

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A monoamin jelátvitel és rexinoid alapú kombinációs
kezelések szerepe az emlőrák kemoprevenciójában**

Lengyel Máté

Témavezető: Dr. Uray Iván Péter



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2026

**A monoamin jelátvitel és rexinoid alapú kombinációs kezelések szerepe az emlőrák
kemoprevenciójában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Lengyel Máté okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskolája keretében

Témavezető: Dr. Uray Iván Péter, PhD

Az értekezés bírálói: Dr. Tőkés Anna Mária, PhD
Dr. Pethő Zoltán Dénes, PhD

A bírálóbizottság elnöke: Dr. Szabó Gábor, MTA doktora

A bírálóbizottság tagjai: Dr. Lontay Beáta, PhD, MTA doktora
Dr. Füredi András, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:

Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2026. November 12. 13:00 óra

Bevezetés

Az emlőrák epidemiológiája és kockázatbecslési lehetőségei

Az emlőrák világszerte az egyik leggyakrabban diagnosztizált rosszindulatú daganattípus nők körében, és napjainkban is jelentős halálozási okot jelent. A GLOBOCAN 2022 becslései szerint évente több mint 2,3 millió új eset kerül felismerésre, és közel 670 000 haláleset köthető a betegséghez. Az incidencia növekedése több tényező együttes hatására vezethető vissza, ideértve az életmódbeli változásokat, az elhízás gyakoribbá válását, a reprodukzív életszakaszok átalakulását és a népesség öregedését. A túlélési arányok jelentős regionális eltéréseket mutatnak, ami az egészségügyi ellátáshoz való hozzáférés és a szűrési programok hatékonyságának különbségeire utal (Bray Bsc et al. 2024).

Az emlőrák kialakulásának kockázatát genetikai, hormonális, környezeti és életmódbeli tényezők együttesen határozzák meg. A legnagyobb genetikai kockázattal a BRCA1 és BRCA2 gének mutációi járnak, amelyek több mint tízszeres emlőrákkockázatot jelentenek, és gyakran agresszív, hormonreceptor-negatív daganatok kialakulásához vezetnek (Saleem et al. 2020). A hormonális rizikófaktorok, például a korai menarche, a késői menopauza, a nulliparitás elsősorban az ösztrogénfüggő emlőrák kockázatát növelik (Clamp, Danson, and Clemons 2002). Az életmódbeli tényezők, köztük az elhízás, az alkoholfogyasztás, a dohányzás és a fizikai inaktivitás szintén jelentős szerepet játszanak a betegség előfordulásában (Friedenreich, Ryder-Burbidge, and McNeil 2020; Luo et al. 2011; Romieu et al. 2015). Emellett az emlőszövet fokozott kötőszöveti merevsége is önálló rizikófaktorként azonosítható.

A hatékony emlőrák-megelőzés egyik kulcseleme a pontos kockázatbecslés, amely lehetővé teszi a szűrési stratégiák és a kemoprevenció célzott alkalmazását (Cyr and Kennard 2023; Harkness, Astley, and Evans 2020). A jelenleg elérhető rizikóbecslő módszerek több adatforrást integrálnak, beleértve a klinikai és epidemiológiai paramétereket, a genetikai vizsgálatokat, a képalkotó módszereket és a szöveti biomarkereket (Usher-Smith et al. 2023). A széles körben alkalmazott Gail-modell az életkor, a reprodukatív tényezők és a családi anamnézis alapján becsüli meg az emlőrák kockázatát, míg a Tyrer–Cuzick modell már a genetikai predispozíciót és a mammográfiás denzitást is figyelembe veszi (Kurian et al. 2021; Stevanato et al. 2022). A genetikai megközelítések egyre inkább kiegészülnek sokgénés kockázati pontszámokkal (Easton et al. 2015; Ho et al. 2021). Az elmúlt években a mesterséges intelligencián (MI) alapuló módszerek egyre nagyobb szerepet kapnak az emlőrák kockázatbecslésében (Khanna et al. 2022). Ezek az MI-n alapuló megközelítések lehetővé teszik heterogén adatok integrált elemzését, ezáltal javítva a rizikóstratifikáció pontosságát. Ugyanakkor klinikai alkalmazásukat jelenleg az adatok heterogenitása, a standardizált benchmark adatkészletek hiánya és a módszerek validációjának korlátai nehezítik (Logan, Kennedy, and Catchpoole 2023; Sourlos et al. 2024).

Az emlőtumorok molekuláris klasszifikációja

Az emlőrák nem egységes betegség, hanem biológiailag és klinikailag is heterogén kórkép, amely számos, eltérő molekuláris altípusból áll. A molekuláris klasszifikáció alapvetően meghatározza a daganatok prognózisát, biológiai viselkedését és a terápiás válaszképességet. A klinikai gyakorlatban alkalmazott besorolás elsősorban az ösztrogén- és progesteron-receptor státusz, valamint a Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) expressziója alapján különbözteti el az egyes altípusokat (Tsang and Tse 2020).

Ennek alapján megkülönböztethetők hormonreceptor-pozitív, HER2-pozitív és triplanegatív emlőtumorsejt-típusok. A génexpressziós profilok vizsgálatának bevonása lehetővé tette a PAM50 teszt bevezetését, amely alapján öt molekuláris alcsoport különíthető el: Luminal A, Luminal B, HER2-enriched, Basal-like és Normal-like (Orrantia-Borunda et al. 2022). Ezek a csoportok nem csupán a prognózist határozzák meg, hanem azt is, hogy mely jelátviteli utak aktívak a tumorban, így különböző terápiás érzékenységet is előre jelezhetnek. A hormonreceptor-pozitív daganatok jellemzően lassabb progressziót mutatnak és jól reagálnak a hormon receptorokat célzó terápiára, míg a hormonreceptor-negatív, különösen a triplanegatív altípus agresszívebb klinikai lefolyással és kedvezőtlenebb prognózissal jár (Kensler et al. 2018). Triplanegatív altípusok esetében a célzott terápiás és preventív lehetőségek korlátozottak.

Mindezek alapján az emlőtumorsejt-típusok molekuláris klasszifikációjának figyelembevétele elengedhetetlen új, hormonreceptor-független kemoprevenziós stratégiák kidolgozásához, valamint új preventív vagy terápiás célpontok azonosításához.

Klasszikus kemoprevenziós megközelítések és célcsoportjaik

Az emlőrák klinikai gyakorlatban alkalmazott kemoprevenziós stratégiái döntően az ösztrogén-jelátvitel gátlásán alapulnak. A szelektív ösztrogénreceptor-modulátorok és az aromatázgátlók hatásmechanizmusa az ösztrogénfüggő proliferáció csökkentésére irányul, ezáltal elsősorban hormonreceptor-pozitív emlődaganatok megelőzésében bizonyultak hatékonynak. Ezen klasszikus megközelítések célcsoportját jellemzően genetikai vagy hormonális rizikófaktorokkal rendelkező egyének alkotják, beleértve a BRCA1 és BRCA2 mutációhordozókat, valamint a fokozott ösztrogén-expozíciót indikáló anamnézissel rendelkező nőket (Bao, Prowell, and Stearns 2006; Chlebowski 2014).

Az ösztrogén-jelátvitelt célzó kemopreventív megközelítések hatékonysága azonban szorosan összefügg a daganatok hormonreceptor-státuszával, mivel ezen hatóanyagok preventív hatása hormonreceptor-negatív altípusok esetén kevésbé érvényesül. A hormon-függő kemoprevenzió klinikai alkalmazását jelentősen korlátozza a hatóanyagok kedvezőtlen mellékhatásprofilja. A thromboembóliás szövődmények, az endometriumot érintő elváltozások, valamint az anyagcsere- és csontrendszeri mellékhatások gyakran preventív hatékonyságot limitáló mellékhatásként említhetők (Cuzick et al. 2020).

Összességében a klasszikus kemoprevenziós megközelítések hatékonysága jól definiált, de egy szűkebb célcsoportra korlátozódik. Ez a korlát egyértelműen rámutat arra az igényre, hogy olyan hormonreceptor-státustól független kemoprevenziós stratégiák kerüljenek előtérbe, amelyek szélesebb populációban is alkalmazhatók, és kedvezőbb mellékhatásprofil mellett biztosítanak preventív hatást.

Retinoidok és retinoidok alkalmazása kemoprevenzióban

A retinoid jelátvitel központi szerepet játszik a sejt differenciáció, a proliferáció és az apoptózis szabályozásában, ezért már korán felmerült a retinoidok alkalmazásának lehetősége az emlőrák kemoprevenziójában (Simeone and Tari 2004). Preklinikai és klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a retinoidok képesek gátolni az emlődaganatok kialakulását, azonban klinikai alkalmazásukat kedvezőtlen mellékhatásprofil korlátozza. A hosszú távú alkalmazás során jelentkező bőr-, nyálkahártya- és anyagcsere-eltérések (hypertriglyceridaemia) jelentősen csökkentik ezen

vegyületek hosszú távú, prevenciósz célú alkalmazhatóságát (Veronesi et al. 1999; Zanardi et al. 2006).

A rexinoidok a retinoidok egy olyan alcsoportját képviselik, amelyek szelektíven a retinoid X receptorokon keresztül fejtik ki hatásukat. Preklinikai modellekben a rexinoid bexarotene hatékonyan gátolta a hormon receptor-negatív emlődaganatok kialakulását (Li et al. 2008). Ugyanakkor a rexinoid alapú monoterápia esetében is megfigyelhetők dózisfüggő mellékhatások (Uray, Dmitrovsky, and Brown 2016). A rexinoidok kemopreventív célra történő alkalmazását elősegítheti, azok kombinációs stratégiák mentén való alkalmazása. Ez a megközelítés lehetőséget teremt a hatékony kemoprevenzió alacsonyabb hatóanyag-dózisok és alacsonyabb toxicitás mellett történő megvalósítására, és közvetlenül megalapozza a rexinoid-alapú kombinációs kezelések vizsgálatát.

A monoamin jelátvitel szerepe és lehetőségei a hormonfüggetlen kemoprevenzióban

A monoamin jelátviteli rendszerek, különösen a monoamin jelátviteli útvonalak nem kizárólag a központi idegrendszerben aktívak, hanem perifériás szövetekben, így az emlőhámsejtekben is funkcionálisan jelen vannak (Field et al. 2025; Hernandez et al. 2009; Matsuda et al. 2004; Stull et al. 2007). A monoamin mediátorok hatásukat elsősorban G-fehérvéhez kapcsolt receptorokon keresztül fejtik ki, amelyek eltérő intracelluláris jelátviteli útvonalakat aktiválnak.

Retrospektív klinikai vizsgálatok alapján a monoamin jelátvitelt befolyásoló, széles körben alkalmazott gyógyszercsoportok, például az adrenerg receptor antagonisták és a 5-HT transzporter (SERT) gátlók, összefüggésbe hozhatók az emlőrák kialakulásának és progressziójának szabályozásával (Díaz-Santana et al. 2025; Löffling et al. 2022; Ma et al. 2025; Niu et al. 2024; Strell et al. 2024; Wernli et al. 2009). A monoamin jelátvitel célzott vizsgálata ezért különösen releváns lehet a hormonreceptor-negatív emlődaganatok megelőzésében.

Összességében a monoamin jelátviteli rendszerek olyan, klinikailag jól ismert és farmakológiailag hozzáférhető célpontokat jelentenek, amelyek modulációja új lehetőségeket nyithat a hormon receptor-független kemoprevenzióban. Ezek a célpontok alkalmasak lehetnek monoterápiás vagy kombinációs stratégiák kialakítására.

A szerotonin jelátvitel és homeosztázis szerepe az emlősejtek működésében

A szerotonin, más néven 5-hydroxytryptamine (5-HT), klasszikusan neurotranszmitterként ismert molekula, ugyanakkor számos perifériás szövetben is lokális szabályozó faktorként működik. Az emlőmirigyben a hámsejtek képesek 5-HT előállítására, transzportjára és érzékelésére, ezért a szerotonin nem pusztán szisztémásan érkező jelként, hanem autokrin és parakrin módon ható szöveti homeosztázis-szabályozó tényezőként értelmezhető. Korábbi vizsgálatok alapján az emlőhám eredetű 5-HT szerepet játszik a laktációs homeosztázisban, a tight junction-ök szabályozásában, a tejtermelés visszacsatolt kontrolljában és az involúció elindításában (Matsuda et al. 2004; Stull et al. 2007; Hernandez et al. 2009; Field et al. 2024).

A 5-HT bioszintézise triptofánból indul ki, amelynek sebességmeghatározó lépését perifériás, nem neuronális szövetekben elsősorban a tryptophan hydroxylase 1 (TPH1) katalizálja. A sejten belüli és sejten kívüli szerotonin eloszlását a szerotonin transzporter (SERT, SLC6A4) szabályozza, amely az extracelluláris térből veszi vissza a 5-HT-t a sejtekbe. A SERT gátlása

szelektív szerotonin-visszavétel gátlókkal (SSRI) módosíthatja az extracelluláris receptoraktiváció és az intracelluláris szerotonin-metabolizmus arányát. Fontos ugyanakkor, hogy a 5-HT sejtfelvétele nem kizárólag SERT-függő folyamat. Más monoamin transzporterek, például a DAT, NET, OCT család tagjai és a PMAT is hozzájárulhatnak a szerotonin transzportjához, ami a perifériás sejtekben különösen komplex szabályozási lehetőséget teremt (Daws 2009; Duan and Wang 2010; Li et al. 2013).

A szerotonin extracelluláris hatásait több receptorcsalád közvetíti. A 5-HT₁ receptorok döntően Gi-kapcsoltak, a 5-HT₂ receptorok Gq-kapcsoltak, míg a 5-HT₄, 5-HT₆ és 5-HT₇ receptorok Gs-kapcsolt jelátvitelt aktiválnak. Ezek az útvonalak a cAMP/PKA, PLC/IP₃/DAG, Ca²⁺-, Erk-, Akt- és RhoA/ROCK-jelátvitelhez kapcsolódva befolyásolhatják a sejtek proliferációját, túlélését, morfológiáját és motilitását (Hoyer, Hannon, and Martin 2002; Nichols and Nichols 2008). Mivel a 5-HT rendszer több ponton farmakológiailag befolyásolható, például TPH1-gátlókkal, SSRI-kkel, SNRI-kkel, receptor agonistákkal és antagonistákkal, valamint monoamin-oxidáz gátlókkal, alkalmas modellrendszert jelenthet annak vizsgálatára, hogy a perifériás monoamin jelátvitel hogyan kapcsolódik az emlőhámsejtek korai, kemoprevenció szempontjából releváns állapotváltozásaihoz.

Az extracelluláris mátrix kompozíciójának szerepe és potenciálja a kemoprevencióban

Az extracelluláris mátrix (ECM) az emlőszövet strukturális és funkcionális integritásának alapvető meghatározója, amely aktívan részt vesz az epithel sejtek proliferációjának, differenciációjának és migrációjának szabályozásában (Paavolainen and Peuhu 2021). A daganatképződés során az ECM összetétele és mechanikai tulajdonságai jelentős átalakuláson mennek keresztül, amely nem csupán következménye, hanem aktív elősegítője is a tumor iniciációjának és progressziójának (Boyd et al. 2010; Levental et al. 2009). A stromális merevség fokozódása és a kollagénhálózat átszerveződése több emlőrák altípus esetében is rossz prognózissal társul (Acerbi et al. 2015). Az ECM újraszerveződése már a daganatképződést megelőző állapotokban is kimutatható, beleértve a premalignus léziókat és az obesitással társult emlőszövetet is (Ellies 2016; Kuziel, Moore, and Arendt 2023). Ezekben az állapotokban a fokozott kollagén-depozíció, a keresztkötések számának növekedése és a mátrix-szervező fehérjék emelkedett expressziója tumor-promotáló mikrokörnyezetet alakít ki. A megváltozott mátrix nem csak a sejtek mechanoszenzoros válaszait befolyásolja, hanem fizikai gátat is képezhet a terápiás hatóanyagok diffúziója számára, továbbá integrin–növekedési faktor receptorok aktiváción keresztül terápiás rezisztenciát is támogathat (Brown and Wendt 2014; Jain 1987).

Ezen felismerések alapján az extracelluláris mátrix, mint egy új, önálló kemoprevenciók célpontként kerül előtérbe. Preklinikai modellekben a mátrix-remodellációt szabályozó enzimek, például a kollagén-keresztkötésben szerepet játszó lysyl-oxidáz (LOX) gátlása mérsékelte a stromális merevséget, valamint csökkentette az emlődaganatok inváziós és metasztatikus potenciálját (Cetin et al. 2024; Ferreira et al. 2021). Bár a mátrix metalloproteinázok gátlása korai klinikai vizsgálatokban nem hozott áttörést, ezek az eredmények rávilágítanak arra, hogy az ECM dinamikus szabályozása preventív szempontból releváns beavatkozási pont lehet (Winer, Adams, and Mignatti 2018).

Összességében az extracelluláris mátrix szerveződésének és kompozíciójának befolyásolása olyan, korai eseményeket érintő lehetőséget kínál, amely alkalmas lehet a daganatképződés irányának módosítására. Ez különösen indokoltá teszi olyan molekuláris szabályozó faktorok azonosítását és vizsgálatát, amelyek az epithel sejtek és a mátriszóma kölcsönhatását képesek befolyásolni, és ezáltal új, hormonreceptor-független kemoprevenciós stratégiák alapját képezhetik.

A Zymogene Granule Protein 16B szekretált faktor, mint mátriszóma újraszerveződést támogató célpont

Az emlődaganatok kialakulása és progressziója nem kizárólag a tumorsejtek belső genetikai és jelátviteli változásain múlik, hanem szorosan összefügg a sejtek és a mikrokörnyezet közötti kommunikációval is. Ebben a folyamatban kiemelt szerepük van a szekretált faktoroknak, amelyek képesek módosítani a sejtek proliferációját, motilitását, adhézióját, valamint az extracelluláris mátrix (ECM) szerveződését. A daganatasszociált ECM-remodelláció már korai, premalignus állapotokban is megjelenhet, és fokozott szöveti merevséggel, megváltozott kollagénhálózattal, bazális membrán fragmentációval, valamint integrin- és mechanoszenzitív jelátviteli utak aktivációjával járhat (Levental et al. 2009; Boyd et al. 2010; Acerbi et al. 2015; Paavolainen and Peuhu 2021).

A Zymogene Granule Protein 16B (ZG16B), más néven 'pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor' (PAUF), a ZG16 fehérjecsalád tagja. A családba tartozó fehérjék lektinszerű, Jacalin-related β -prism szerkezeti motívumokat tartalmaznak, amelyek alapján potenciálisan részt vehetnek sejtfelszíni vagy extracelluláris komponensek felismerésében és a sejtek közötti kommunikáció szabályozásában (Kanagawa et al. 2011). A ZG16B-t elsősorban hasnyálmirigy-daganatokban vizsgálták, ahol szekretált tumorpromotáló faktorként írták le, amely befolyásolhatja a sejt migrációt, az inváziót, az angiogenezist és a tumor mikrokörnyezetének szerveződését (Kim et al. 2009; Park et al. 2011; Lee et al. 2011; Song et al. 2016).

A ZG16B jelentőségét az emlődaganat-biológia szempontjából az adja, hogy olyan folyamatokhoz kapcsolható, amelyek a tumorprogresszió korai és későbbi lépéseiben egyaránt meghatározóak lehetnek. Ide tartozik a sejt motilitás fokozódása, a sejt-ECM kapcsolatok átrendeződése, az aktin-citoszkeleton szabályozása, a fokális adhéziós útvonalak aktivációja és az epitheliális-mesenchymális tranzíció irányába történő fenotípusváltás. Mivel ezek a folyamatok a mátriszóma újraszerveződésével és az invazívabb sejt viselkedés kialakulásával is összefügghetnek, a ZG16B vizsgálata alkalmas lehet annak feltárására, hogy egy szekretált faktor hogyan kapcsolhatja össze az epithel sejtek állapotváltozásait az extracelluláris mátrix dinamikus átalakulásával.

A ZG16B ezért olyan koncepcionális célpontként értelmezhető, amely összeköti a szekretált tumormikrokörnyezeti faktorok, az ECM-remodelláció és az emlőhámsejtek viselkedésének szabályozását. Ennek vizsgálata különösen indokolt olyan kemoprevenciós megközelítésekben,

amelyek nem kizárólag a sejtosztódás közvetlen gátlására, hanem a tumorprogressziót támogató szöveti és mátrixfüggő állapotváltozások korai befolyásolására irányulnak.

Célkitűzések

Jelen doktori kutatás általános célja a monoamin jelátvitel szerepének feltárása a normál emlő epithel sejtek működésének szabályozásában, különös tekintettel a proliferációt befolyásoló mechanizmusokra és a G-fehérje-kapcsolt jelátviteli útvonalak közötti mintázatok és összefüggések azonosítására. Vizsgálataink során arra törekedtünk, hogy szisztematikusan jellemezzük a sejtfelszíni monoamin receptorok aktivációja által kiváltott sejtés válaszokat, és elkülönítsük az intracelluláris és extracelluláris monoamin hatások biológiai következményeit.

A munka második fő célkitűzése volt annak feltárása, hogy a monoamin jelátvitel farmakológiai modulációja alkalmas-e a rexinoid alapú kemopreventív kezelések hatásosságának fokozására, illetve az alkalmazott hatóanyag-dózisok csökkentésére.

Harmadik általános célkitűzésként többféle rexinoid alapú szinergikus kombináció által szabályozott célgének azonosítását tűztük ki célul, valamint egy kiválasztott célgén (ZG16B) részletes funkcionális karakterizálását normál emlő epithel sejtekben és emlőtumor sejtekben. Ennek keretében vizsgáltuk, hogy az azonosított célgén (ZG16B) milyen szerepet tölt be a proliferáció, a sejtmotilitás, az extracelluláris mátrix átrendeződése, az epitheliális–mesenchymális átmenet (EMT) és a tumorprogresszió szempontjából releváns folyamatok szabályozásában.

Kérdésfelvetések és specifikus célkitűzések

Jelen doktori kutatás központi kérdése az volt, hogy a perifériás monoamin jelátviteli útvonalak és a rexinoid jelátvitel kombinált farmakológiai modulációja alkalmas lehet-e hormonreceptor-státusztól független kemoprevenációs mechanizmusok feltárására. A munka alapfeltevése szerint a normál emlő epithel sejtekben jelen lévő monoaminerg jelátviteli hálózatok képesek a proliferációt, a motilitást és a mikrokörnyezeti átrendeződést is befolyásolni. Ennek megfelelően a kutatás célja nem egyetlen hatóanyag hatásának leírása volt, hanem olyan jelátviteli mechanizmusok és molekuláris célpontok karakterizálása, amely hosszabb távon biztonságosabb, alacsonyabb dózisú és szélesebb betegpopulációban alkalmazható preventív stratégiák alapját képezheti.

A célkitűzéseket az alábbi, egymásra épülő tudományos kérdések és hipotézisek mentén fogalmaztam meg:

1. A szerotonin jelátvitel farmakológiailag modulálható normál emlő epithel sejtekben?

A kiinduló hipotézis szerint a normál emlő epithel sejtekben jelen vannak a 5-HT szintéziséhez, transzportjához és receptor-mediált jelátviteléhez szükséges fő komponensek. Ennek vizsgálata során célom volt meghatározni, hogy a sejtek képesek-e 5-HT előállítására, kifejezik-e a szerotonin jelátvitel alapvető elemeit, valamint, hogy a 5-HT transzporter farmakológiai modulációja emlősejtekben milyen biológiai válaszokhoz vezethet.

2. A szerotonin intra-/extracelluláris eloszlásának milyen jelentősége van a proliferáció szabályozása szempontjából?

A második hipotézis szerint a 5-HT hatása kettős biológiai rendszerként értelmezhető. Az extracelluláris 5-HT sejt felszíni receptorokon keresztül indíthat jelátviteli folyamatokat, míg az intracelluláris felvétel a monoamin lebontásával összefüggő mechanizmusokhoz kapcsolódhat. Ezért célom volt a SERT gátlás, a külső 5-HT stimuláció, valamint a receptor szelektív farmakológiai modulációjának összevetése annak érdekében, hogy elkülöníthető legyen a receptor-mediált proliferációs szabályozás és az intracelluláris monoamin hatások szerepe. Ezzel párhuzamosan célként jelent meg azoknak a jelátviteli elemeknek az azonosítása is, amelyek a szerotonin rendszert potenciális kemoprevenációs célpontként kiemelhetik.

3. A receptor izoforma vagy a hozzá kapcsolt jelátvitel modulációja lehet meghatározó a proliferáció szabályozásában?

A harmadik hipotézis szerint a monoamin receptorok proliferációra gyakorolt hatását nem kizárólag az határozza meg, hogy melyik receptorcsalád aktiválódik. Legalább ilyen fontos lehet, hogy az adott receptor milyen G-fehérje-kapcsoltságú jelátviteli útvonalba csatornázza a külső jelet. Ennek megfelelően célom volt megvizsgálni, hogy a G_s -, G_i - és G_q -kapcsolt receptorútvonalak eltérő módon befolyásolják-e a normál emlő epithel sejtek növekedési válaszát. A szerotonin receptorokon túlmenően a vizsgálat célja az volt, hogy más monoamin receptorcsaládok farmakológiai modulációjával is tesztelhető legyen ez a jelátviteli elv, és ezzel szélesebb körben azonosíthatók legyenek lehetséges preventív célpontok.

4. Képes-e a szerotonin jelátvitel célzott modulációja potenciálni az ismerten kemopreventív hatású rexinoid bexarotene proliferációt gátló hatását normál emlő epithel sejtekben?

A negyedik hipotézis szerint a monoaminerg útvonalak és az RXR-agonista bexarotene hatásai funkcionálisan összekapcsolódhatnak normál emlő epithel sejtekben. Korábbi carvedilol és bexarotene kombinációs eredmények és az általunk azonosított monoaminerg stimuláció alapú antiproliferatív mechanizmus felvetette, hogy a carvedilol-on kívül más hatóanyagok is potenciálhatják a rexinoid bexarotene hatását. Ezek alapján célom volt annak vizsgálata, hogy a szerotonin jelátvitel modulációja képes-e szinergikusan erősíteni a bexarotene növekedést gátló hatását.

5. Milyen közös molekuláris mechanizmusok és kombinációs specifikus célgének állhatnak a monoamin és rexinoid alapú szinergiák hátterében?

Az ötödik hipotézis szerint a monoamin jelátviteli modulátorok és rexinoidok közötti szinergia kombinációs specifikusan szabályozott molekuláris célpontokhoz kapcsolódhat. Ennek vizsgálatára célom volt olyan génexpressziós és kromatin szintű változások azonosítása, amelyek több szinergikus kombináció hatásával is összefügghetnek. Kiemelt kérdés volt, hogy a bexarotene alapú kombinációk képesek-e epigenetikai szabályozáson keresztül – például az *ARID1A* és SWI/SNF complex működésének befolyásolása révén - olyan célgének expresszióját módosítani, amelyek a tumorképződést vagy tumor progressziót elősegítő folyamatok (proliferáció, a sejt motilitás és a mikrokörnyezeti átprogramozódás) szabályozásában vehetnek részt.

6. Milyen biológiai folyamatok szabályozásában tölt be kulcsszerepet a ZG16B gén rexinoid-monoaminerg szinergikus kombinációk általi szuppressziója?

A hatodik hipotézis szerint a Zymogene Granule Protein 16B a rexinoid alapú kombinációs kezelések egyik *ARIDIA* és SWI/SNF complex által szabályozott célgénje. Korábbi szakirodalmi adatok alapján a *ZG16B* egy olyan szekretált regulátor, amely funkcionálisan is hozzájárulhat a tumorképződést és progressziót támogató szöveti átrendeződéshez^{157,159,161,165,167}. Ennek megfelelően célom volt megvizsgálni, hogy a *ZG16B* expressziójának vagy extracelluláris jelenlétének megváltozása befolyásolja-e a normál emlő epithel sejtek és emlőtumor sejtek proliferációját, migrációját, adhéziós viselkedését, valamint az extracelluláris mátrixhoz és epithelialis plaszticitáshoz kapcsolódó génprogramokat. Ez a célkitűzés a *ZG16B*-t a kombinációs kezelések lehetséges funkcionális mediátoraként és új preventív célpontként helyezte vizsgálataink középpontjába.

Anyagok és Módszerek

Sejtvonalak és sejtenyésztes

A normál emlő epithelium modellezésére a hTert-immortalizált humán emlő epithel sejtvonal szolgált, amely megőrzi a nem transzformált sejtek alapvető morfológiai és funkcionális tulajdonságait, és alkalmas a proliferációt érintő korai, kemoprevenció szempontjából releváns változások vizsgálatára.

A tumorsejtes kísérletekhez eltérő hormonreceptor-státusszal rendelkező humán emlőtumor sejtvonalakat (MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC1143) alkalmaztunk, lehetővé téve a megfigyelt hatások molekuláris altípusfüggő értékelését. A sejtvonalak fenntartása standard sejtenyésztes körülmények között történt, kontrollált hőmérséklet-, CO₂- és tápanyag-ellátás mellett. A sejtvonalak hitelesítése újgenerációs szekvenálás segítségével történt, a mikoplazma-mentességet Promokine PCR-alapú teszttel rendszeresen ellenőriztük. A kísérleteinkben a sejtek kizárólag 15. passzázs előtti állapotban kerültek felhasználásra.

ZG16B klónozása expressziós vektorba

A szekretált ZG16B faktor előállításához egy egyedi expressziós rendszert alakítottunk ki, amelynek alapját egy pEGFP-Empty emlős expressziós vektor képezte. A ZG16B cDNS-ét HME-hTert sejtek RNS mintáiból RT-PCR-rel állítottuk elő, majd PCR-rel amplifikáltuk. Az amplifikált cDNS két végére restrikciós enzim hasítási helyeket illesztettünk EcoRI és Sall enzimekhez, majd az emésztést követően a ZG16B szekvenciát pEGFP-C3 vektorba ligáltuk T4 DNS ligázzal. A host rendszerként HEK293 sejteket alkalmaztunk, mivel ezek a sejtek normál körülmények között nem expresszálják a ZG16B-t. A vektor kialakításakor EGFP koexpressziót is biztosítottunk a transzfekciós hatékonyság monitorozására. A ZG16B szekrécióját irányító szignálpeptid a transzláció során lehasadt az EGFP-val együtt.

Farmakológiai és biológiai kezelések, hatóanyagkönyvtár

A farmakológiai vizsgálatokhoz egy hatóanyag-könyvtárat hoztunk létre, amely a monoamin G-fehéjéhez kapcsolt receptorok modulátorait foglalta magában. Ezen kívül az alsóbb jelátviteli elemek (Adenylate-cyclase, Protein Kinase-A) gátlására szelektív inhibitorokat, rexinoidként

bexarotene-t, többféle szelektív szerotonin-visszavétel gátlót (SSRI) (citalopram, sertraline, paroxetine) és a nem szelektív β -adrenerg gátló carvedilol-t használtuk farmakológiai kezeléseink során. A hatóanyagokat a Tocris – Bio-Techne W&D Systems Kft.-től, illetve a MedChemExpress – Bio-Kaszel Ltd.-től szereztük be. A hatóanyagokat a forgalmazók ajánlásainak megfelelően tároltuk, és a következő lehetséges oldószerekben oldottuk be, gyártói ajánlások alapján: DMSO-EtOH (1:1), PBS, 1M NaOH, 1M HCl.

A kezeléseket 0,1-10 μ M koncentráció-tartományban alkalmaztuk, és minden esetben a megfelelő hordozóanyag-kontrollhoz (DMSO-EtOH, PBS) viszonyítva értékeltük a sejtes válaszokat. A rexinoid alapú kombinációkat dózis-hatás vizsgálatokban alkalmaztuk a szinergia mérésére.

A biológiai kezelések során rekombináns, szekretált ZG16B-t tartalmazó, méretkizárásos szűréssel (10-30 kDa mérettartományban) koncentrált, kondicionált felülűsöt alkalmaztunk. Ezek a felülűsök előzetesen pEGFP-ZG16B-vel transzfektált HEK293 sejtekről kerültek begyűjtésre. Negatív kontrollként pEGFP-Empty vektorral transzfektált HEK293 sejtek felülűsóját használtuk fel, mely ugyanazon a feldolgozási eljáráson esett át.

Proliferációs assay

Az antiproliferatív hatások kvantitatív értékelésére 2D sejtenyészetben végzett proliferációs assay-t alkalmaztunk. A normál emlő epithel sejtek osztódási rátája alkalmas és releváns readout a daganatképződés korai lépéseinek modellezésére, mivel a homeosztatikusan szabályozott proliferáció felborulása az emlőrák iniciációjának egyik legáltalánosabb jellemzője.

A sejteket meghatározott, sejtvonalanként optimalizált alacsony sejtszámban osztottuk ki 96-well optikai plate-ekre, majd a farmakológiai vagy biológiai kezeléseket hozzáadtuk a sejtekhez 3-5 napos inkubációs idő mellett.

A proliferációs assay alkalmazása lehetővé tette a különböző G-fehérje-kapcsoltságú receptorokat célzó modulátorok funkcionális összehasonlítását, valamint annak meghatározását, hogy mely jelátviteli útvonalak aktiválása vagy gátlása vezet antiproliferatív válasz kialakulásához normál emlő epithel sejtekben. A 2D proliferációs rendszer így alapvető szűrőplatformként szolgált.

Kolóniaformáló assay

A sejtek hosszú távú növekedési potenciáljának és transzformáltságának vizsgálatára kolóniaformáló assay-t alkalmaztunk. A kísérletek során emlőtumor sejtvonalakat alacsony olvadáspontú agaróz-mátrixban tenyésztettük, mely a sejteket egy kitapadásra alkalmatlan közegben való túlélésre és osztódásra kényszerítette, mely a malignus transzformáció egyik kulcs-lépése. A sejteket a mátrixba történő beágyazás előtt farmakológiai kezeléseknak vetettük alá, majd a tenyésztés teljes időtartama alatt a kezeléseket a felülűsón keresztül biztosítottuk. A kolóniák kialakulását többhetes tenyésztési periódus után értékeltük mikroszkópos felvételek alapján. A kolóniák számát és méretét Z-stack képekből készített projektált felvételeken, automatizált képanalízis segítségével határoztuk meg. Ez a megközelítés lehetővé tette a különböző kezelési feltételek hatásának objektív, kvantitatív összehasonlítását a transzformáltság szempontjából. MCF7 sejtek esetén a kolóniaformáló assay-t követően az agarózban kultivált kolóniákból RNS-t izoláltunk további analízis céljára.

Sejt-migráció, adhézió és morfológia vizsgálata

A sejtmigráció vizsgálatára wound-healing assay-t alkalmaztunk normál emlő epithel és emlőtumor sejtvonalakon. A sejteket előkezelést követően Ibidi inzerterekbe osztottuk ki, majd az inzert eltávolítása után mikroszkópos felvételek segítségével követtük a sejtmentes terület záródását. A migráció mértékét a sejtek által benőtt terület nagyságának kvantitatív elemzésével határoztuk meg, azonos időintervallumok alkalmazása mellett.

A sejtek adhéziós tulajdonságait tripszin-alapú adhéziós assay segítségével értékeltük. Ennek során a tenyésztőfelülethez tapadó sejtek leválását követtük időfüggő módon, és a még kitapadt sejtek számát hasonlítottuk össze különböző kezelési feltételek mellett.

A sejtmorfológia vizsgálata mikroszkópos képanalízisen alapult (CellProfiler), amely során a sejtek alakját és geometriai paramétereit kvantitatív módon elemeztük. A morfológiai változásokat a sejtek hosszanti és rövidebb átlójának arányával, valamint a cirkularitás mérésével jellemeztük egyedi sejtszinten.

Immunfestés, immunhisztokémia és fluoreszcens mikroszkópia

Az intracelluláris és extracelluláris fehérjék expressziójának és lokalizációjának vizsgálatára immunfestési és immunhisztokémiai módszereket alkalmaztunk. A sejteket fixálást és permeabilizálást követően specifikus elsődleges antitestekkel inkubáltuk, majd fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestek alkalmazásával tettük láthatóvá a vizsgált fehérjéket. A sejtmorfológiai és fehérje-expressziós változásokat fluoreszcens mikroszkópos felvételek alapján értékeltük. A fluoreszcencia intenzitások kiértékelése képanalízis-alapú módszerekkel (ImageJ, CellProfiler) történt.

Az *in vivo* kísérletekből származó tumorszövetek esetében indirekt immunhisztokémiai jelölést alkalmaztunk paraffinba ágyazott metszeteken. A festések során a célfehérjék szöveti eloszlását és relatív expressziós szintjét értékeltük a hematoxylin sejtmagi háttérfestés adta terület nagyságához képest.

Western blot analízis

A sejtes jelátviteli változások vizsgálatára western-blot analízist alkalmaztunk. Az analízisre szánt sejt-lizátumok koncentrációit egységes végső koncentrációra hígítottuk, denaturáltuk, majd a fehérjéket SDS-PAGE segítségével választottuk szét és PVDF membránra transzferáltuk. A célfehérjék kimutatását specifikus elsődleges antitestek és fluoreszcensen jelölt másodlagos antitestekkel való jelöléssel végeztük. Az Erk 1/2, Src és Akt fehérjék aktivációs állapotát foszforiláció-specifikus ellenanyagokkal elemeztük. A foszforilációs mintázat idő- és dózisfüggő változásait több időpontban (0; 10; 60 perc) végzett mérésekkel követtük. A western blot felvételeket denzitometria (ImageJ) segítségével értékeltük kvantitatívan. Az egyes foszforilált fehérjék szintjét az azonos totál fehérje-szintekre normalizáltuk.

Másodlagos hírvivők (IP3, cAMP) kvantitálása

A G-fehérjéhez kapcsolt receptorok aktivációjához társuló jelátviteli válaszok vizsgálatára a sejtekben keletkező másodlagos hírvivők, az IP3 és a cAMP mennyiségét határoztuk meg. A méréseket normál emlő epithel sejtekben végeztük. Az IP3 szint változását a G_q-kapcsolt jelátviteli útvonal aktivitásának jellemzésére használtuk, míg a cAMP mennyiségének meghatározása a G_s- és G_i-kapcsolt receptorok aktivitásának vizsgálatát tette lehetővé. Az cAMP szint mérése erre dedikált kompetitív ELISA kit segítségével volt lehetséges, míg az IP3 szintet

annak származéka az IP1 szintjének monitorozására szolgáló HTRF-technológia alapú kit segítségével végeztük el. Az IP1 szint szorosan korrelál az IP3 szinttel.

Transzkriptomika, RNS szekvenálás és RT-qPCR

A farmakológiai és biológiai kezelések által kiváltott génexpressziós változások széles körű feltáráshoz transzkriptomikai analízist végeztünk. Kísérleteink során RNS izolálást TRIzol (UD-Genomed Kft.) és Macherey-Nagel RNS izoláló készlet segítségével végeztünk a gyártó ajánlások alapján. A vizsgálatok során normál emlő epithel sejtekből izolált totál RNS szolgált a nagy áteresztőképességű RNS-szekvenálási (RNA-seq) analízisek alapjául. Az RNS-izolálást követően az UD-Genomed Kft. segítségével elvégeztük a minták minőségellenőrzését, a könyvtárkészítést és a szekvenálást. Az RNS-szekvenálási adatok bioinformatikai feldolgozása során a differenciálisan expresszált gének azonosítására fókuszáltunk. A génexpressziós adatok funkcionális értelmezése gén ontológiai- (ShinyGO) és géncsoport-alapú elemzésekkel (GSEA) történt, lehetővé téve a transzkripciós válaszok biológiai kontextusba helyezését. Az RNS-szekvenálás során kapott eredményeinket valós idejű kvantitatív PCR vizsgálatokkal (RT-qPCR) validáltuk.

Kromatin-immunprecipitáció, szekvenálás és qPCR

A transzkripciós szabályozás epigenetikai hátterének vizsgálatára kromatin-immunprecipitációs (ChIP) módszert alkalmaztunk. A vizsgálatok során a sejteket formaldehiddel fixáltuk, majd a kromatin mechanikai fragmentálását követően azt specifikus ellenanyagokkal immunprecipitáltuk annak érdekében, hogy a célfehérjékhez vagy hisztonmódosításokhoz kötődő DNS-szakaszokat izoláljuk. A ChIP-kísérletekből származó DNS-mintákat egyrészt nagy áteresztőképességű szekvenálást alkalmaztunk a kötődési mintázatok genom-szintű feltérképezésére, másrészt célzott ChIP-qPCR vizsgálatokat végeztünk előre meghatározott genomi régiókat célozva. A qPCR-alapú kiértékelés során a dúsulást input kontrollhoz viszonyítva határoztuk meg.

Valós idejű kvantitatív PCR

A kiválasztott gének expressziós szintjének kvantitatív meghatározására valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) módszert alkalmaztunk. A vizsgálatokhoz teljes RNS-ből reverz transzkripcióval előállított cDNS szolgált templátként. A PCR reakciókat fluoreszcens detektáláson alapuló rendszerben (TaqMan próbákkal) végeztük, amely lehetővé tette az amplifikáció valós idejű nyomon követését. Az RT-qPCR vizsgálatok során a génexpressziós szinteket megfelelő referencia génekhez (β -actin) normalizáltuk. Az RT-qPCR mérések megerősítették az RNS-szekvenálás során azonosított, kiemelt jelentőségű transzkripcionális változásokat.

Állatkísérletes vizsgálatok

A farmakológiai beavatkozások *in vivo* hatásainak vizsgálatára két, eltérő biológiai hátterű emlődaganat-modellt alkalmaztunk. A kemoprevenációs hatások értékelésére MMTV-ErbB2 transzgénikus egereket használtunk, amelyek HER2 túlexpressziójuk révén széles körben alkalmazott preklinikai modellként szolgálnak az emlődaganat kialakulásának és korai

progressziójának vizsgálatára. Az MMTV-ErbB2 egérmodellel kapcsolatos primer kísérletek, nem képezték jelen doktori kutatás keretébe tartozó munkát, azonban a kísérletből származó szövetszövetminták immunhisztokémiai feldolgozása igen.

A tumorprogresszióval összefüggő hatások elemzésére humán emlőtumor sejtvonallal xenograftált SCID egereket vontunk be a kísérletekbe bexarotene + carvedilol hatásának vizsgálatára. Az *ex vivo* minták feldolgozása során a ZG16B és a fibronectin-1 (FN1) expresszióját immunhisztokémiai módszerekkel vizsgáltuk. A xenograftált SCID egerekkel végzett állatkísérletek során alkalmazott minden eljárás az érvényben lévő etikai és állatjóléti irányelveknek megfelelően történt (16/2020/DEMÁB).

Genomikai adatbázisból származó adatok feldolgozása

A ZG16B expressziójának daganattípusok közötti összehasonlításához nyilvánosan elérhető genomikai adatbázisokat használtunk fel. Az elemzések alapjául a The Cancer Genome Atlas (TCGA Pan-Cancer) adatbázis szolgált, amely összesen 12 839 mintát foglal magában különböző humán daganattípusokból. Az emlődaganatok részletes vizsgálatához a TCGA Breast Cancer (BRCA) adatszettet alkalmaztuk, amely lehetővé tette a ZG16B expressziójának összehasonlítását normál emlőszövetek és emlőtumor minták között. Az adatok feldolgozását az UCSC Xena böngésző felületén végeztük.

Statisztikai elemzés és ábrakészítés

A kísérletes adatok statisztikai kiértékelése és ábrázolása GraphPad Prism szoftverrel történt. Az adatok minden esetben legalább három, egymástól független kísérlet eredményeit reprezentálják. Az eredményeket átlag $\pm$ SEM formában ábrázoltuk, a kísérleti elrendezésnek megfelelően. Két csoport összehasonlítása esetén Student-féle T-tesztet alkalmaztunk, míg több csoport egyidejű összehasonlításakor egy- vagy kétutas varianciaanalízist (ANOVA) végeztünk, a megfelelő *post-hoc* tesztekkel kiegészítve. A statisztikai szignifikancia küszöbértékét minden esetben legalább $p < 0.05$ -ben határoztuk meg.

Eredmények

A SERT gátlása és az 5-HT stimuláció antiproliferatív hatást fejt ki HME-hTert sejtekben

A 5-HT jelátvitel emlőepithel sejtek proliferációjára gyakorolt hatásának vizsgálatát a szerotonin-transzporter (SERT) farmakológiai modulációjával kezdtük meg HME-hTert sejtekben. A klinikumban is alkalmazott SSRI-k összehasonlítása során a sertraline és a citalopram nem befolyásolta szignifikánsan a sejtszámot, míg a paroxetine dózisfüggő módon, antiproliferatív hatást váltott ki. A paroxetine hatásának hátterében a SERT-hez mutató magas affinitás állt, amit a SERT siRNS-mediált csendesítése által kiváltott hasonló mértékű sejtcsökkenés is megerősített. 3D szferoidokon vizsgálata során is megerősítettük, a 5-HT és paroxetine növekedést gátló hatását. Megállapítottuk, hogy a külsőleg alkalmazott 5-HT önmagában is csökkentette a sejtek proliferációját, amely hatás paroxetine előkezelés mellett tovább erősödött, jelezve a 5-HT intra- és extracelluláris hatásainak elkülöníthetőségét. Ezek az eredmények együttesen arra utaltak, hogy a SERT gátlása és a sejt felszíni 5-HT jelátvitel aktiválása meghatározó szerepet játszik a normál emlő epithel sejtek proliferációjának szabályozásában.

Normál emlő epithel sejtek kifejezik az 5-HT termeléséhez és jelátviteléhez szükséges fehérjéket

A 5-HT által kiváltott antiproliferatív hatások értelmezéséhez elsőként igazoltuk, hogy a normál emlő epithel sejtek rendelkeznek a 5-HT előállításához, transzportjához és érzékeléséhez szükséges molekuláris komponensekkel. Immunfluoreszcens vizsgálatok alapján a HME-hTert sejtekben detektáltuk a 5-HT akkumulációját, amely paroxetine kezelés hatására szignifikánsan csökkent, jelezve a SERT funkcionális aktivitását a sejtvonalban. A SERT kifejeződése mellett igazoltuk az 5-HT előállításában kulcs-szerepet betöltő TPH1 enzim kifejeződését is. Transzkriptomikai adataink azt mutatták, hogy a sejtek egyszerre több 5-HT receptor izoformát expresszálnak, azonban az 5-HT₇ receptor transzkript szintje nagyságrendekkel meghaladta a többi vizsgált izoformáét. Ezek az eredmények megerősítették, hogy a vizsgált normál emlő epithel sejtekben a 5-HT jelátviteléhez szükséges kulcsfontosságú molekuláris komponensek jelen vannak.

Paroxetine hatására transzkripcionális változások mennek végbe az emlő epithel sejtekben

A paroxetine hatására indukált expressziót mutató gének transzkriptomikai és GSEA analízise során olyan útvonalak elemeinek fokozott expresszióját tapasztaltuk, amelyek elsősorban a sejtfelszíni receptor-aktivációhoz és jelátviteli folyamatokhoz kapcsolódó géneket érintették. Az expressziós adatok alapján a paroxetine nem csupán a sejtekbe jutó szerotonin mennyiségét csökkentette a transzporter gátlásán keresztül, hanem ezzel párhuzamosan fokozta több, receptor-mediált jelátvitellel összefüggő gén kifejeződését.

Ezzel párhuzamosan, a paroxetine kezelés hatására számos gén kifejeződése csökkent. Szuppressziót mutatott számos olyan gén, melyek funkciói a sejtciklus-szabályozási pontokhoz kapcsolhatóak. Ezen kívül a DNS hibajavításhoz és metabolizmushoz kapcsolódó útvonalakba sorolható gének is szuppressziót mutattak. Mindezen eredmények megalapozták a 5-HT sejtfelszínen keresztül megvalósuló és intracelluláris akkumulációból fakadó hatásainak további vizsgálatát.

Az emlő epithel sejtekbe bejutó 5-HT hatására fokozódik a szabadgyök termelés és DNS-károsodás indukálódik

A szerotonin intracelluláris hatásainak vizsgálata során azt találtuk, hogy az emlő epithel sejtekbe bejutó 5-HT fokozza a szabadgyökök (ROS) termelődését. A megnövekedett ROS-szinttel párhuzamosan DNS-károsodásra utaló jelek is megjelentek, ami arra utalt, hogy az intracelluláris 5-HT oxidatív stresszt indukál ezekben a sejtekben. A SERT paroxetine-nel történő gátlása csökkentette a sejtekbe jutó 5-HT mennyiségét, és ezzel együtt mérsékelte a ROS-termelést, valamint a DNS-károsodás mértékét is.

A normál emlő epithel sejteken kifejeződő 5-HT receptorok funkcionálisan aktívak és képesek az Erk 1/2 aktivitását befolyásolni

A szerotonin sejtfelszíni hatásmechanizmusának vizsgálata során igazoltuk, hogy a normál emlő epithel sejtek által kifejezett 5-HT receptorok funkcionálisan aktívak. A szerotonin kezelést követően az Erk 1/2 foszforilációja csökkenést mutatott. Az Erk 1/2 defoszforilációja tovább erősödött paroxetine jelenlétében, ami összhangban volt azzal a megfigyeléssel, hogy a SERT gátlása a sejtfelszíni 5-HT hatásokat amplifikálja. Ezek az adatok arra utaltak, hogy az Erk 1/2

aktivitás változása elsősorban a sejt felszíni 5-HT receptorokon keresztül megvalósuló jelátvitel következménye, és nem a szerotonin direkt intracelluláris hatásából ered. Az eredmények alapján indokoltá vált annak részletes feltárása, hogy az egyes 5-HT receptor izoformák milyen mértékben járulnak hozzá a normál emlőd epithel sejtek proliferációjának szabályozásához.

Szelektív 5-HT receptor modulátorok szűrővizsgálata potenciálisan antiproliferatív hatású hatóanyagokat azonosított HME-hTert sejtekben

A sejt felszíni szerotonin receptorok funkcionális szerepének további tisztázására szelektív 5-HT receptor modulátorok dózis-hatás alapú szűrővizsgálatát végeztük HME-hTert sejtekben. A vizsgálatok során a különböző 5-HT receptor izoformákhoz tartozó agonisták és antagonisták eltérő mértékben befolyásolták a sejtek proliferációját. A G_s -kapcsolt szerotonin receptorok agonistái, valamint a G_i - és G_q -kapcsolt receptorok antagonistái több esetben kifejezett sejtszámcsökkenést idéztek elő. A dózis-hatás vizsgálatok és az IC_{50} értékek alapján több olyan vegyület is azonosítható volt, amely alacsony koncentrációtartományban ($< 4 \mu M$) jelentős antiproliferatív hatást fejtett ki. Ezek az eredmények megerősítették, hogy a 5-HT receptorok farmakológiai modulációja alkalmas lehet a normál emlőd epithel sejtek proliferációjának befolyásolására, és megalapozták a megfigyelt hatások G-fehérje-kapcsoltság szerinti összehasonlító elemzését. Végül a G_s -kapcsolt jelátvitel alsóbb elemeinek (adenilát-cikláz, protein-kináz A, PKA) farmakológiai vizsgálata megerősítette, hogy a szerotonin antiproliferatív hatása mögött az 5-HT₇-Adenilát-cikláz- cAMP-PKA jelátviteli tengely aktivációja felelős jelentős mértékben.

A receptorok G-fehérje kapcsoltsága meghatározza a receptor izoforma aktivációja során a proliferációra kifejtett hatását

A szelektív 5-HT receptor modulátorokkal végzett szűrővizsgálatok eredményeinek integrált elemzése során egyértelmű összefüggés rajzolódott ki a receptorok G-fehérje-kapcsoltsága és a proliferációra gyakorolt hatás között. Függetlenül attól, hogy az adott hatóanyag mely 5-HT receptor izoformát célozta, a G_s -kapcsolt receptorok szelektív aktiválása, valamint a G_i - és G_q -kapcsolt receptorok gátlása jellemzően antiproliferatív válaszhoz vezetett HME-hTert sejtekben. Ezzel szemben a G_i - és G_q -kapcsolt receptorok agonistái többnyire nem csökkentették a sejtszámot. Az általános mechanizmus további vizsgálata céljából a hatóanyag-könyvtárunkat kibővítettük egyéb GPCR receptorcsaládok (dopamin-, hisztamin-, muszkarinos-acetyl-kolin-receptor) tagjaira specifikus agonistákkal és antagonistákkal. A különböző receptorcsaládokból származó hatóanyag-szűrési adatok egységes mintázata megerősítette, hogy a sejt választ elsősorban nem a receptor izoforma, hanem az általa aktivált G-fehérje-mediált jelátviteli útvonal határozza meg. Ezek az eredmények azt jelezték, hogy az adenilát-cikláz-cAMP-tengely aktiválódása kulcsszerepet játszik az antiproliferatív hatás kialakulásában.

A szerotonin receptorok sejt felszíni stimulációja szinergikusan potenciálja a bexarotene antiproliferatív hatását normál emlőd epithel sejtekben

Normál emlőd epithel sejtekben a bexarotene és szerotoninerg hatóanyagok kombinált alkalmazása erőteljesebb proliferáció gátló hatást eredményezett, mint az egyedi kezelések. Dózis-hatás alapú kombinációs vizsgálatok kimutatták, hogy a bexarotene és paroxetine között meghatározott koncentrációtartományban szinergista kölcsönhatás érvényesül. Hasonlóan, a bexarotene és 5-HT

kombinációja már alacsony koncentrációk mellett is erős szinergiát mutatott, amely paroxetine jelenlétében tovább fokozódott. Ezek az eredmények igazolták, hogy a 5-HT receptorok sejtfelszíni stimulációja szinergikusan erősíti a bexarotene antiproliferatív hatását normál emlő epithel sejtekben.

A 3D HME-hTert szferoidokon végzett kísérletek alapján a bexarotene és paroxetine kombinációja szignifikánsan csökkentette a proliferációs markerre (Ki-67) nézve pozitív sejtek arányát, valamint a szferoidok méretét.

A bexarotene alapú szinergikus kombinációk céljának, a ZG16B expressziója az ARID1A-n keresztül farmakológiai modulálható

A bexarotene-alapú szinergikus kombinációk molekuláris hátterének feltárása során azonosítottuk, hogy a ZG16B expressziója következetesen csökken ezen kezelések hatására normál emlő epithel sejtekben. A ZG16B szuppressziójának mechanisztikus vizsgálata kimutatta, hogy a hatás ARID1A-függő módon valósul meg, mivel ARID1A hiányában a kombinációk ZG16B-t csökkentő hatása megszűnt. Kromatin-immunprecipitációs vizsgálatok alapján a bexarotene és carvedilol kombinációja elősegítette az ARID1A dúsulását a ZG16B-hez kapcsolódó enhancer régióban, miközben csökkent a H3K27ac dúsulása ezen a genomi területen. Ez a kromatinállapot-változás a régió kondenzálódására és a ZG16B transzkripciójának gátlására utalt. Ezek az eredmények igazolták, hogy a ZG16B expressziója farmakológiai úton, egy jól körülhatárolható, ARID1A-mediált epigenetikai mechanizmuson keresztül modulálható rexinoid alapú szinergikus kombinációk által.

A ZG16B fokozza a proliferációt normál emlősejtekben és hormon-receptor pozitív emlőtumor sejtekben

A bexarotene-alapú szinergikus kombinációk által szuppresszált ZG16B biológiai szerepének tisztázására funkcionális vizsgálatokat végeztünk normál epithel és emlőtumor sejtvonalakon. ZG16B-t expresszáló HEK293 sejtek által kondicionált felülszóval kezelt normál emlő epithel sejtek fokozott proliferációt mutattak. Hasonló proliferációt fokozó hatás jelentkezett hormonreceptor-pozitív emlőtumor sejtvonalak esetén is, míg hormonreceptor-negatív sejtekben nem változott a proliferáció. A jelátviteli vizsgálatok alapján a ZG16B kezelés hatására az Akt foszforilációja minden vizsgált sejtvonalban fokozódott, míg az Erk 1/2 és Src foszforiláció változása függött a sejtvonal transzformáltságától és hormonreceptor-státuszától.

A ZG16B fokozza a normál és epithel sejtek és az emlőtumor sejtek motilitását

A ZG16B proliferációra gyakorolt hatásának feltárását követően a fehérje sejtmigrációra és motilitásra kifejtett hatását is vizsgáltuk normál emlő epithel és emlőtumor sejtekben. ZG16B kezelés hatására mind a normál emlő epithel sejtek, mind az emlőtumor sejtvonalak fokozott motilitást mutattak. A megfigyelt válasz a sejtek migrációs képességének növekedésében és az adhézio csökkenésében nyilvánult meg. Ezek az eredmények összhangban voltak azokkal a korábbi megfigyelésekkel, amelyek szerint a ZG16B más daganattípusokban is migrációt és inváziót elősegítő faktorként működik (Park et al. 2011; Youn et al. 2022).

A ZG16B migrációt stimuláló hatását a PI3K-Akt jelátviteli útvonal aktiválódása közvetíti

A ZG16B által kiváltott fokozott sejtmotilitás molekuláris hátterének feltárása során a fő mitogén jelátviteli útvonalak aktivációját vizsgáltuk normál emlő epithel és emlőtumor sejtekben. A jelátviteli analízisek alapján a ZG16B kezelés hatására az Akt foszforilációja minden vizsgált sejtvonalban következetesen fokozódott. Ez a megfigyelés arra utalt, hogy a ZG16B által kiváltott jelátviteli válasz központi eleme az Akt útvonal aktivációja. A PI3K farmakológiai gátlása LY294002 alkalmazásával hatékonyan csökkentette a ZG16B által indukált migrációs választ és párhuzamosan az Akt aktiválódását. Ezek az eredmények egyértelműen alátámasztották, hogy a ZG16B migrációt serkentő hatását elsődlegesen a PI3K–Akt jelátviteli útvonal közvetíti.

Az ECM átstrukturálásához és sejtmotilitáshoz kapcsolódó útvonalak inverz módon szabályozódnak ZG16B és a bexarotene + carvedilol kombinációja által

A ZG16B által kiváltott fenotípusos válaszok molekuláris hátterének feltárására transzkriptomikai elemzést végeztünk normál emlő epithel sejtekben. A ZG16B kezelés hatására elsősorban az extracelluláris mátrix szerveződésében részt vevő gének expressziója fokozódott. A stimulált expressziót mutató gének elsősorban az ECM–receptor interakció, a fokális adhézió és az aktin-citoszkeleton szabályozás útvonalaiiban mutattak dúsulást, amelyek jól illeszkedtek a megfigyelt motilitásbeli változásokhoz. Ezzel szemben a bexarotene és carvedilol kombinált alkalmazása az ezen útvonalakhoz tartozó gének jelentős részének szuppresszióját eredményezte. A két kezelés által kialakított transzkripciós profilok összehasonlítása azt mutatta, hogy az ECM újrastruktúrázódásához és sejtmotilitáshoz kapcsolódó folyamatokat inverz módon szabályozza ZG16B stimuláció és a bexarotene + carvedilol kombinációja. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a szinergikus rexinoid-alapú kombinációk migrációt gátló hatásában a ZG16B szuppressziója fontos szerepet tölt be.

A ZG16B normál emlő epithel sejtekben és emlőtumor sejtekben EMT-t indukál

A ZG16B által kiváltott migrációs és extracelluláris mátrixhoz kapcsolódó változások alapján megvizsgáltuk, hogy a fehérje képes-e epitheliális–mesenchymális átmenetet (ETM) indukálni normál és emlőtumor sejtekben. ZG16B kezelés hatására mind normál emlő epithel sejtekben, mind emlőtumor sejtvonalakban olyan génexpressziós és fenotípusos változások jelentkeztek, amelyek EMT-re jellemzőek. Vizsgálataink során az epitheliális marker (CDH1) csökkenését és a mesenchymális markerek (FN1, CDH2) fokozott kifejeződését detektáltuk. Az EMT markerek mérése mellett normál sejtekben a sejtes morfológia analízise során is a mesenchymális fenotípusra jellemző változásokat detektáltunk.

ZG16B és bexarotene + carvedilol kombinációja ellentétes módon szabályozza az emlőtumorsejtek kolóniaképző képességét

ZG16B jelenlétében az emlőtumorsejtek hormon receptor expressziótól függetlenül, fokozott kolóniaformáló kapacitást mutattak, ami a sejtek fokozott transzformáltságára utal. Ezzel szemben a bexarotene és carvedilol kombinált kezelése szignifikánsan csökkentette az emlőtumorsejtek kolóniaképző képességét. Ezek az eredmények alátámasztották, hogy a ZG16B és a szinergikus rexinoid-alapú kombinációk ellentétes irányban szabályozzák az emlőtumorsejtek hosszú távú proliferációs és túlélési képességeit.

A bexarotene + carvedilol kombinációja csökkenti a ZG16B és FN1 expresszióját normál emlőszövetben és xenograft emlőtumor szövetben

A korábbi *in vitro* megfigyelések *in vivo* validálására két eltérő állatmodell tumormentes vagy tumoros emlőszöveget vizsgáltuk immunhisztokémia segítségével. MMTV-ErbB2 transzgenikus egerek normál emlőszövetében a bexarotene és carvedilol kombinált alkalmazása csökkentette a ZG16B és a FN1 expresszióját. Hasonló expresszióbeli csökkenés volt kimutatható MDA-MB-231 sejtvonallal létrehozott SCID egér xenograft modellekből származó emlőtumor szövetekben is. Az immunhisztokémiai vizsgálatok alapján a kombinált kezelés hatása hormonreceptor-negatív emlőtumorkban is érvényesült. Ezek az eredmények megerősítették, hogy a bexarotene + carvedilol kombinációja *in vivo* környezetben is hatékonyan csökkenti a ZG16B és FN1 expresszióját, és alátámasztották a ZG16B szabályozásának szerepét mind az emlődaganatok kialakulásának, mind progressziójának gátlásában.

Diszkusszió

Jelen doktori kutatás eredményei rámutatnak arra, hogy a monoamin GPCR-jelátvitel eddig alulértékelt, ugyanakkor biológiailag és transzlációs szempontból is releváns kemoprevenciók szempontot jelenthet az emlőrák megelőzésére.

Egyre növekvő mennyiségű klinikai és preklinikai adat arra utal, hogy a β -adrenerg receptor blokkolók befolyásolhatják a daganatprogressziót és a relapszus kockázatát (Albitre et al. 2023; Fjæstad et al. 2025; Madden, Szpunar, and Brown 2011). Az adrenerg modulátorok kiemelt transzlációs értékkel bírnak, mivel jól karakterizált, széles körben alkalmazott gyógyszercsoportról van szó, amelyet a betegek jelentős része nem onkológiai indikációk miatt már eleve hosszú távon használ. Hasonlóan széles körben és tartósan alkalmazott készítmények az antidepresszánsok és az antihisztaminok is. Az onkológiai betegek körében a daganatos betegséghez társuló pszichés terhelés miatt az antidepresszánsok alkalmazása gyakoribb, mint az általános populációban. Ennek következtében az emlődaganatos betegek és a 5-HT jelátvitelt moduláló szerek használói közötti populációs átfedés klinikailag releváns nagyságrendű lehet. Ennek ellenére az ezekhez a receptorcsaládokhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak emlőtumorkban betöltött szerepe eddig nagyrészt feltáratlan maradt.

A klinikumban széles körben alkalmazott szelektív szerotonin visszavétel gátlók a SERT gátlásán keresztül a szerotonin jel elnyúlását és felerősödését eredményezik. Bár az SSRI használatával kapcsolatos retrospektív vizsgálatok eredményei nem egységesek, egyes tanulmányok csökkent emlőrák kockázatról számoltak be (Díaz-Santana et al. 2025; Wernli et al. 2009). Az ellentmondásos adatok háttérben feltehetően az áll, hogy ezek az elemzések gyakran nem veszik figyelembe az emlőtumorkok molekuláris és receptorstátusz alapján heterogenitását.

Az emlőszövet homeosztatisz 5-HT jelátvitelének kialakulásában alapvető tényező, hogy a normál emlő epithel sejtek képesek a szerotonin endogén szintézisére. Saját eredményeink igazolták, hogy a 5-HT bioszintézisének kulcsenzime, a triptofán-hidroxiláz 1 (TPH1) kifejeződik normál emlő epithel sejtekben. Az eddigi irodalmi adatok a 5-HT fiziológiás szerepét az emlőszövetben elsősorban a szekretoros aktiváció és az involúció szabályozásában írják le. Vizsgálataink során a 5-HT sejten belüli akkumulációja immunjelöléssel kimutatható volt.

Irodalmi adatok alapján emlőtumor sejtekben a triptofán-hidroxiláz enzim (TPH1) expressziója gyakran magasabb a normál sejtekhez képest, ami feltehetően fokozott 5-HT termeléssel társul

(Gautam et al. 2016; Pai et al. 2009). A 5-HT jelátvitel szabályozását ugyanakkor nem kizárólag a szintézis határozza meg, hanem a 5-HT transzporter (SERT) működése is, amely az extracelluláris térből történő szerotonin felvételéért felelős. A transzporter aktivitása az elektrokémiai nátrium és kálium gradienshez kötött, amelyet az ATP-dependens nátrium kálium pumpa tart fenn (Yang and Gouaux 2021). A transzporter működése nem csak a sejten belüli 5-HT koncentrációt befolyásolhatja, hanem a receptor-mediált jelátvitel időbeli és térbeli mintázatának kialakításában is fontos szerepet tölt be.

Proliferációs kísérleteinkben a SERT gén csendesítése gátolta a normál emlő epithel sejtek proliferációját. Ezt farmakológiai úton is megerősítettük, mivel a paroxetine kezelés hasonló antiproliferatív hatást váltott ki. Ezzel szemben más vizsgált szelektív 5-HT visszavétel gátlók, például a citalopram és a sertralin nem mutattak antiproliferatív hatást. Ez a különbség nagy valószínűséggel az egyes hatóanyagok 5-HT transzporterhez mutatott eltérő affinitásával magyarázható, mivel a tesztelt gátlószerek közül a paroxetine rendelkezik a legerősebb kötődési affinitással a SERT-hez (Hyttel 1993). Ennek megfelelően a további kísérletekben a paroxetine alkalmazását választottuk a 5-HT intra- és extracelluláris hatásainak funkcionális elkülönítésére. Eredményeink egyúttal rámutatnak arra is, hogy az SSRI használat és az emlőrák kockázata közötti összefüggéseket vizsgáló retrospektív tanulmányok értelmezését nem csak a daganatok molekuláris klasszifikációjának hiánya, hanem az alkalmazott SSRI-k farmakológiai különbségeinek figyelmen kívül hagyása is torzíthatja.

Az antiproliferatív hatással összhangban kimutattuk, hogy a sejtekbe bejutó 5-HT mennyisége paroxetine kezelés hatására csökken. Ez egyúttal azt is igazolta, hogy a SERT normál emlő epithel sejteken nem csak kifejeződik, hanem az funkcionálisan aktív is.

Transzkriptomikai elemzéseink azt mutatták, hogy paroxetine kezelés hatására fokozódik számos, sejtfelszíni receptor mediált jelátvitelhez kapcsolódó gén expressziója. Az útvonalanalízis direkt G-fehérje mediált jelátviteli folyamatokkal, a kalcium homeosztázishoz kapcsolódó útvonalakkal, valamint szinaptikus jelátvitellel összefüggő gének fokozott kifejeződését mutatta. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a transzporter gátlásakor a sejtek a sejtfelszíni receptorokon keresztül megvalósuló jelátvitelhez szükséges komponensek expresszióját fokozzák. A megfigyelt transzkriptomikai változások feltehetően nem akut GPCR aktiváció közvetlen következményei, hanem egy adaptív válasz részét képezik a tartós, elnyújtott extracelluláris 5-HT jelenlétre, amely kezdeti receptor aktivációt, majd deszenzitizációt követően kompenzációs mechanizmusokat indukál. A transzkriptomikai analízis során több olyan útvonalat azonosítottunk, amelyekhez kapcsolható gének expressziója paroxetine kezelést követően szignifikánsan csökkent. Ezek elsősorban a sejtciklus szabályozásához, a genomi integritás fenntartásához és az endoplazmatikus retikulum stressz válaszhoz kapcsolódó folyamatokat érintették. Ezen változások értelmezésekor is fontos figyelembe venni, hogy a normál emlő epithel sejtek fiziológiás körülmények között is hozzáférnek 5-HT-hoz, amely intracelluláris célpontokon keresztül is képes hatást kifejteni. A 5-HT transzporter paroxetine általi gátlása nem csak az extracelluláris 5-HT szintet és a receptor mediált stimulációt növeli, hanem ezzel párhuzamosan csökkenti a sejtekbe jutó 5-HT mennyiségét is. A sejten belüli 5-HT lebontása során reaktív oxigén gyökök keletkeznek, amely jelenséget saját kísérleteinkben is kimutattuk. Irodalmi adatok alapján a monoamin-oxidáz aktivitás emlőtumorokban pro-tumorigenikus tényező lehet, az oxidatív stressz és a genomi instabilitás fokozása miatt (Ahmadimanesht et al. 2019; Jorgensen et al. 2022; Sáez-Freire et al. 2018). Eredményeink alapján a sejtekbe jutó 5-HT mennyiségének csökkentése együtt járt a reaktív oxigén gyökök szintjének mérséklődésével, valamint a DNS-károsodást jelző γ H2AX-pozitív sejtek arányának szignifikáns csökkenésével. Ezen eredményeket is figyelembe véve, a paroxetine kezelés hatására megfigyelt szuppresszált

transzkripciós programok nagy valószínűséggel az intracelluláris 5-HT hatásainak részleges megszűnését tükrözhetik.

Eredményeink alapján a paroxetine kezelés hatására a sejtekbe jutó 5-HT mennyiségének csökkenése az intracelluláris 5-HT közvetítette hatások fokozatos gyengüléséhez vezet, ami elsősorban a kezelés korai fázisában járul hozzá a megfigyelt transzkripcionális változásokhoz. Tartós kezelés során azonban kérdéses, hogy a sejtfelszíni 5-HT receptorokon keresztül megvalósuló jelátvitel, milyen időintervallumban marad releváns a sejtfunkciók befolyásolása szempontjából. Proliferációs kísérleteinkben azt találtuk, hogy transzporter gátlása mellett a 5-HT antiproliferatív hatása szignifikánsan erősödik, ami arra utal, hogy a paroxetine által kiváltott proliferáció csökkenés elsődlegesen a sejtfelszíni receptorok fokozott és elnyújtott stimulációjának tulajdonítható.

A sejtfelszíni 5-HT jelátvitel antiproliferatív jellegének további igazolására elemeztük több, emlő epithel sejtekben esszenciális mitogén jelátviteli útvonal aktivitását. Az ERK 1/2, az Akt és a Src-hoz kapcsolt jelátviteli tengelyek a sejtnövekedés, túlélés és adhézió szabályozásának központi elemei. Kísérleteinkben ezek közül kizárólag az ERK 1/2 fehérjék gyors defoszforilációját figyeztük meg 5-HT hatására, ami a mitogén jelátvitel inaktíválódására utal, és összhangban áll a tapasztalt antiproliferatív válasszal. Irodalmi adatok szerint a 5-HT ERK 1/2 aktivitásra gyakorolt hatása erősen sejttípus-függő, mivel egyes rendszerekben aktivációt, míg másokban gátlást írtak le (Lione et al. 2000; Della Rocca et al. 1999; Sheehan et al. 2003). Saját eredményeink alapján normál emlő epithel sejtekben az ERK 1/2 defoszforiláció nagy valószínűséggel a sejtfelszíni 5-HT receptorokon keresztül megvalósuló jelátvitel következménye, amit az is alátámaszt, hogy paroxetine jelenlétében a hatás kifejezettebbé vált. Ezzel párhuzamosan ismert, hogy más G_s -kapcsolt receptorok, például a β_2 -adrenerg receptorok aktivációja is képes az ERK 1/2 defoszforilációját kiváltani, ami felveti annak a lehetőségét, hogy a 5-HT esetében is hasonló, cAMP-mediált molekuláris mechanizmus állhat a megfigyelt jelenség hátterében (Hamed et al. 2021).

Eredményeink alapján a további vizsgálatok fókuszába a sejtfelszíni 5-HT receptorok funkcionális szerepének és az általuk közvetített jelátvitelnek a részletesebb elemzése került. Transzkriptomikai adataink a szakirodalmi megfigyelésekkel összhangban igazolták, hogy a normál emlő epithel sejtek egyszerre többféle 5-HT receptor izoformát expresszálnak (Pai et al. 2009). HME-hTert sejtekben ezek közül az 5-HT₇ receptor mutatta messze a legmagasabb transzkript szintet, ugyanakkor több más izoforma kifejeződése is kimutatható volt. Az 5-HT₇ domináns expressziója önmagában növelheti annak valószínűségét, hogy alacsony ligand koncentrációk mellett a szerotonin elsősorban ehhez a receptorhoz kötődjön. Ugyanakkor, a különböző 5-HT receptorok affinitása és kötési kinetikája jelentősen eltérhet, ennek következtében a sejt válasz koncentrációfüggő módon receptorpreferencia-váltást is mutathat. A jelátviteli válasz kialakulását tovább bonyolítja, hogy az egyes G-fehérje kapcsolt útvonalak között kapcsolódási pontok találhatók, azok képesek egymásra is hatni. Már mérsékelt G_i -mediált aktivitás is hatékonyan képes csökkenteni egy domináns G_s -útvonal által kiváltott cAMP-választ, miközben egy alacsonyabb mértékben kifejezett receptor is aránytalanul erős biológiai hatást fejthet ki hatékony alsóbb jel-amplifikáció révén, különösen MAPK- vagy Ca^{2+} -függő útvonalak esetén. A jelátvitelt tovább módosíthatja a receptorok homo- és heterodimerizációja is, amely alapvetően átírhatja az egyes izoformákhoz társított kanonikus jelátviteli mintázatokat (Herrick-Davis 2013). Emellett a különböző 5-HT receptorok deszenzitizációs és internalizációs kinetikája is eltérő, így tartós ligandexpozíció során a kezdetben domináns jelátviteli útvonal idővel háttérbe szorulhat. Összességében, bár transzkriptomikai adataink egyértelműen megerősítik az 5-HT₇ receptor domináns jelenlétét a vizsgált modellrendszerben, az expressziós

szint önmagában nem elegendő annak kijelentéséhez, hogy a paroxetine és a 5-HT által kiváltott antiproliferatív hatás kizárólag ehhez az izoformához köthető.

További vizsgálataink célja ezért a normál emlő epithel sejtekben kifejeződő 5-HT receptor izoformák funkcionális szerepének validálása volt endogén 5-HT, valamint szelektív agonisták és antagonisták alkalmazásával. A receptorok G-fehérje-kapcsoltságának megfelelő jelátviteli válaszokat másodlagos hírvivők mérésével követtük. A G_s és G_i kapcsolt receptorok adenilát-cikláz aktivitását cAMP szint mérésével, míg a G_q kapcsolt receptorok foszfolipáz C aktivitását IP1 meghatározásával vizsgáltuk. Reprezentatív célpontként három, eltérő G-fehérje-kapcsoltságú, a modell rendszerben általunk igazoltan kifejezett receptort választottunk, az 5-HT_{1D}, az 5-HT_{2B} és az 5-HT₇ izoformákat.

5-HT kezelés hatására mind a cAMP, mind az IP1 szint emelkedett, ami működőképes 5-HT receptor jelátvitelt igazolt. A szelektív modulátorokkal végzett kísérletek során mindhárom receptor esetében a várt, kanonikus másodlagos hírvivő válasz jelent meg, miközben a modulátorok nem befolyásolták az eltérő G-fehérje-kapcsoltságú receptorok működését. Ez alátámasztja az alkalmazott hatóanyagok izoforma-specifitását, ugyanakkor arra is utal, hogy a modellrendszerben többféle 5-HT receptor egyidejű aktivációja zajlik.

Ezt követően egy célzott hatóanyag-könyvtárat állítottunk össze annak vizsgálatára, hogy a három kanonikus jelátviteli útvonal közül melyek modulációja vezet antiproliferatív válaszhoz. A dózis-hatás alapú szűrővizsgálatok során több hatóanyag is szignifikáns proliferáció gátló hatást mutatott. Az antiproliferatív mintázat összességében a G_s -kapcsolt útvonal aktivációja, illetve a G_q és G_i útvonalak gátlása felé mutatott, ami az adenilát-cikláz és a cAMP mediált jelátvitel központi szerepét emeli ki.

Bár egyes kivételek is megjelentek, az eredmények alapján a G_s -kapcsolt jelátvitel aktivációja kiemelt jelentőségűnek bizonyult a normál emlő epithel sejtek antiproliferatív válaszában. Ez összhangban áll az 5-HT₆ és 5-HT₇ receptorokkal kapcsolatos irodalmi adatokkal, amelyek szerint ezek a receptorok normál sejtekben antiproliferatív hatásokat közvetíthetnek, míg tumorszövetben hatásuk ettől eltérő lehet (Pai et al. 2009; Zhang et al. 2022).

A G_s -kapcsolt jelátvitel aktivációja mellett az antiproliferatív válasz kialakulásában lényeges szerepet játszik a G_i -kapcsolt receptorok gátlása is. Korábbi vizsgálatokban borjú emlő epithel sejtekben kimutatták, hogy a pertussis toxin antiproliferatív hatással rendelkezik, és képes mérsékelni a szérumban jelen lévő növekedési faktorok proliferációt serkentő hatását (Shamay et al. 1990). A pertussis toxin a G_i alegység ADP-riboszilációján keresztül inaktíválja a G_i -mediált gátló jelátvitelt, ezáltal felszabadítva az adenilát-cikláz aktivitását, és lehetővé téve a G_s -kapcsolt receptorok által közvetített cAMP termelést. Hasonló mechanizmus érvényesülhetett saját modell rendszerünkben is, mivel a G_i -kapcsolt 5-HT receptorok antagonizálása mellett az endogén 5-HT elsősorban a nem gátolt, és egyébként dominánsan kifejeződő G_s -kapcsolt receptorok aktivációjára fordulhatott. A G_q -kapcsolt receptorok modulációja ehhez hasonló mintázatot mutatott, mivel ezen receptor izoformák esetén antiproliferatív hatást kizárólag az antagonisták váltottak ki. Az eredmények összességében azt támasztják alá, hogy a normál emlő epithel sejtekben a proliferáció gátlását elsősorban a G_s -kapcsolt jelátvitel aktivációja, valamint a G_i - és G_q -mediált útvonalak gátlása határozza meg.

Az 5-HT₇ receptor szerepét a 5-HT antiproliferatív hatásában komplementációs kísérletekkel validáltuk. A sejteket szelektív 5-HT receptor antagonistákkal, valamint adenilát-cikláz és PKA inhibitorokkal előkezeltek, majd 5-HT-val, paroxetine-el vagy ezek kombinációjával stimuláltuk. Az antiproliferatív hatást kizárólag az 5-HT₇-adenilát-cikláz-PKA jelátviteli tengely bármely pontján történő gátlás volt képes megszüntetni. Ez alapján a 5-HT és a paroxetine által kiváltott proliferációcsökkenés elsődlegesen az 5-HT₇ receptor közvetítette G_s -kapcsolt jelátvitellez

köthető, amelyet a receptor kiemelkedően magas expressziója is támogat a vizsgált modellrendszerben.

Mivel a Gs-mediált jelátviteli útvonal más GPCR-okon keresztül is aktiválható, felmerült, hogy az 5-HT₇-hez köthető mechanizmus egy általánosabb szabályozási elvet tükröz. Ennek vizsgálatára kiterjesztettük elemzéseinket egyéb GPCR családokra, köztük a muszkarinos acetilkolin, dopamin és hisztamin receptorokra. Az antiproliferatív hatások mintázata ezekben a rendszerekben is következetesnek bizonyult. A Gs-kapcsolt receptorok agonistái, valamint a Gi- és Gq-kapcsolt receptorok antagonistái csökkentették leghatékonyabban a sejtek proliferációját. Összesítve az eredményeket egy egységes szabályozási minta rajzolódik ki, amelyben a Gs-kapcsolt jelátvitel aktiválása, illetve a Gi- és Gq-mediált útvonalak gátlása vezet antiproliferatív válaszhoz normál emlő epithel sejtekben.

Figyelembe véve, hogy a vizsgált sejtmódban több endogén GPCR ligand folyamatosan jelen lehet, számos receptor részben aktivált alapállapotban működhet, ami az agonisták hatását mérsékelheti. Ezzel szemben az antagonisták a bazális jelátviteli tónus csökkentésén és a Gi-mediált gátlás feloldásán keresztül hatékonyabban lehetnek képesek átrendezni a GPCR-jelátvitel egyensúlyát, ami könnyebben detektálható antiproliferatív sejt válaszhoz vezet.

A rexinoid és monoamin receptor modulátorok kombinációinak vizsgálatát megalapozta a munkacsoport korábbi megfigyelése, amely szerint a nem szelektív β -blokkoló carvedilol és a bexarotene együttes alkalmazása szinergikus antiproliferatív hatást fejt ki normál emlő epithel sejtekben *in vitro* és *in vivo* (Jdeed, Lengyel, and Uray 2022; Uray et al. 2015). Jelen doktori kutatás során ezért megvizsgáltuk, hogy a 5-HT jelátvitel modulációja képes-e hasonló módon potenciálni a bexarotene antiproliferatív hatását.

Dózis-hatás vizsgálatokban kimutattuk, hogy a bexarotene és a paroxetine kombinációja normál emlő epithel sejtekben szinergikus proliferáció gátló hatást eredményez. A szinergia megállapítását követően, a kombináció antiproliferatív hatását HME-hTert sejtekből képzett 3D szferoid módban is megerősítettük. A kombinációval kezelt szferoidok mérete szignifikánsan csökkent, és a sejtek alacsonyabb arányban mutattak Ki-67 pozitivitást a kontrollhoz képest. Mivel korábbi eredményeink alapján a paroxetine antiproliferatív hatása döntően a sejtfelszíni 5-HT receptorokon keresztül valósul meg, megvizsgáltuk a bexarotene és a 5-HT közvetlen kombinációját is. Ez a párosítás a paroxetine-nel elért hatásnál is markánsabb szinergiát mutatott, amely tovább erősödött a SERT paroxetine-nel történő szimultán gátlása mellett.

Ezen eredményeink esetén kiemelt jelentőségű azok transzlációs relevanciája, mivel vizsgálataink során olyan hatóanyagokat alkalmaztunk, amelyek klinikai alkalmazhatósága és biztonságossági profilja már jól ismert. Ennek megfelelően a paroxetine, mint széles körben alkalmazott antidepresszáns, realisabb kiindulási pontot jelent egy potenciálisan hosszú távon is alkalmazható, alacsony dózisu preventív stratégia számára. Ezzel szemben az 5-HT₇ vagy az alsóbb jelátviteli elemek szelektív farmakológiai modulációja releváns további kutatási irányt képezhet, beleértve ezen hatóanyagok toxicitásprofiljának feltárását is.

Bár a bexarotene és a monoamin jelátvitelt moduláló szerek közötti szinergiát több kombináció esetén is igazoltuk, a szinergia pontos molekuláris mechanizmusát nem ismertük. Ennek vizsgálatához olyan tumorbiológiai szempontból releváns molekuláris markereket kerestünk, amelyek több, egymástól független rexinoid alapú kombináció hatására is következetesen regulálódnak. Ezen kritériumok alapján került fókuszba a ZG16B, amelynek expressziója normál emlő epithel sejtekben mind a bexarotene–paroxetine, mind a bexarotene–carvedilol kombináció hatására szignifikánsan csökkent. A gén kiválasztását tovább indokolta, hogy TCGA adatok alapján a ZG16B emlőtumorokban emelkedett expressziót mutat a normál emlőszövethez képest,

és a különböző daganattípusok közül az emlőrák az egyik legmagasabb ZG16B expresszióval rendelkezik.

Munkacsoportunk előzetes eredményei alapján ismertté vált, hogy a bexarotene és carvedilol szinergikus antiproliferatív hatása epigenetikai szintű transzkripció átprogramozással jár együtt, az ARID1A- és BRG1-tartalmú SWI/SNF kromatin-remodelláló komplex közreműködésével (Jdeed, Erdős, et al. 2022; Jdeed, Lengyel, et al. 2022). Ennek fényében megvizsgáltuk, hogy a ZG16B expressziójának szabályozásában milyen szerepet játszik ez a mechanizmus. ChIP-szekvenálás során azonosítottunk egy, a ZG16B génhez tartozó távoli enhancer régiót, amelyen kombinált bexarotene–carvedilol kezelés mellett az ARID1A dúsulást mutatott. Ezzel párhuzamosan a H3 hiszton acetiláció csökkent, ezzel kondenzáltabb kromatinállapotra és alacsonyabb transzkripció aktivitásra utalva.

Az ARID1A funkcionális szerepét a ZG16B szuppressziójában siRNS-alapú csendesítéssel igazoltuk. ARID1A hiányában a bexarotene és carvedilol kombináció ZG16B-expressziót csökkentő hatása visszafordítható volt, míg jelenlétében a ZG16B szuppressziója a kombinált kezelésre specifikus jelenségnek bizonyult. Eredményeinket MMTV-ErbB2 transzgenikus egérmodell normál emlőszövetében immunhisztokémiai módszerrel is validáltuk, ahol a kombináció *in vivo* környezetben is csökkentette a ZG16B fehérjeszintjét.

Ezek az adatok együttesen azt mutatják, hogy klinikailag már alkalmazott, ismert toxicitás-profillal rendelkező hatóanyagok kombinációjával egy ARID1A-függő epigenetikai szabályozási csomópont célozható, amely a ZG16B expressziójának gátlásán keresztül már az emlődaganatkialakulás korai szakaszában képes befolyásolni tumorprogresszióhoz kapcsolódó folyamatokat. A ZG16B, amelyet korábban Pancreatic Adenocarcinoma Upregulated Factor (PAUF) néven írtak le, egy szekretált, lektinszerű fehérje, amelynek cukorkötő tulajdonságai révén feltehetően glükózaminoglikánokhoz kötődik. Funkcionális szerepét elsősorban pancreas ductalis adenocarcinómában tárták fel, ahol fokozott expressziója miatt került a figyelem középpontjába (Kim et al. 2012). Számos tanulmány igazolta, hogy a ZG16B képes a veleszületett immunválasz sejtjeinek átprogramozására, tumor progressziót promótáló-, gyulladásos- és immunszuppresszív mikrokörnyezet kialakítását elősegítve (Kim et al. 2024; Song et al. 2016). Mechanisztikusan a TLR-jelátvitelen keresztül ERK-aktivációt és tumor progressziót támogató citokin termelést indukál, miközben gátolja az NF- κ B-mediált válaszokat (Park et al. 2011). *In vivo* modellekben a ZG16B fokozza a myeloid eredetű szuppresszor sejtek felhalmozódását, valamint a tumorsejtek migrációját, invázióját és metasztatikus potenciálját, elsősorban CXCR4- és FAK-kapcsolt útvonalakon keresztül (Song et al. 2016).

A ZG16B szerepét más daganattípusokban is leírták. Colorectalis daganatokban például a sejtciklus-szabályozással és a Wnt/ β -katenin útvonallal mutat összefüggést (Escudero-Paniagua et al. 2020). Klinikai szempontból a ZG16B prognosztikus biomarkerként is releváns lehet, mivel több daganatban, köztük emlőrákban is gyakran emelkedett expressziót mutat. Emlőtumorok esetén ugyanakkor paradox módon a magas ZG16B-expresszió kedvezőbb túléléssel társult (Lu et al. 2020). Terápiás vonatkozásban kimutatták továbbá, hogy pancreas daganatban a ZG16B gátlása fokozza a gemcitabin iránti érzékenységet, ami a gyógyszerrezisztencia kialakulásában betöltött szerepére utal (Cho et al. 2017). Emellett a tumor által szekretált, keringő ZG16B cachexia kialakulását is előidézheti, így a szisztémás daganat-asszociált szövődmények egyik mediátorának tekinthető (Yoo et al. 2021).

Eddigi ismereteink alapján a ZG16B tumorbiológiai jelentőségét elsősorban a daganatprogresszió késői folyamataival összefüggésben vizsgálták. Ezzel szemben jóval kevesebb adat áll rendelkezésre a daganat-iniciáció korai eseményeiben betöltött szerepéről, illetve arról, hogy normál szöveti környezetben miként befolyásolja a sejtműködést. Ez különösen igaz az

emlőszövetre, ahol a ZG16B funkcionális karakterizálása nem transzformált és emlőtumorsejtekben mindeddig elmaradt.

A ZG16B leggyakrabban leírt funkcionális hatása a tumorsejtek migrációjának és inváziós kapacitásának fokozása, valamint a metasztatikus terjedés támogatása (Park et al. 2011; Youn et al. 2022). Ennek megfelelően megvizsgáltuk, hogy emlő epithel sejtekben és különböző emlőtumor sejtvonalakban milyen mértékben és milyen jelátviteli mechanizmusokon keresztül befolyásolja a ZG16B a sejt migrációt. Eredményeink alapján, a proliferációs válaszkóttól eltérően, hormon receptor-státusztól függetlenül valamennyi vizsgált emlő eredetű sejt vonalban markáns motilitást fokozó hatást tapasztaltunk ZG16B kezelés hatására. Emellett a bexarotene és carvedilol kombinációval kiváltott migrációgátló hatást a ZG16B képes volt részben visszafordítani, ami arra utal, hogy a ZG16B funkcionálisan hozzájárulhat a kemopreventív kombináció migrációt gátló hatásához.

Irodalmi adatok alapján a ZG16B migrációt és inváziót serkentő hatása elsősorban a TLR-kapcsolt ERK 1/2–MAPK jelátvitelhez, a CXCR4-mediált kemotaxisához, valamint a FAK–Src és PI3K–Akt útvonalak aktivációjához köthető (Lee et al. 2011; Park et al. 2011). Ennek fényében elemeztük az ERK 1/2, Src és Akt jelátviteli elemek foszforilációs állapotát ZG16B kezelés hatására. A kapott válaszok sejt vonalanként eltérőek voltak. Az Akt aktiválódása minden vizsgált sejt vonalban megfigyelhető volt, míg az ERK 1/2 aktivációja csak normál epithel sejtekben és ER-pozitív T47D sejtekben jelent meg. Normál sejtekben emellett az Src aktiválódását is detektáltuk, amelyre a gátló hatású foszforiláció (p-Tyr527) mértékének csökkenéséből következtettünk.

A három vizsgált jelátviteli elem közül egyedül az Akt aktivációja mutatott teljes összhangot a migrációs eredményekkel. A két jelenség közötti kapcsolat vizsgálata során PI3K-gátlás mellett mértük a ZG16B migrációra gyakorolt hatását. Normál epithel sejtekben és tripla negatív emlőtumor sejtekben PI3K-inhibitor jelenlétében a ZG16B sem a migrációt, sem az Akt foszforilációját nem volt képes fokozni. Ezek az eredmények egyértelműen arra utalnak, hogy emlősejtekben a ZG16B által kiváltott migrációfokozó hatás elsődlegesen a PI3K–Akt jelátviteli útvonal aktivációján keresztül valósul meg.

A ZG16B által kiváltott válaszok átfogóbb jellemzésére RNS-szekvenálást végeztünk kezelt HME-hTert sejteken. Az eredmények nagyrészt megerősítették a korábbi megfigyeléseinket. A differenciáltan expresszált gének között megjelentek a fokális adhézió kialakításában, az aktin-citoskeleton szabályozásában és a PI3K–Akt jelátviteli útvonal működésében szerepet játszó gének, ami összhangban áll a ZG16B PI3K–Akt tengelyen keresztül megvalósuló migrációt fokozó hatásával normál emlő epithel sejtekben. Emellett fokozódott több, az extracelluláris mátrix (ECM) által közvetített jelek feldolgozásában érintett gén expressziója is. Ezek a transzkriptomikai változások szoros párhuzamot mutatnak korábbi, hasnyálmirigy-daganatsejtekben leírt adatokkal, ahol a ZG16B tumorprogressziót, inváziót és metasztázisképzést támogató génextpressziós programok aktivációjával társult (Park et al. 2011). Mivel korábbi kísérleteinkben a bexarotene és carvedilol kombinációja által kiváltott antiproliferatív és migrációt gátló hatást a ZG16B képes volt részben kompenzálni, összehasonlítottuk a két kezelés által kialakított transzkripciós profilokat. Az összehasonlítás során jelentős számú olyan gén volt azonosítható, amelyek ZG16B hatására indukálódtak, míg a bexarotene és carvedilol kombinációja hatására szuppresszáálódtak. Ezen gének között számos, az ECM átrendezésében, a sejt–ECM kapcsolatok kialakításában és a migráció szabályozásában kulcsszerepet játszó faktor emelkedett ki, köztük a FN1, a PLEC, valamint a több laminin- és kollagénné mátrix komponens. Ezek a változások arra utalnak, hogy a ZG16B nem izoláltan egy-

egy mátrixkomponenst szabályoz, hanem egy komplex, összehangolt mátriszóma-átalakulást indít el, amely strukturálisan és funkcionálisan is támogatja a fokozott sejtmigrációt.

Az emlődaganatok mikrokörnyezetében a mátriszóma újrászerveződése alapvetően meghatározza a sejtek viselkedését. A tumor progresszió során az extracelluláris mátrix összetétele és szerkezete jelentősen átalakul, fokozott kollagén-, fibronectin- és proteoglikán-depozíció, a rostok megvastagodása és keresztkötéseik növekedése révén (Insua-Rodríguez and Oskarsson 2016; Popova and Jücker 2022). Ezek a változások a szövet merevségének progresszív növekedéséhez, a mátrix topográfiájának rendezettebbé válásához és inváziót elősegítő migrációs útvonalak kialakulásához vezetnek. A megváltozott mátrix biomechanikai következményei, így a fokozott szöveti stressz és intersticiális nyomás, perfúziós zavarokat és hypoxiát idézhetnek elő, valamint gátolhatják a terápiás ágensek szöveti penetrációját (Schwartz 2010).

A sejtek ezt a megváltozott mechanikai környezetet aktívan érzékelik, és mechanoszenzitív jelátviteli válaszokká alakítják át. A fokozott merevség az integrin-mediált adhéziót, fokális adhéziók és a citoskeletális kontraktilitás kialakulását segíti elő, amelyek proliferációt, túlélést és invazív fenotípus kialakítását támogató útvonalakat aktiválhatnak (Schwartz 2010). Vizsgálataink szempontjából különösen jelentős, hogy a ZG16B hatására normál emlő epithel sejtekben is megindult az extracelluláris mátrix komponensek fokozott deposíciója, ami arra utal, hogy a ZG16B még nem malignus állapotban is képes a stromális és mechanikai mikrokörnyezet áthangolására. Ez a korai mátrix átalakítás a szövet merevségének és feszültségi állapotának megváltoztatásán keresztül olyan mechanoszenzitív programok aktiválását indíthatja el, amelyek később a tumorprogressziót és az invazív viselkedést is elősegíthetik.

Az extracelluláris mátrix szerkezeti és biomechanikai változásai gyakran együtt járnak az epitheliális–mesenchymális átmenet irányába történő elmozdulással (Brandão-Costa et al. 2020). Bár az EMT klasszikusan a TGF- β jelátvitelhez köthető, normál epithel sejtekben fiziológiás, reverzibilis formában is megjelenhet például a sebgyógyulás folyamata során (Yao et al. 2024). Mivel ZG16B hatására a mátriszóma átrendeződése mellett mesenchymális markerek, köztük a FN1 expressziója is fokozódott, megvizsgáltuk az EMT-vel összefüggő változásokat. Eredményeink alapján ZG16B jelenlétében mind normál emlő epithel, mind emlőtumor sejtekben EMT irányába mutató transzkripció és morfológiai változások voltak kimutathatók. Ezzel összhangban, MMTV-ErbB2 transzgen egerekből származó tumormentes emlőszövetekben a bexarotene és carvedilol kombinációjának hatására a csökkent ZG16B-szint mellett, a FN1 mesenchymális marker expressziója is mérséklődött.

Korábbi vizsgálatok alapján az epitheliális–mesenchymális átmenet és a mátriszóma átfogó újrászerveződése elősegítheti a konvencionális kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia kialakulását. Tekintettel arra, hogy a ZG16B mind az EMT-folyamatokat, mind az extracelluláris mátrix átalakítását képes befolyásolni, potenciális biomarkerként szolgálhat az invazív fenotípus és a terápiás rezisztencia előrejelzésére. Ezt a koncepciót alátámasztja az a megfigyelés is, hogy hasnyálmirigy-daganatsejtekben a ZG16B szuppressziója fokozta a gemcitabine iránti érzékenységet, ami arra utal, hogy a ZG16B által közvetített programok a gyógyszerrezisztenciában is szerepet játszhatnak (Cho et al. 2017).

Az EMT-hez társuló sejtplaszticitás és az ECM-remodelling lehetővé teszi, hogy a tumorsejtek adaptív előnyre tegyenek szert olyan környezetben, ahol a fiziológiás kitapadási feltételek nem adóttak. Ennek vizsgálatára a transzformáltságot mérő soft agar kolóniaképző assay-t alkalmaztuk. Eredményeink szerint a ZG16B jelenléte mind ösztrogén receptor-pozitív, mind hormon receptor-negatív emlőtumorsejtekben fokozta a kolóniaképző képességet, míg a ZG16B-t szuppresszálo bexarotene és carvedilol kombinációja szignifikánsan csökkentette azt. MCF7 sejtekből képzett kolóniákban a transzformáció gátlása mellett a ZG16B expressziójának

csökkenése is kimutatható volt kombinált kezelés hatására. Ezzel összhangban, SCID egerekben, MDA-MB-231 sejtek implantálásával kialakított xenograft tumorszövetekben immunhisztokémiai módszerekkel igazoltuk, hogy a ZG16B expressziója hormon receptor-negatív emlőtumorsejtekben is hatékonyan csökkenthető bexarotene és carvedilol kombinált alkalmazásával. Ezek az eredmények összességében arra utalnak, hogy a ZG16B szabályozása nem csak az emlődaganatok kialakulásának gátlásában, hanem a már kialakult daganatok progressziójának mérséklésében is potenciális terápiás jelentőséggel bírhat.

Eredményeinket összefoglalva, igazoltuk, hogy normál emlő epithel sejtekben a 5-HT antiproliferatív hatása elsősorban a sejtfelszíni receptorokon keresztül, dominánsan az 5-HT₇-adenilát-cikláz-PKA tengely aktivációja révén valósul meg, miközben a sejtekbe jutó 5-HT csökkentése mérsékli az oxidatív stresszt és a DNS-károsodást. Több GPCR család vizsgálata alapján egy általános mintázat rajzolódott ki, melyben a G_s-kapcsolt jelátvitel aktiválása, valamint a G_i- és G_q-kapcsolt útvonalak gátlása következetesen proliferáció csökkenéshez vezet. A vizsgálatok értelmezését ugyanakkor módszertani és koncepcionális limitációk is befolyásolják. A 5-HT intra- és extracelluláris hatásainak teljes elkülönítése technikailag korlátozott volt, továbbá a receptor-dimerizáció és az időfüggő receptor-dominancia váltás mechanizmusainak vizsgálatát eddig még nem volt lehetőségünk elvégezni. A farmakológiai hatásokat elsősorban normál emlő epithel sejtekben elemeztük, amely ugyan a kemoprevenció szempontjából releváns megközelítés, de a tumorspecifikus altípusfüggő különbségek feltárása további vizsgálatokat igényel.

Kiemelt klinikai jelentőséggel bír, hogy a szerotonin jelátvitel modulációja jelenleg is klinikai használatban lévő SSRI-kkel megvalósítható, és ezek kombinációja a rexinoid bexarotene-nel alacsony dózisok mellett szinergikus antiproliferatív hatást eredményezett. A kombinációs stratégiák molekuláris hátterének feltárása során azonosítottuk a ZG16B-t mint központi, epigenetikailag szabályozott effektort, amelynek ARID1A-függő szuppressziója nem csak a proliferációt, hanem az EMT-hez, a mátriszóma-átalakuláshoz és a sejtmigrációhoz kapcsolódó invazív fenotípust is gátolja normál emlő epithel és emlőtumor sejtekben. Eredményeink alapján a ZG16B potenciális prognosztikus biomarkerként és terápiás célpontként is értelmezhető, mivel szerepet játszhat a daganatok invazív viselkedésének és progressziós kockázatának meghatározásában.

Összességében eredményeink új kutatási irányokat nyitnak meg a szerotonin jelátvitel, a GPCR-alapú kemoprevenció és a ZG16B-hez kapcsolt tumorbiológiai folyamatok vizsgálatában. A jövőben különösen ígéretes lehet a molekuláris altípusokra szabott, GPCR-expressziós profilra épülő preventív stratégiák kidolgozása, a vizsgálatok kiterjesztése új generációs sejt kultúrák modellekre és állatmodellekre, valamint a ZG16B klinikai mintákban történő validálása prognosztikus biomarkerként és terápiás célpontként.

Összefoglalás

Jelen doktori kutatás rávilágított arra, hogy a monoamin G-fehérje-kapcsolt receptorok (GPCR) jelátvitel egy eddig alulértékelt, ugyanakkor biológiailag és transzlációs szempontból is releváns célpontot jelent az emlőrák kemoprevenciójában. Bár a monoamin receptor modulátorok, beleértve a β -adrenerg receptor blokkolókat, antidepresszánsokat és antihisztaminokat, széles körben alkalmazott gyógyszerek a klinikai gyakorlatban, szerepük az emlőtumorsejtek biológiájában mindaddig nem került megfelelően feltárára. Eredményeink betekintést nyújtanak abba, hogy

ezen jelátviteli útvonalak modulációja miként befolyásolja a normál emlő epithel sejtek osztódását.

Megállapítottuk, hogy a szerotonin jelátvitel aktiválása antiproliferatív hatást fejt ki normál emlő epithel sejtekben. Ezek a hatások elsősorban sejt felszíni receptorokon keresztül valósulnak meg. A szerotonin transzporter paroxetinnel történő gátlása csökkenti az intracelluláris 5-HT szintet, ami az oxidatív stressz és a DNS-károsodás mérséklődéséhez vezet, miközben fokozza az extracelluláris receptor-mediált jelátvitelt. Vizsgálataink igazolták, hogy az antiproliferatív válasz döntően az 5-HT₇ receptor aktivációján és az ahhoz kapcsolódó adenilát-cikláz–cAMP–PKA jelátviteli tengelyen keresztül valósul meg. Ezzel párhuzamosan a G_i- és G_q-kapcsolt jelátviteli útvonalak gátlása tovább erősíti ezt a hatást. Ugyanakkor, vizsgálataink során arra is rámutattunk, hogy ezek az eredmények túlmutatnak a szerotonin jelátvitelén. Több GPCR receptorcsaládon keresztül, beleértve az adrenerg, hisztaminerg, dopaminerg és muszkarin receptorokat, egy egységes mintázat rajzolódott ki. A G_s-kapcsolt jelátvitel aktivációja, valamint a G_i- és G_q-mediált útvonalak gátlása csökkenti a sejte proliferációját.

Ezután megvizsgáltuk a monoamin jelátviteli modulátorok és a rexinoid alapú kemoprevenció kombinációjának lehetőségét. A rexinoid bexarotén, amely egy ismert preventív hatású szer, szinergiát mutatott paroxetinnel, illetve közvetlenül szerotoninnal kombinálva. Ezek a kombinációk emlő epithel sejtekben szinergista antiproliferatív hatást eredményeztek, alátámasztva az alacsony dózisé, potenciálisan preventív stratégiák megvalósíthatóságát klinikailag már alkalmazott hatóanyagokkal. A szinergia molekuláris mediátorainak azonosítása céljából transzkriptomikai és epigenetikai vizsgálatokat végeztünk. Ezek során a ZG16B több rexinoid alapú szinergikus kombináció által is közösen szabályozott célpontként került azonosításra. A ZG16B expressziója szignifikánsan csökkent bexarotene és carvedilol kombinációs kezelés hatására, és kimutattuk, hogy ez a hatás az ARID1A-t tartalmazó SWI/SNF kromatin-remodelling komplexhez kötött. Igazoltuk, hogy a ZG16B gátlása hozzájárul a kombinációk antiproliferatív és migrációt gátló hatásaihoz.

További vizsgálatok során a ZG16B-t a több tumorigenezishez és tumor progressziót elősegítő folyamat központi szereplőjeként karakterizáltuk. Exogén ZG16B fokozta a sejt migrációt, epitheliális–mesenchymális átmenethez (EMT) társuló transzkripció és morfológiai változásokat indukált mind normál emlő epithel, mind emlődaganat sejtekben. Normál emlő epithel sejtekben a ZG16B elősegítette az extracelluláris mátrix (ECM) átrendeződését, mely a tumorok kialakulásának egyik jellemző kezdeti lépése. Migrációt fokozó hatása elsősorban a PI3K–Akt jelátviteli útvonal aktivációján keresztül valósult meg. Emellett a ZG16B növelte a tumoros transzformációs potenciált. Ezzel szemben azok a farmakológiai kombinációk, amelyek gátolták a ZG16B-t, csökkentették ezeket a tumor-promótáló tulajdonságokat *in vitro* és *in vivo* egyaránt.

Összességében munkánk egy új kemoprevenációs stratégiát állított fel, amelyben a monoamin GPCR jelátvitel modulációja, különösen a G_s-kapcsolt útvonalak aktiválása és a G_i- illetve G_q-jelátvitel gátlása révén, csökkenti a proliferációt normál emlő epithel sejtekben. A monoamin

modulátorok és rexinoidok közötti szinergia rámutat arra, hogy klinikailag már alkalmazott gyógyszerek alternatív újra felhasználása jelentős transzlációs potenciállal bír preventív alkalmazásokban. A ZG16B epigenetikailag szabályozott effektorként való azonosítása pedig magyarázatot ad arra, hogy ezek a kombinációk miként befolyásolják a tumorbiológiához kapcsolódó sejtes programokat, beleértve a migrációt, az EMT-t és a mátrix átrendeződést.

A jövőbeni kutatási irányok közé tartozik a GPCR expressziós mintázatokon alapuló, molekuláris altípus-specifikus preventív stratégiák fejlesztése, a ZG16B kifejeződés klinikai mintákban történő validálása, valamint a GPCR ligandok valamint a ZG16B hatásainak további vizsgálata további új kísérletes modellekben. Összességében a bemutatott eredmények hozzájárulnak a korai tumorbiológiai folyamatok mélyebb megértéséhez, és új lehetőségeket nyitnak meg az emlőrák kemoprevenciójára.

Új Eredmények Listája

1. Az emlő epithel sejtek proliferációja gátolható G_s-kapcsolt receptorok aktivációján, valamint a G_i- és G_q-kapcsolt receptorok gátlásán keresztül.

- A monoamin GPCR jelátvitel egy új, releváns kemoprevenziós célpontként került azonosításra emlő epithel sejtekben.
- A szerotonin antiproliferatív hatását elsősorban sejtfelszíni receptorokon keresztül fejt ki, nem pedig intracelluláris mechanizmusokon keresztül.
- A SERT paroxetine-el történő gátlása csökkenti az intracelluláris 5-HT szintet, ami az oxidatív stressz és a DNS-károsodás mérséklődéséhez vezet, miközben fokozza az extracelluláris jelátvitelt.
- A szerotonin antiproliferatív hatása elsősorban az 5-HT₇-G_s-adenilát-cikláz-cAMP-PKA tengelyen keresztül valósul meg.
- A G_s-kapcsolt jelátvitel aktivációja, valamint a G_i- és G_q-kapcsolt receptorok gátlása receptorcsaládtól függetlenül következetesen csökkenti a proliferációt.

2. A szinergikusan antiproliferatív monoamin receptor modulátor-rexinoid kombinációk ARID1A-függő módon szuppresszálják a ZG16B kifejeződését normál emlő epithel sejtekben.

- A bexarotén szerotoninerger modulátorokkal (paroxetin vagy 5-HT) kombinálva szinergikus antiproliferatív hatást fejt ki.
- A bexarotén és 5-HT közötti szinergia SERT gátlás mellett fokozódik, ami a sejtfelszíni receptor-mediált jelátvitel kulcsszerepére utal.
- A ZG16B egy több kombináció által is konzisztensen szuppresszált célpontként került azonosításra.
- A ZG16B szuppressziója ARID1A-függő epigenetikai mechanizmuson keresztül valósul meg, amely a SWI/SNF kromatin-remodelling komplexhez kapcsolódik.
- A ZG16B termelés gátlása *in vivo* is megvalósítható a bexarotén és karvedilol kombinációjával normál és emlőtumor szövetben.

3. A ZG16B szerepének jellemzése normál emlőszövetben és emlődaganatokban.

- A ZG16B képes tumorsejtekre jellemző folyamatokat indukálni mind normál emlő epithel sejtekben, mind emlődaganat sejtekben.
- A ZG16B fokozza a sejtmigrációt, EMT-t indukál, valamint növeli a transzformációs potenciált.
- A migrációt fokozó hatása elsősorban a PI3K–Akt jelátviteli útvonalon keresztül valósul meg.
- A ZG16B indukálja az extracelluláris mátrix átrendeződését nem malignus emlő epithel sejtekben.



Nyilvántartási szám: DEENK/63/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lengyel Máté
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10077908

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lengyel, M.**, Árkosy, P., Uray, I. P.: G protein subtype preference dictates paroxetine-enhanced serotonin receptor response in non-malignant breast epithelial cells.
Biochem. Pharmacol. 244, 1-16, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2025.117584>
IF: 5.6 (2024)
2. **Lengyel, M.**, Molnár, Á., Nagy, T., Jdeed, S., Garai, I., Horváth, Z., Uray, I. P.: Zymogen granule protein 16B (ZG16B) is a druggable epigenetic target to modulate the mammary extracellular matrix.
Cancer Sci. 116 (1), 81-94, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/cas.16382>
IF: 4.3 (2024)

További közlemények

3. Vaiciuleviciute, R., Alaburda, A., Uzielienė, I., Kistamás, K., **Lengyel, M.**, Dinnyés, A., Bergaud, C., Bernotiene, E.: Biomimetic electrospun scaffolds for engineered heart tissue: from design parameters to drug testing platforms.
Front. Bioeng. Biotechnol. 14, 1-26, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2026.1711698>
IF: 4.8 (2024)





**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

4. Jdeed, S., **Lengyel, M.**, Uray, I. P.: Redistribution of the SWI/SNF Complex Dictates Coordinated Transcriptional Control over Epithelial-Mesenchymal Transition of Normal Breast Cells through TGF- β Signaling.
Cells. 11 (17), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells11172633>
IF: 6

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20,7

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 9,9

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2026.02.16.

