükség van további molekuláris eseményekre, például a sejtproliferáció során kialakuló és maradandó spontán genetikai hibákra, vagy további külső környezeti expozíciók káros hatásaira.

1.1.2. A sejtciklus zavara

Bár a becslések szerint a DNS-replikáció hibaráta kevesebb, mint egy tévedés minden egymilliárd lemásolt bázisban, hibák mégis előfordulnak. 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.

1.1.3. Környezeti expozíciók

A mutációkat a legtöbb esetben (80-90%-ban) a külső környezeti tényezők káros hatásai okozzák, melyek általában DNS-károsodást váltanak ki, azaz mutagén, genotoxikus hatásúak. A környezetnek tehát óriási szerepe van a daganatok etiológiájában, legyen a környezeti expozíció kémiai, fizikai, vagy biológiai eredetű.

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. A karcinogének legnagyobb csoportját a kémiai karcinogének adják. Egyes kémiai rákkeltő anyagok a DNS-hez közvetlenül, változatlan formában kötődve idéznek elő mutációt, a legtöbb kémiai karcinogén anyag azonban indirekt karcinogén. Ilyenek például a szerves anyagok tökéletlen égésekor (pl. dohányfüst, kipufogógáz, faszénnel való grillezés stb.) keletkező policiklusos aromás szénhidrogének (PAH).

A vizsgálatunkban használt 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) a környezetünkben gyakran előforduló PAH. A cigarettafüst vagy az autók által kibocsátott kipufogógáz a DMBA-expozíció jellegzetes és jelentős forrásai. A DMBA prokarcinogén, melyet a CYP metabolizáló enzimek aktiválnak. 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. A DMBA sejtenyészetben és *in vivo* állatkísérletekben is gyakran használt genotoxikus karcinogén ágens, mivel a humán daganatokhoz szövettanilag hasonló tumorokat eredményez.

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.

1.2. Molekuláris biomarkerek szerepe a daganatok prevenciójában

Minden rosszindulatú daganat kialakulását megelőzik molekuláris biológiai jelenségek, például génexpressziós mintázatok átrendeződése.

1.2.1. Mutációk vizsgálata

A daganatképződés biomarkereivel kapcsolatos korai irodalmi adatokban, a potenciális karcinogének vizsgálata elsősorban azok karcinogén hatásaira összpontosul, a vizsgálatok genotoxicitáson alapulnak és kromoszóma- vagy génszintű mutagenitást jeleznek. 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 mutációk és kromoszómaaberrációk vizsgálatain túl, 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 génexpressziós változások számos kémiai, fizikai vagy biológiai karcinogén vegyület által okozott károsodást reprezentálhatnak mind sejtenyészetekben, mind *in vivo* állatkísérletes modellekben. A karcinogén anyagok emellett 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.

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.

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 translációját, ezen keresztül a fehérjekódoló gének expresszióját, a fehérjeszintézist.

1.2.3.2. A miRNS-ek szerepe a génszabályozásban

A miRNS-ek a humán génkifejeződés megközelítőleg 30%-50%-át szabályozzák, ezáltal olyan, a daganatképződéssel kapcsolatosan fontos sejtbiológiai folyamatokat befolyásolnak, mint a sejtciklus, a sejt differenciálódás vagy az apoptózis. A szabályozó hatások rendkívül változatosak lehetnek, ugyanis egy miRNS több target génre lehet hatással és emellett a miRNS-ek biogenezisét is befolyásolják más tényezők. A miRNS-ek onko vagy tumorszuppresszor hatást is kifejthetnek az általuk szabályozott gének természetétől függően. 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. Az ellenkező hatások lehetnek tumorspecifikusak, de lehetségesek dóziszfüggő eltérések is.

1.2.3.3. A miRNS-ek mint biomarkerek

A miRNS-ek közül sokról elmondható, hogy törékeny genomi régiókban vannak jelen és a malignusan transzformált mintákban többnyire megváltozott expressziós mintázatot mutatnak. Mindemellett kísérletes vizsgálatokon és klinikai szövettani minták elemzésén alapuló bizonyítékok arra utalnak, hogy minden karcinogén hatás esetében megfigyelhetők specifikusan expresszált miRNS-ek és mivel a miRNS-ek a szérumban stabilak, így potenciálisan korai epigenetikai biomarkerekként szolgálhatnak különböző daganatok és egyéb betegségek kimutatására.

1.2.4. A vizsgálatban szereplő miRNS-ek és gének

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. 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.

1.3. Célkitűzés

A daganatos betegségek természetéből adódóan a betegség kialakulása elleni küzdelemben egyre nagyobb jelentőséggel bír a prevenció, mely területen szükséges 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. 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 Integrated DNA Technologies (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, Iowa, USA) szintetizálta, a szekvenciák korábbi publikációkból származnak.

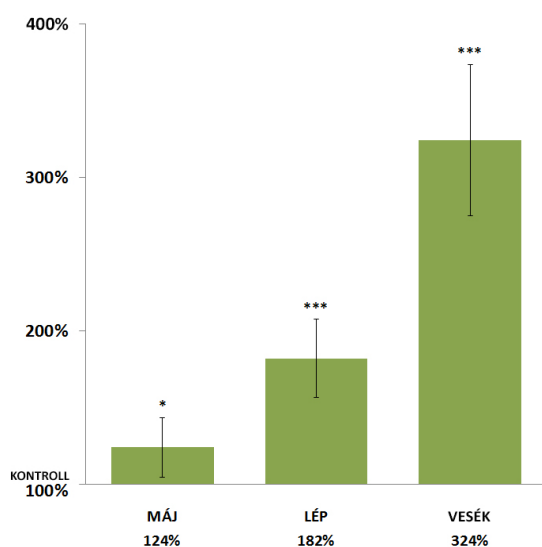
2.3. Számítás és statisztikai elemzés

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

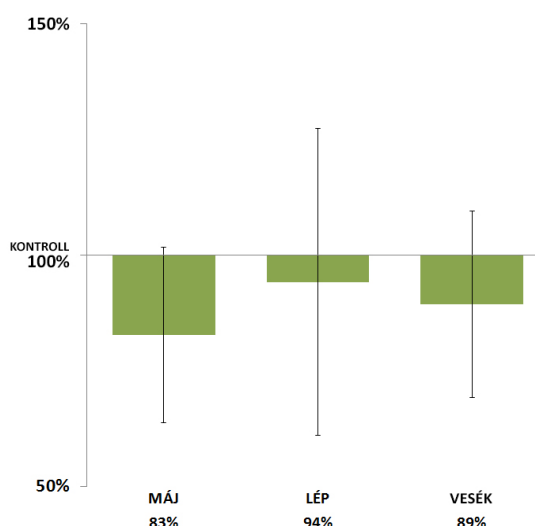
21 (International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA) statisztikai szoftvert használtuk. Statisztikailag szignifikáns szintnek a $p < 0,05$ értéket tekintettük.

3. EREDMÉNYEK

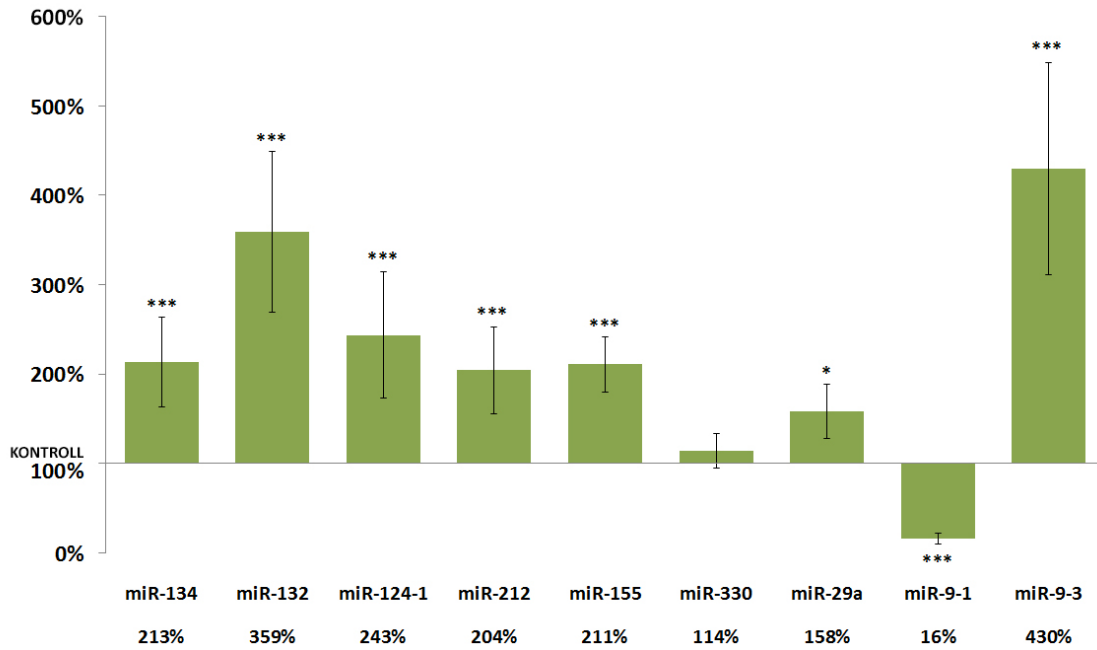
Mind a negatív kontroll, mind a kezelt csoport esetén meghatároztuk a vizsgált miRNS-ek és az mTORC1 gén expresszióit 24 órával a DMBA kezelést követően. Az eredmények feldolgozása nem csupán a kezelt és kontrollcsoport átlagos eredményeit összegzi, hanem a nemek szerinti és szervek szerinti elváltozásokat 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 (1-8. ábra). 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.



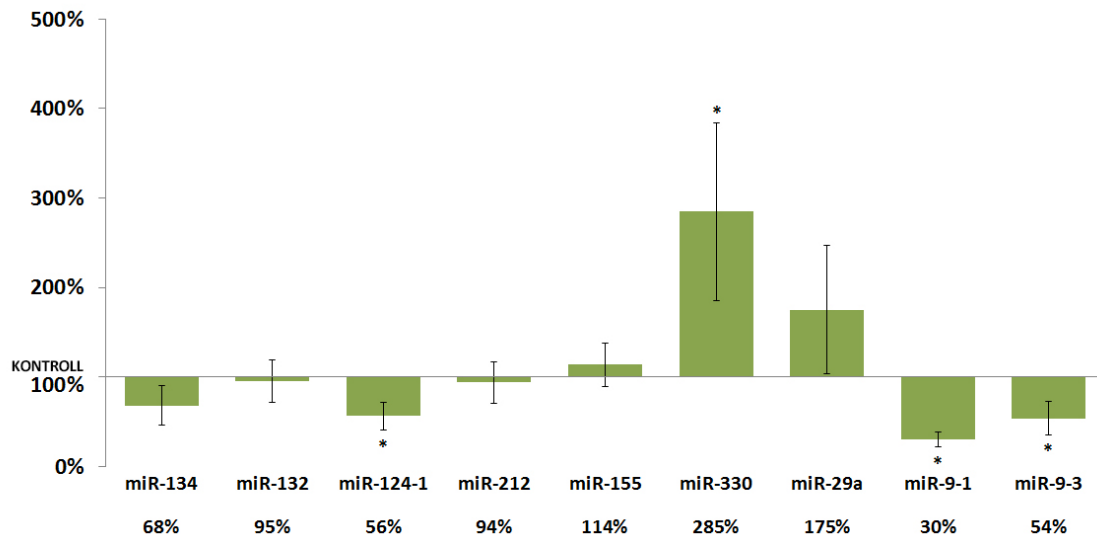
1. Ábra: Az mTORC1 gén expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően nőstény CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben (* $p < 0,05$; * $p < 0,001$).**



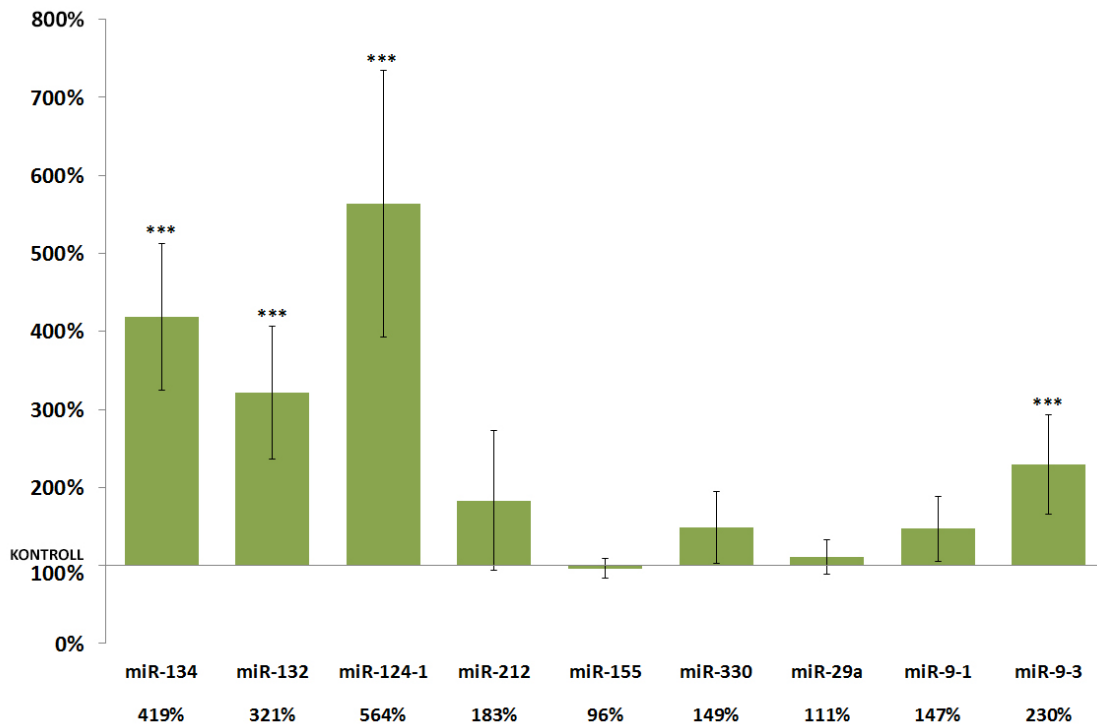
2. Ábra: Az mTORC1 gén expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően hím CBA/Ca egerek májában, lépében és veséiben.



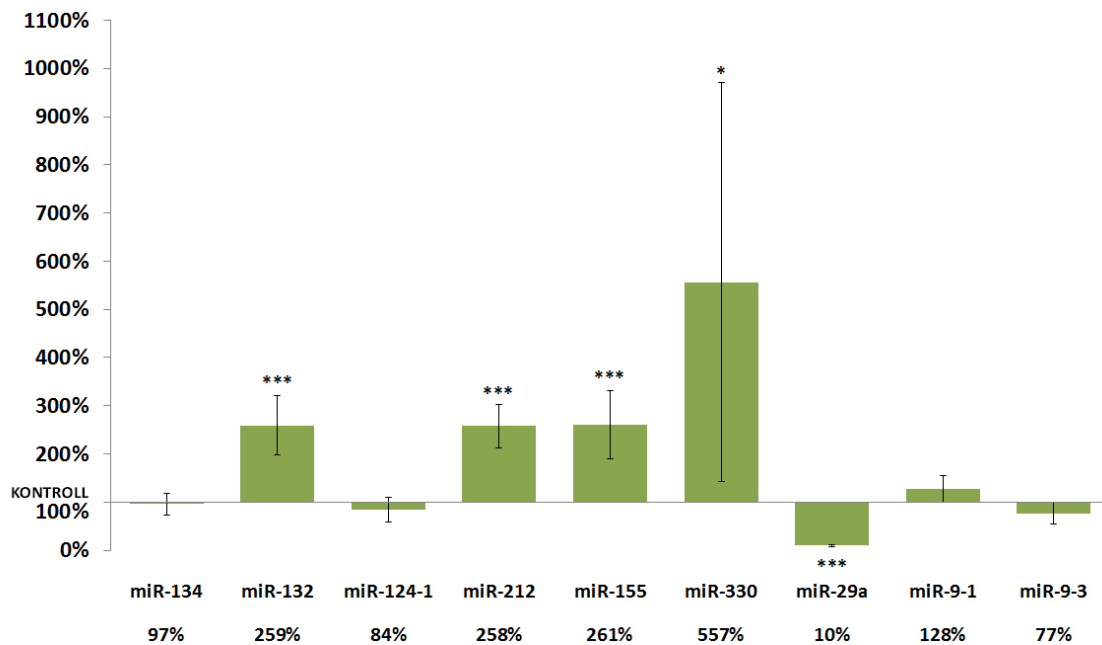
3. Ábra: A vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, a miR-9-3, a miR-29a, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134, a miR-155, a miR-212 és a miR-330) expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően nőstény CBA/Ca egerek májában (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).



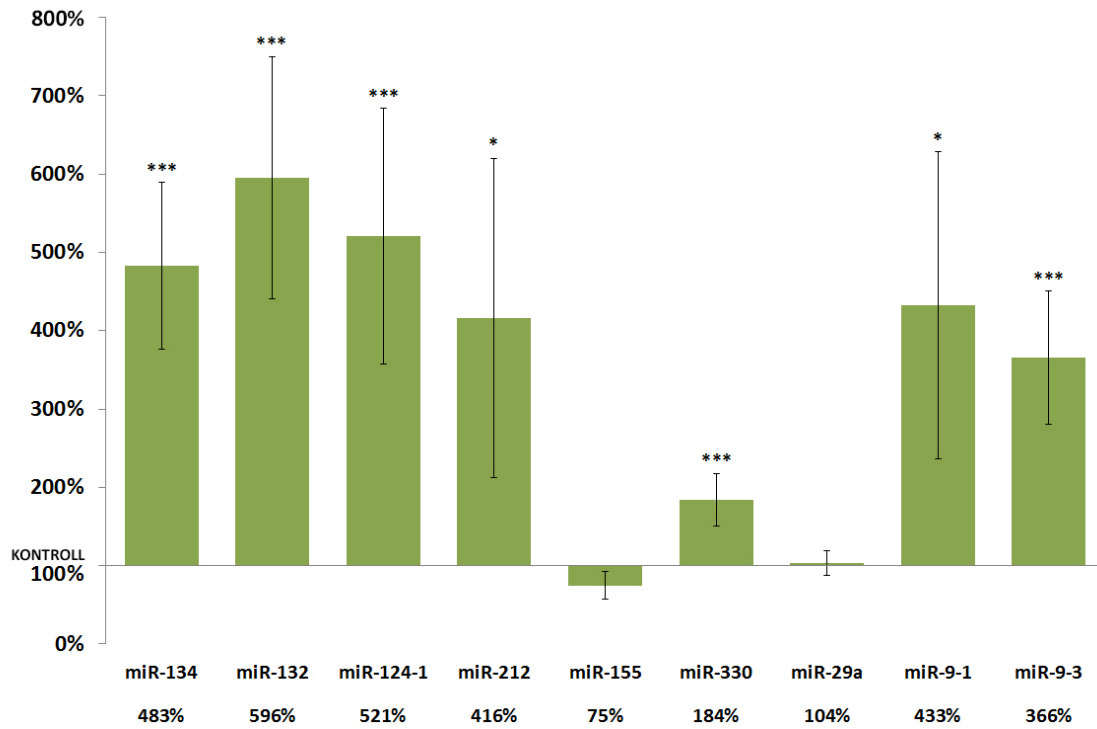
4. Ábra: A vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, a miR-9-3, a miR-29a, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134, a miR-155, a miR-212 és a miR-330) expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően hím CBA/Ca egerek májában (* $p < 0,05$).



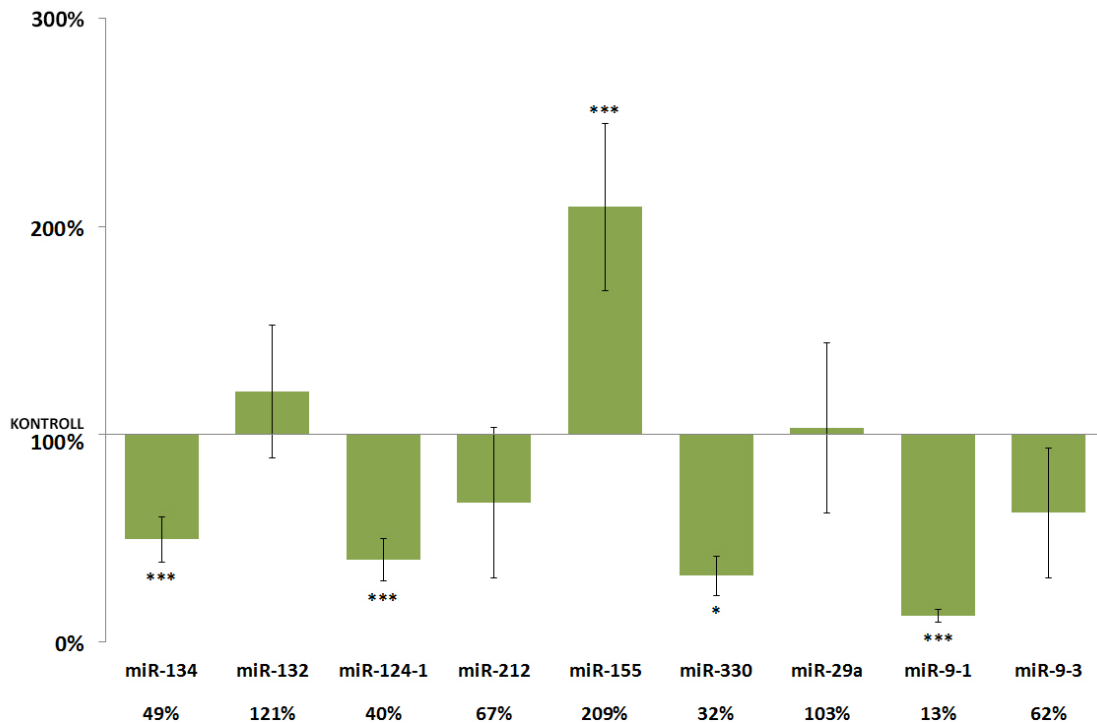
5. Ábra: A vizsgált miRNS-ek (miR-9-1, a miR-9-3, a miR-29a, a miR-124-1, a miR-132, a miR-134, a miR-155, a miR-212 és a miR-330) expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően nőstény CBA/Ca egerek lépében (** $p < 0,001$).



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) expresszójának változása 24 órával a DMBA kezelést követően hím CBA/Ca egerek lépében (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$).



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 (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).



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 (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

4. MEGBESZÉLÉS

4.1. mTORC1

Az mTOR-jelátvitel aktiválása számos onkogén folyamatot indukál, beleértve a daganatsejtek növekedésének, túlélésének és proliferációjának elősegítését. Az mTORC1 közvetítő szerepet játszik a DMBA hatására indukálódó TGF- α (Transforming growth factor alpha) és IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) onkogén hatásában. Emellett a DMBA-val együtt erősíti az IGF-2 (Insulin-like growth factor 2) proliferációt elősegítő hatását. 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 tapasztaltuk minden vizsgált szervben. A hím egerek esetén azonban ezek ellenére is csökkenő eredményeket tapasztaltunk, melyek emellett nem szignifikánsak. Ennek oka lehet, hogy a tesztoszteron hiányában magas expressziót mutató PTEN (Phosphatase and tensin homolog) tumorszuppresszor gén az mTORC1 inhibitora. Az mTORC1-et tehát a nőstény állatok esetén a jelen vizsgálatunkban alkalmazott modellben a karcinogének vizsgálatára alkalmasnak ítéltük.

4.2. miR-132

Ismeretes, hogy a miR-132 a DMBA hatására indukálódó SOX (SRY-related HMG-boksz 4) transzkripció faktor elnyomásával szabályozza májdaganatsejtek szaporodását, apoptózisát, migrációját és invázióját. Ismert továbbá, hogy a DMBA hatására dóziszfüggő módon növekszik a TGF- β 1 szintje, a TGF- β 1 fokozott kifejeződése pedig növeli a miR-132 expressziót. A miR-132 azonban blokkolja a DMBA által aktivált TGF- β 1/Smad2/3 jelátvitelt. Ez alapján tehát a TGF- β 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, mely kölcsönhatás eredményeinkben is tükröződött. A miR-132 és az mTORC1 hasonló expressziós mintázatát kaptuk, így az mTORC1 expressziós növekedésére válaszként emelkedhetett a miR-132 kifejeződése. A hímek esetén csak a lépben volt szignifikáns a változás, míg a nőstényeknél jelentős és statisztikailag

erősen szignifikáns növekedéseket tapasztaltunk minden vizsgált szervben, korrelálva az irodalmi adatokkal, tehát a miR-132 biomarkerként nemi specifitással, a nőstény egerek esetén használható.

4.3. miR-212

A miR-212 esetén tapasztalt változatos eredmények háttérében az állhat, hogy tumorszuppresszor és onkogén hatást is kifejthet például a FOXA1 (Forkhead Box A1) gén szabályozásával, mely hatás nonspecifikus, ugyanis a FOXA1 elengedhetetlen mind az ösztrogén, mind az androgén jelátviteli folyamatokhoz. 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 esetén megfigyelt onkogén hatást. 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.

4.4. miR-124-1

A miR-124-1 tumorszuppresszor 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. Emellett a DNS károsodás által kiváltott nukleáris faktor-kappa B (NF- κ 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- κ B jelátviteli utat. 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) transzkripció faktort, melynek a miR-124-el szemben elnyomó hatása van, emellett STAT3 indukáló hatást a tesztoszteron esetén is

megfigyeltek, mely a DMBA-val koherensen megmagyarázhatja a hím csoport esetén tapasztalt miR-124-1 downregulációt.

4.5. miR-155

A miR-155 esetében egyirányú, pozitív változást az összes vizsgált szerv közül 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. Megfigyelt továbbá, hogy a miR-155 expresszió májkárosodás esetén megemelkedik és védő hatást fejt ki az NF- κ B jelátvitel elnyomásával, valamint olyan gyulladásos mediátorok csökkentésével, mint a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- α) vagy az Interleukin 6 (IL-6). 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. Az irodalomban és a vizsgálatunk során tapasztalt változatos adatok 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, aminek a génterméke csökkenti a DMBA hatására fokozottan expresszálódó c-Myc fehérjék által kifejtett onkogén hatást. A nőstény egerek veséjében mért miR-330 tumorszuppresszor expressziójának emelkedése összhangban van azzal a megfigyeléssel, hogy az ösztrogén hatására megnövekedett RCC rizikóját csökkenti. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a miR-330

expressziós szintje biomarkerként főként a hím állatok esetén lehetne alkalmazható, az eredmények azonban nem voltak azonos irányúak minden vizsgált szervben (mely lényeges szempont a kiválasztásban), így a biomarkerként történő használatát elvetettük.

4.7. miR-29a

A DMBA expozíciót követően 12 órával megfigyelték a c-Myc génexpresszió fokozódását. 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. A LOXL2 ugyanis szerepet játszik a daganatsejtek inváziójában, a metasztázisképzésben, az angiogenezisben, valamint a malignus transzformációban. A miR-29a-nak tehát hatása van a DMBA daganatképző potenciáljára a Myc/miR-29a/LOXL2 útvonalon keresztül. 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. Ismert, hogy a miR-9-1 csendesítése fokozza az onkogének expresszióját, melyet az általa regulált RUNX1-RUNX1T1 transzkripció faktor komplex indukál. Továbbá igazolták, hogy a miR-9 csökkenés korai biomarkerként szolgál különböző rosszindulatú daganatok, például az emlőrák kialakulásakor. A miR-9-3 lókusztira 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. 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 feltételezetten 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

A miR-134 erős kifejeződése a c-Myc onkogén, a Cyclin E és a Cyclin D1 sejtciklus szabályozó fehérjék csökkent expressziós szintjét okozza, 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. Ez eredményeinkben tapasztalt egyértelmű és jelentős nemi eltérések hátterében a miR-134 olyan upstream regulátorai állhatnak, mint az NF- κ B transzkripciós faktor. A DMBA növeli az NF- κ B expresszióját, mely többek között a miR-134 inhibitora is, tehát a DMBA az NF- κ 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- κ B aktivációt, így gátolja annak represszív hatását a miR-134-re, mely ebben az esetben az expresszió határozott növekedéséhez vezethetett. 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. Ezen lényeges vizsgálati szempontok a többi miRNS esetén, vagy általában a hím állatok vizsgált szerveiben kevésbé teljesültek. A céljaimmal összhangban tehát, a kutatásunkban megtervezett vizsgálati panel kialakítása ezen mikroRNS-ek, valamint az mTORC1 gén bevonásával megvalósult.

Eredményeink hangsúlyozzák, hogy míg a génexpressziós és miRNS expressziós változások érzékeny biomarkerek, 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.

A karcinogenezis molekuláris folyamatainak a komplexitása szükségessé teszi a tesztrendszerek kiterjesztését a jelátviteli utak és szabályozóik 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.

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 tumorszuppresszor 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.

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.

IF: 3,752

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

IF: 3,752

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-zsírsvak 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.