

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Az angiogenezis markerek és a miRNS-ek kapcsolatának tanulmányozása vesetumoros betegek mintáin, valamint az angiogenezis útvonalakkal kapcsolatos terápiás célpontok keresése a humán CAKI-2 és az A-498 vesedaganat sejtvonalakon végzett in vitro vizsgálatok segítségével

Király József

Témavezető: Dr. Szabó Zsuzsanna



DEBRECENI EGYETEM
Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola
Debrecen, 2024

Az angiogenezis markerek és a miRNS-ek kapcsolatának tanulmányozása vesetumoros betegek mintáin, valamint az angiogenezis útvonalakkal kapcsolatos terápiás célpontok keresése a humán CAKI-2 és az A-498 vesedaganat sejtvonalakon végzett in vitro vizsgálatok segítségével

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
a gyógyszerészeti tudományágban

Írta: Király József okleveles Biotechnológus

Készült a Debreceni Egyetem Gyógyszerészeti Tudományok doktori iskolája
(Farmakológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Szabó Zsuzsanna, PhD

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet, MTA doktora

Dr. Gombos Katalin, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Majoros László, PhD

tagok: Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet, MTA doktora

Dr. Gombos Katalin, PhD

Dr. Berczi Csaba, PhD

Dr. Gáspár Róbert, PhD

Az értekezés védésének időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2025. március 28. 13:00.

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	4
II. Célkitűzés.....	6
III. Anyagok és módszerek.....	7
III.1. A klinikai szövetminták gyűjtése	7
III.2. Sejtkultúrák.....	7
III.3. Vegyületek	7
III.4. Sejtproliferációs aktivitás detektálása	7
III.5. A sejtek kolóniaképző képességének a vizsgálata	8
III.6. A kaszpáz-3 és -7 aktivitásának vizsgálata	8
III.7. RNS izolálás és minőségének meghatározása	9
III.8. Az RNS izolálása a CAKI-2 és A-498 sejtekkel végzett in vitro vizsgálatainkhoz.....	9
III.9. Reverz-transzkripció PCR (RT-PCR)	9
III.10. A mikroRNS (miRNS)-ek expressziójának mérése specifikus stem-loop primerek segítségével	9
III.11. A miRNS-ek azonosítása TaqMan assay alapú valós-idejű kvantitatív PCR-el, statisztikai analízis	10
III.12. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)	11
III.13. In silico miRNS analízis target és útvonal meghatározáshoz.....	11
III.14. Az angiogenesis array kivitelezéséhez szükséges szöveti fehérje lizátumok elkészítése	11
III.15. Fehérjék detektálása Western blot technikával	12
III.16. Statisztikai analízis.....	12
IV. Eredmények	14
IV.1. A betegek klinikopatológiai jellemzői	14
IV.2. Az angiogenesishez kapcsolódó miRNS-ek expressziója.....	14
IV.3. A vizsgált miRNS-ek és a patológiai grádusok közötti összefüggés.....	14
IV.5. In silico miRNS target adatbázis elemzés	15
IV.6. Az angiogenesis array-el kapott eredmények értékelése.....	15
IV.7. Valós idejű qRT-PCR –el kapott eredmények	16
IV.8. A shikonin dózis- és időfüggő módon gátolja a sejtek proliferációját.....	16
IV.9. A shikonin által indukált apoptózis a CAKI-2 és az A-498 humán vesedaganat sejtvonalakon	17

IV.10. A shikonin hatása az apoptózisra és a tumorszuppresszor gének kifejeződésére	18
IV.11. A MAPK/PI3K útvonalak szerepe a shikonin által indukált apoptózisban ...	18
IV.12. A shikonin hatása a multidrog-transzporter gének expressziójára	19
IV.13. A shikonin hatása az extracelluláris mátrix fehérjék expressziójára	19
IV.14. A shikonin hatása a miR-21 és a miR-155 expressziójára.....	20
V. Összegzés.....	21

I. Bevezetés

A vesesejtes karcinóma (RCC) felnőtteknél a vese leggyakoribb daganatos megbetegedése, az összes rosszindulatú daganat körülbelül 3%-át teszi ki, valamint a legmagasabb, 40%-ot meghaladó halálozási rátával rendelkezik. A diagnózis felállításakor az RCC-ben szenvedő betegek körülbelül 20-30%-ában alakul ki metasztázis, továbbá a lokalizált RCC esetén végzett kuratív műtét után, a betegek újabb 30%-ában jelennek meg áttétek az utókövetéses vizsgálatok során. A jelenlegi rendszer, amely a vesekarcinómával diagnosztizált betegek prognózisának előrejelzésére használnak nem jósolja meg pontosan a betegség kimenetelét, ezért szükség van olyan új molekuláris biomarkerek felkutatására, amelyek a jövőben használhatók lehetnek a betegség korai diagnosztizálására.

A mikroRNS-ek konzervált, kis méretű (18-22 nukleotid), nem kódoló RNS-ek, amelyek a génextpresszió szabályozása révén fontos szerepet játszanak a különböző molekuláris útvonalak szabályozásában. Stabil mikrovezikulák formájában, apoptotikus testekben vagy membránmentes hordozókban megjelenő, a humán testnedvekben található miRNS-ek diagnosztikai biomarker szerepet játszhatnak, és jelezhetik a daganatos megbetegedéseket. Az expressziós profilok alapján a miRNS-ek indikátorai lehetnek a daganatos és normál szövetek megkülönböztetésében, sőt a daganatok szövettani típus szerinti osztályozásában is szerepük van. Képesek egyensúlyt teremteni a pro- és antiangiogén folyamatok között, valamint módosítani az angiogenezis eseményeinek lefolyását. A szakirodalom alapján a miRNS-ek potenciális terápiás célpontok lehetnek a patológiás neovaszkularizációval összefüggő betegségek kezelésében, mivel számos útvonalat befolyásolnak. Míg korábbi tanulmányok illusztrálták a miRNS-ek szerepét a vesedaganatokban, sok funkciójuk nem teljesen ismert.

A tirozin-kináz-inhibitorok, a sunitinib, a sorafenib, a temsirolimus valamint a bevacizumab javították a klinikai eredményeket randomizált vizsgálatokban. Azonban léteznek olyan újonnan felfedezett molekulák, amelyek hatékonyak a vesedaganatok terápiájában, és segíthetnek leküzdeni a gyógyszerekkel szembeni rezisztenciát, ami kritikus a sikeres terápia szempontjából.

A shikonin a *Lithospermium erythrorhizon* kínai gyógynövény gyökereiből izolált hatóanyag, amely számos humán daganatos sejtvonalal szemben bizonyult hatékonynak in vitro és in vivo, minimális toxicitás mellett az ép humán sejtekre. A shikonin apoptózist, nekrozist vagy nekroptózist indukál különböző sejtvonalakban, jelátviteli útvonalak és

molekuláris célpontok szabályozásán keresztül, valamint hasonló hatást mutat a gyógyszerérzékeny és gyógyszer-rezisztens daganatos sejtvonalakkal szemben is.

Egyes vizsgálatok kimutatták, hogy a shikonin potenciális terápiás szerként alkalmazható humán glioblastóma kezelésére, a miRNS expressziós profilok szabályozásával. A legújabb bizonyítékok szerint a miR-21 szerepet játszik a humán daganatok kialakulásában és progressziójában. A miR-155 fokozottan expressziót mutat számos daganat esetében, ami ezen miRNS onkogén szerepére utal. Korábbi vizsgálatok beszámoltak a miR-155 kiemelkedő szerepéről a világossejtes vesesejtes karcinóma progressziójában.

A shikonin, mint a vesekarcinóma potenciális terápiás vegyülete izgalmas és érdekes témává vált, azonban a daganatos vesesejtekre gyakorolt hatását és daganatellenes mechanizmusát még nem vizsgálták alaposan.

II. Célkitűzés

Kísérleteink során célul tűztük ki a hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-99b-5p, hsa-miR-181a-5p és más angiogenezissel kapcsolatos gének expressziójának vizsgálatát az RCC-ben szenvedő betegek tumoros és egészséges ép veseszöveiteiben. Célunk volt továbbá, hogy meghatározzuk az említett miRNS-ek szerepét a vesedaganatok angiogenezisében, valamint az RCC prognózisában. Statisztikai módszereket alkalmazva korreláltuk a vizsgált miRNS-ek expressziós mintázatait klinikopatológiai paraméterekkel (klinikai stádium, hisztológia), továbbá vizsgáltuk a miRNS-ek és célpontjaik közötti kölcsönhatásokat, melyek a vese angiogenezis folyamataiban vesznek részt.

A shikonin vesedaganat sejteken kifejtett hatását és daganatellenes mechanizmusát még nem vizsgálták alaposan. Ezért célunk az volt, hogy megvizsgáljuk, a shikonin önmagában képes-e gátolni a humán vesedaganat sejtek növekedését in vitro. Feltételezésünk szerint egyes erős onkogén miRNS-ek epigenetikai szabályozást gyakorolhatnak a folyamatra, ezért célunk volt a shikonin miR-21 és a miR-155 expressziójára kifejtett hatásának vizsgálata a két humán vesedaganat sejtvonalon, in vitro. Szándékunkban állt továbbá leírni a shikonin hatását az apoptotikus útvonalakban részt vevő génekre, amelyek a daganatos sejtek halálához vezetnek.

III. Anyagok és módszerek

III.1. A klinikai szövetminták gyűjtése

Az angiogenezissel és a miRNS-ekkel kapcsolatos vizsgálatainkat a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján 20 vesetumoros betegből származó tumoros/ép vese-szövetmintán végeztük. A tumorok primer daganatokból származtak, metasztázisra utaló jel a vizsgált betegcsoporton belül nem mutatkozott. A daganatok a Nemzetközi Rákellenes Unió (UICC) TNM stádium rendszere alapján lettek osztályozva, a szövettani fokozatok az Egészségügyi Világszervezet kritériumai szerint határoztuk meg. A tumorsejtek helyi invázióját T-staging segítségével értékeltük, és a nyirokrendszeri állapotot pozitívnak vagy negatívnak rögzítettük. A mintagyűjtést követően a szöveteket azonnal lefagyasztottuk folyékony nitrogénben, és -80°C -on tároltuk a további feldolgozásig.

III.2. Sejtkultúrák

Az *in vitro* kísérleteinket az A-498 és CAKI-2 humán vesedagant sejtvonalakkal végeztük, melyek az American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD, USA) gyűjteményből származtak. A sejteket Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) tápközegben tenyésztettük, amelyet 10% FBS (fetal bovine serum) és antibiotikumok (100 U/mL penicillin és 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin) egészítettek ki. Mindkét sejtvonalat 37°C -on, párasított atmoszférában, 5% CO_2 mellett működő termosztátban tartottunk.

III.3. Vegyületek

A shikonint és a sunitinibet (tisztaság $> 98\%$) a Santa Cruz Biotechnology-től (Dallas, TX, USA) vásároltuk, DMSO-ban oldottuk, és porciók formájában tároltuk -20°C -on. A sejtproliferációs vizsgálat során a vegyületeket 2,5 és 40 μM között alkalmaztuk. Minden kísérletben DMSO-t használtunk vivőanyagként. A további sejtenyésztési kísérletekben felhasznált hatóanyagok koncentrációját a sejtproliferációs görbék alapján optimalizáltuk.

III.4. Sejtproliferációs aktivitás detektálása

A sejtproliferációs vizsgálatához a Cell Titer Blue Assay-t (Promega, Madison, WI, USA) használtuk. A vizsgálatához az A-498 és CAKI-2 sejteket (10^4 /sejt) 96-lyukú plate-ekre helyeztük, minden sejtet a teljes IMDM növekedési médiumában tenyésztettünk 24 órával a kísérletek előtt. Másnap a médiumot eltávolítottuk, és helyette a vegyületeket (sunitinib vagy shikonin) növekvő koncentrációban tartalmazó médiumot használtunk a dózis-hatás

analízishez. A kezelések után a sejteket tovább inkubáltuk a vegyületekkel 72 órán keresztül 37 °C-on, 5% CO₂-t tartalmazó sejtkubátorban. A sejtek életképességét 24 óránként mértük, a sejtekhez Cell-Titer Blue reagenst (Promega) adva, a plate-eket 2 órán át inkubáltuk 37 °C-on sejttenyésztő inkubátorban. A fluoreszcencia intenzitást BioTek Plate Reader rendszer (BioTek, Winooski, VT, USA) segítségével mértük.

III.5. A sejtek kolóniaképző képességének a vizsgálata

A vizsgálatot A-498 és CAKI-2 sejteken végeztük el sunitinib és shikonin kezelés hatására. A sejtszuspenziók előkészítése után a sejteket 6-lyukú plate-re mértük szét ($3-5 \times 10^3$ sejt/well), amit egy éjszakán át tartó inkubálás követett. Másnap a sejteket a shikonin (1–20 µM) vagy a sunitinib (2,5–40 µM) különböző koncentrációit tartalmazó oldataival kezeltük, mely koncentrációkat a sejtproliferációs eredmények alapján választottuk ki. A kontroll csoport sejtjeit 0,01% DMSO-t tartalmazó médiumban növesztettük. Ezt követően a sejteket 14 napig hagytuk növekedni, a kezeléshez alkalmazott szert tartalmazó IMDM médiumot minden harmadik napon frissre cseréltük. A 14 napos inkubációt követően a médium eltávolításával állítottuk le a kísérletet, a sejteket óvatosan mostuk foszfát-pufferes sóoldattal (PBS: Phosphate Buffer Saline), majd ezt egy metanol: ecetsav (3:1 arányú) oldattal történő fixálást követte. Az így fixált sejteket 0,1% -os kristályibolya oldattal festettük (Crystal Violet, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A kolóniák spektrofotometriásan történő kvantifikálásához a sejteket 2% nátrium-dodecil-szulfát (SDS: Sodium-Dodecyl-Sulfate) oldatban reszuszpendáltuk, aminek az abszorbanciáját a Biotek plate - reader rendszerrel (BioTek, Winooski, VT, USA) detektáltuk.

III.6. A kaszpáz-3 és -7 aktivitásának vizsgálata

A kaszpáz-3 és a kaszpáz-7 aktivitást a Caspase-Glo 3/7 teszttel (Promega, Madison, WI, USA) mértük, a gyártó által előírt utasításoknak megfelelően. A vizsgálatához a CAKI-2 és A-498 sejtek 10^4 /ml mennyiségnek megfelelő sejtszuspenziókat 96-lyukú plate-ekre mértünk, majd a kezeléshez a shikonint növekvő koncentrációkban (2,5–10 µM) alkalmaztuk. A kezelést 48 óra elteltével állítottuk le, majd friss médiumot mértünk a 96 lyukú plate minden egyes well-jébe. Ezután a sejteket 25 µL Caspase-Glo® reagenssel lizáltuk, majd a plate-eket szobahőmérsékleten 30 percig rázattuk. A lizátumból 100 µL-t áthelyeztünk egy 96-lyukú (fehér színű műanyag) plate-re, a lumineszcenciát BioTek plate-reader (BioTek, Winooski, VT, USA) segítségével 490 nm mértük.

III.7. RNS izolálás és minőségének meghatározása

Az angiogenezis és miRNS vizsgálatainkkal kapcsolatos mérésekhez, valamint az in vitro vizsgálatainkhoz teljes RNS-t izoláltunk. A vesetumoros szövettel végzett kísérleteinkhez a totál RNS izoláláshoz a Qiagen RNeasy Mini izoláló kitet (Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) használtuk a gyártó protokollja szerint. Az RNS koncentrációját és tisztaságát a NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg. A molekuláris biológiai vizsgálatok elvégzéséig az izolált RNS mintákat -80 °C-on tároltuk.

III.8. Az RNS izolálása a CAKI-2 és A-498 sejtekkel végzett in vitro vizsgálatainkhoz

Az humán vesedaganat sejtvonalakkal a shikonin kezelést követően több génexpressziós változás mérését is elvégeztük. Ezen gének mRNS-szintű kifejeződésének elemzéséhez az A-498 és a CAKI-2 sejteket növekvő dózisu shikoninnal (2,5–10 μ M) kezeltük 24, 48 és 72 órás inkubációs időtartamokon keresztül, majd a NucleoSpin RNA/Protein kit (Macherey-Nagel, Düren, Németország) felhasználásával totál RNS-t izoláltunk. Az RNS koncentrációját és tisztaságát szintén a NanoDrop ND-1000 spektrofotométerrel (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA) határoztuk meg. A molekuláris biológiai elemzésekig az RNS-t -80 °C-on tároltuk.

III.9. Reverz-transzkripció PCR (RT-PCR)

Az egyes mintákból 250 ng RNS felhasználásával cDNS-t szintetizáltunk a Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, London, UK) segítségével, a gyártó útmutatásai szerint. Az RT-PCR reakciót 20 μ l térfogatban végeztük el véletlenszerű hexamerek használatával. A futtatás minden alkalommal 35 ciklusból állt. A kontamináció tesztelésére a reakció RT-NTC-t is tartalmazott.

III.10. A mikroRNS (miRNS)-ek expressziójának mérése specifikus stem-loop primerek segítségével

A miRNS-elemzések elvégzéséhez az A-498 és a CAKI-2 sejteket növekvő dózisu shikoninnal (2,5–10 μ M) kezeltük 24, 48 és 72 órás inkubációs periódusok alatt, majd teljes RNS-t izoláltunk (Macherey-Nagel, Düren, Németország). Az intracelluláris miRNS-ek, a miR-21 és miR-155 expresszióját miRNS-specifikus Universal ProbeLibrary (UPL) próba alapú stem-loop RT-qPCR módszerrel mértük. A miRNS-ek cDNS-re történő átírását miRNS-specifikus stem-loop-RT primereket (500 nM, Integrated DNA Technologies, Leuven,

Belgium) alkalmazva reverz transzkripcióval végeztük el az erre alkalmas TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével a gyártó leírása alapján. A miRNS-ek kvantifikációját RT-qPCR-rel végeztük, melyhez miRNS-specifikus tervezett forward primert (100 nM, Integrated DNA Technologies), univerzális reverz primert (100 nM, Integrated DNA Technologies) és UPL próbákat (#21, #155: 10 nM, Roche Diagnostics, Mannheim, Németország) használtunk. A polimerizációt a Taq polimeráz (5 U/μL) és dNTP-k (2,5 mM) (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) tették lehetővé.

Az kvantitatív real-time PCR reakciók kivitelezését minden alkalommal három ismétléssel hajtottuk végre a QuantStudio 12 K Flex qPCR műszer segítségével (Applied Biosystems Waltham, Massachusetts, USA). A normalizáláshoz a RNU43 referencia RNS-t használtuk.

III.11. A miRNS-ek azonosítása TaqMan assay alapú valós-idejű kvantitatív PCR-el, statisztikai analízis

A szövetmintákban mért miRNA vizsgálatainkat TaqMan® assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) qRT-PCR segítségével végeztük. A vizsgált mikroRNS-ekhez tartozó komplementer DNS-t (cDNS) totál RNS-ből (5 ng) szintetizáltuk TaqMan® mikroRNS reverz transzkripció reagensok (Invitrogen, Life Technology, Carlsbad, CA, USA) és specifikus reverz transzkripció primerek (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) segítségével, a valós idejű PCR-t pedig TaqMan® próbákkal hajtottuk végre CFX-96 valós idejű PCR-rendszerben (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). Minden assay-t 96 lyukú plate-en triplikátumokban vitezünk ki. Az alkalmazott hsa-miR-ekhez tartozó C_T értékeket az SDS szoftver (v3.1.) alapján kapott automatikus küszöbértékek (threshold baseline) beállításával határoztuk meg. A miRNS-ek normalizálásához a vese szövetekben (ép és tumoros mintákban egyaránt) stabilan expresszáló RNU6-ot használtuk, az adatokat az R statisztikai szoftver segítségével (v.2.14.0, Applied Biosystem, Foster City, Kalifornia, USA) dolgoztuk fel. A triplikátumból nyert C_T értékeket átlagoltuk és az RNU6 geometriai átlagához normalizáltuk, amelyet endogén kontrollként választottunk a geNorm27 és NormFinder alapján (Department of Molecular Medicine (MOMA), Aarhus University Hospital, Aarhus N, Denmark). A normalizált expressziós értékeket $\log_2|2^{-\Delta CT}|$ formában számoltuk ki. A 36-nál nagyobb C_T értékeket a detektálási határ alattinak tekintettük.

III.12. Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR)

Az egyes angiogenezis markerek mRNS szinten történő génexpressziós vizsgálatához valós idejű qRT-PCR-t alkalmaztunk, melyhez az iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) elegyet használtuk. A reakciót egy CFX-96 Real-Time rendszerben (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) hajtottuk végre, 20 µl végső térfogatot alkalmazva. Ezt követően az relatív mRNS expressziós értékeket a C_T értékek alapján határoztuk meg. A három CT értékek átlaga a GAPDH Cp értékére lett normalizálva, amelyet endogén kontrollként választottunk. A normalizált mRNS expressziós értékeket a log₂ (2^{-ΔCT}) formában számítottuk ki.

III.13. In silico miRNS analízis target és útvonal meghatározáshoz

A tanulmányhoz kiválasztott hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-99b-5p és hsa-miR-181a-5p esetében az irodalmi adatok alapján in silico vizsgálatot végeztünk, amely során az miRNS-specifikus célpontokat három adatbázis segítségével hasonlítottuk össze: miRDB, TargetScan és Tarbase. Ennek a folyamatnak a fő célja az angiogenezis jelátviteli útvonalhoz kapcsolódó célfehérjék keresése volt. Az adatbázis-szűrés eredményei alapján azonosítottuk az miRNS-célfehérje kölcsönhatásokat, melyeket a célmolekulákhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalakba soroltunk.

III.14. Az angiogenezis array kivitelezéséhez szükséges szöveti fehérje lizátumok elkészítése

A vizsgálatainkhoz használt 20 vese- és veseszövetminta párok közül 8-8 daganatos és egészséges mintából fehérjét izoláltunk lízis pufferek (Lysis buffer 6 és Lysis buffer 17) segítségével extraháltuk, melyek a Proteome profiler Human Angiogenesis Array Kit (ARY007, Bio-Techne, McKinley, MN, USA) készletben található. A mintákat 4°C-on 30 percig inkubáltuk és rázattuk, majd 14 000 rpm fordulatszámmal 5 percig centrifugáltuk. A minták teljes fehérjetartalmát a Bradford-módszerrel határoztuk meg. Az izolálás és kvantifikálás során a fehérje degradáció elkerülése érdekében a mintákat jégen tartottuk, majd -80 °C-on tároltuk a további vizsgálatokig. Az array alkalmazásakor a Human Angiogenesis Array készletében található membránokhoz 300 µg fehérje extraktumot használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A membránokon elhelyezkedő fehérje pontokat az array-hez mellékelt kemilumineszcens reagens segítségével azonosítottuk. A jel detektálásához a ChemiDoc Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) készüléket használtuk. Az egyes duplikáltan megjelenő array foltok intenzitási értékének meghatározását az Image Lab szoftver

(5.2.1. verzió, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) tette lehetővé az átlagolt intenzitás értékek alapján az átlagolt háttér jelet is figyelembe véve. Az egyes fehérje expresszióban változást mutató értéket a daganatos szövetminták és az ép minták összehasonlításával kaptuk meg.

III.15. Fehérjék detektálása Western blot technikával

A shikoninnal végzett kezelések során célunk volt az egyes, általunk tanulmányozott jelátviteli útvonalak célpont fehérjéinek azonosítása, amelyet Western blot analízis segítségével végeztünk el. Az A-498 és a CAKI-2 vesedaganat sejtvonalakat 5 μ M shikoninnal kezeltük 24, 48 és 72 órán keresztül. A kezelés után a sejteket PBS-sel mostuk és fehérje lízis pufferben (M-PER, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) lizáltuk, amely proteáz- és foszfátáz-inhibitorokat (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmazott. A sejtízátum fehérje mennyiségét Bicinchoninic Acid (BCA) reagenssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) határoztuk meg. A mintákat 4 \times Laemmli pufferrel hígítottuk és 95 °C-on 8 percig forraltuk. Minden alkalommal azonos mennyiségű fehérjéket (40 μ g) vittünk fel 10% vagy 14%-os nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid géltre, és elektroforézissel (SDS-PAGE) futtattuk. A fehérje lizátumokat molekulatömegüknek megfelelően választottuk szét a Precision Plus Protein Kaleidoscope Standard marker (BioRad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA) alapján. A gélekről a fehérjéket egy polivinilidén-fluorid (PVDF) membránra (Millipore, Burlington, MA, USA) transzferáltuk, majd a blottokat specifikus elsődleges antitestek megfelelő hígításával jelöltük. Az elsődleges antitestekkel való inkubációt torma-peroxidáz (HRP)-jelölt anti-egér IgG vagy anti-nyúl IgG másodlagos antitestekkel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) történő inkubálás követte. A jelet kemilumineszcens technikával detektáltuk. A vizsgált minták többségénél a sávintenzitásokat β -aktin vagy hipoxantin-foszforibozil-transzferáz (HPRT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) háztartási fehérjékre normalizáltuk. A pERK esetén a teljes ERK (Cell Signalling, Danvers, MA, USA) jöhetett szóba, mint normalizáláshoz használható háztartási fehérje.

III.16. Statisztikai analízis

Minden, sejtekkel kapcsolatos in vitro kísérletet legalább háromszor végeztünk el. Az átlagértékek kiszámítása és generálása, a hozzájuk tartozó szórás, valamint a normalizálás Microsoft Excel (Office Professional Plus 2016, Microsoft, Redmond, WA, USA) segítségével történt. A statisztikai szignifikanciát kéttényezős varianciaanalízissel (two-way ANOVA) számítottuk ki a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) segítségével.

A TaqMan miRNA assay (Life Technology, Carlsbad, CA, USA) segítségével kvantifikáltuk a hsa-miR-15b-5p, a hsa-miR-99b-5p és a hsa-miR-181a-5p expressziós szintjeit. A statisztikai elemzéshez kéttényezős varianciaanalízist (two-way ANOVA) használtunk a Sidak többszörös összehasonlító tesztek alkalmazva a GraphPad Prism 9.5.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) szoftvert segítségével.

A vesetumoros szövetekben vizsgált egyes miRNS expressziók és a betegek patológiai fokozata közötti kapcsolatot többféleképpen vizsgáltuk, azaz kiugró értékek azonosításával és anélkül. Minden adatsort esetében a változók (expresszió és grádus) közötti korrelációs együtthatót (r) Spearman (nemparaméteresnek ítélt) módszerrel számítottuk ki. A korreláció pontosságát az „ r ” 95%-os konfidencia intervallumával jellemeztük. Amennyiben a korreláció statisztikailag szignifikánsnak bizonyult, lineáris regressziót alkalmaztunk, és annak pontosságát a legjobban illeszkedő egyenes körüli 95%-os konfidenciasávokkal vizualizáltuk. Az 0,05 alatti p értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

IV. Eredmények

IV.1. A betegek klinikopatológiai jellemzői

Minden, a vizsgálatainkban használt szövetminta (N=20) hisztopatológiai vizsgálatnak lett alávetve annak érdekében, hogy a vesetumorer szöveti klasszifikációja, a patológiai grádusonként történő elkülönítése, valamint a minták TNM szerinti besorolása megtörténjen. A patológus által készített leírások, jelentések alapján a tanulmányban használt minták szöveti szempontból az alábbiak szerint voltak osztályozhatók: 16 esetben (78%) ccRCC, 2 esetben (10%) pRCC, chRCC 2 eset (10%). A hisztológiai típuson belül minden szövetet Fuhrman-fokozatok szerint elemezték: a minták 62,5%-át (13 minta) 2-es patológiai grádussal (alacsony fokozatú) osztályozták, 20%-át (4 minta) 1-es grádussal (alacsony fokozatú), valamint a minták 15%-a (3 minta) 3-as grádust (magas fokozatú) mutatott. A vizsgált veseszövetminták közül 8 minta (40%) férfi betegektől, 12 minta (60%) pedig női betegektől származott.

IV.2. Az angiogenesishez kapcsolódó miRNS-ek expressziója

A vizsgált három miRNS mindegyike jelentősen alacsonyabb expressziót mutatott a daganatos mintákban a szomszédos ép szövetekhez képest ($p \leq 0,05$). A legjelentősebb különbség az ép és a tumoros minták esetében a hsa-miR-99b-5p ($p < 0,0001$) és a hsa-miR-180a-5p ($p = 0,0090$) expressziójában volt megfigyelhető.

IV.3. A vizsgált miRNS-ek és a patológiai grádusok közötti összefüggés

A vizsgált miRNS-ek expresszióját a tumoros és az ép mintákban a betegek patológiai státusza szerint elemeztük. Mindhárom vizsgált miRNS esetében az általunk vizsgált mintacsoportban statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt találtunk a miRNS-ek relatív expressziója és a patológiai grádusok között. A korreláció és a statisztikai szignifikancia akkor mutatkozott a legszignifikánsabban és legpontosabban, amikor az outlier azonosításához a $Q = 1\%$ -ot (közepes „agresszivitás”) választottuk. A lineáris regresszióval nyert eredmények megegyeztek a korrelációs elemzés eredményeivel. A Spearman korreláció szerint a vizsgált miRNS-ekhez tartozó, a statisztikai szignifikanciát jelölő p értékek a vizsgált miRNS-enként a következők voltak: a hsa-miR-15a-5p esetében $p=0,033$, a hsa-miR-99b-5p esetében $p < 0,0001$ és a hsa-miR-181a-5p esetében pedig $p = 0,0133$.

IV.4. A vizsgált miRNS-ek és nyirokcsomók közötti korreláció

A betegek többsége negatív nyirokcsomó-státusszal rendelkezett, mivel áttétet nem észleltek. A későbbiekben csupán egy betegnél írtak le regionális nyirokcsomó áttétet, ebből kifolyólag nem figyeltünk meg korrelációt a hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-99b-5p és hsa-miR-181a-5p kifejeződése és a nyirokcsomó státusz között.

IV.5. In silico miRNS target adatbázis elemzés

Három különböző miRNS adatbázis in silico elemzését végeztük el az angiogenezis-specifikus célpontok keresése érdekében, beleértve a miRDB, a Tarbase valamint a TargetScan adatbázisokat, melyekben a hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-99b-5p és hsa-miR-181a-5p potenciális célpontjait azonosítottuk. Az adatbázis-elemzések szerint a hsa-miR-181a-5p esetében 32 közös targetet találtunk, beleértve a VEGF-et, a TIMP-eket és az MMP-eket. Hasonlóan, a hsa-miR-15b-5p esetében a keresésünk 21 validált célmolekulát azonosított, közöttük relevánsnak találtuk a VEGF-et, FGF-1-et és FGFR-1-et. Emellett a hsa-miR-99b-5p esetében a VEGF és a TIMP-ek közösen validált célpontként kerültek azonosításra. Ezek az adatbázis elemzések arra utalnak, hogy mindhárom vizsgált miRNS epigenetikai tényezőként részt vehet a veserák angiogenezisének patológiai folyamatában.

IV.6. Az angiogenezis array-el kapott eredmények értékelése

Az angiogenezis folyamatát érintő legfontosabb markerek szűrésére „proteome profil” analízist alkalmaztunk. A kemilumineszcens detektálást követően az egyes pontok intenzitása mutatta az array-en elhelyezett specifikus, immobilizált antitestekhez kötődött fehérjék mennyiségét. Az általunk vizsgált 8-8 ép és tumoros veseszövetmintához kapott „fehérje pontok” intenzitását a Chemidoc Image Analyser (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) segítségével elemeztük ki és kvantifikáltuk. Az angiogenezis array-ek alapján kapott eredmények szerint az egyes angiogén fehérjék, mint például az ANG expressziója emelkedést mutatott a tumoros mintákban, míg az MMP-9 expressziója enyhe csökkenést jelzett. A tumoros szövetekben a TIMP-1 expressziója szintén enyhe csökkenést mutatott az egészséges mintákhoz képest. A fehérje array-k elemzése alapján az egyik legjellemzőbb angiogén marker, a VEGF nagyon alacsony expressziós szintet mutatott (szinte nem is volt észlelhető az expressziója) az egészséges szövetekben, ugyanakkor a tumoros mintákban a VEGF jelentős expresszióját figyeltük meg ($p = 0,0402$).

IV.7. Valós idejű qRT-PCR –el kapott eredmények

Mind a 20 párosított egészséges és tumoros veseszövetminták génexpressziós elemzését elvégeztük a következő génekre: VEGF-A, FGF-1, ANG, MMP-9, TIMP-1, HIF-1 α , MMP-2, TIMP-2. A fiziológias és patológias angiogenezis folyamatok állapotjelzői, a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor receptor-1 (VEGFR-1) és a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor receptor-2 (VEGFR-2), mint alap angiogenezis markerek, szintén mérésre kerültek. Az ANG, VEGF és HIF-1 α expressziója szignifikánsan emelkedett ($p \leq 0,05$) a tumoros mintákban, és szignifikánsan csökkent ($p \leq 0,05$) az ép szöveti mintapárokban. A qRT-PCR és az angiogenezis array eredményeiben tapasztalt kis eltérés az angiogenezis markerek szűrése során valószínűleg a szűréshez használt alacsony mintaszámból adódhat.

Az FGF-1 és a VEGFR receptorok expressziója szintén vizsgálatra került, mivel mindkét receptor részt vesz az RCC angiogenezisében. A valós idejű PCR elemzések megerősítették a Humán Angiogenezis Array eredményeit, megfigyelhető volt az FGF-1 downregulációja a tumoros szövetekben, valamint a VEGFR-1, -2 és -3 receptorok kifejeződése úgy a tumoros, mint a szomszédos ép szövetekben is a vizsgált RCC esetekben. Továbbá, az eredményeket a minták patológiai grádusának fényében vizsgálva, az RCC minták magasabb HIF-1 α expressziót mutattak, mint az alacsonyabb patológiai grádussal jellemzett ép minták. Intenzív VEGF expressziót figyeltünk meg az alacsony grádusú (1-es és 2-es grádus) RCC minták esetében, valamint a magas fokozatú (3-as grádus) RCC mintákban is (1-es grádus: $p = 0,0014$, a 2-es grádus és a 3-as grádus: $p < 0,0001$).

Az MMP-k és TIMP-ek expresszióját illetően a kvantitatív RT-PCR eredmények többnyire összhangban voltak a Human Angiogenesis Array eredményeivel. A génexpresszió elemzésének eredményei enyhe csökkenést mutatnak az MMP-9 expressziójában és növekedést a kapcsolódó TIMP-1 esetében a tumoros mintákban a szomszédos ép szövetekhez képest, ami összefügghet ezen fehérjék expressziójának az emelkedésével. Továbbá, vizsgáltuk az MMP-2 és TIMP-2 expresszióját, miszerint mindkét gén alacsonyabb expressziót mutatott a tumoros szövetekben, mint a szomszédos ép veseszövet mintákban. Az MMP-2 és az MMP-9 nem mutatott szignifikáns különbségeket ($p > 0,9999$), azonban a TIMP-1 (* $p = 0,0328$) és a TIMP-2 (* $p = 0,0371$) expressziójában szignifikáns eltérés mutatkozott.

IV.8. A shikonin dózis- és időfüggő módon gátolja a sejtek proliferációját

A tanulmányban két különböző, világossejtes vesedaganat sejtvonalat, az A-498 és a CAKI-2 sejteket használtuk a shikonin sejtproliferáció gátló hatásának vizsgálatára. A shikonin

hatásos dózisének meghatározásához a sejteket növekvő koncentrációjú szerrel inkubáltuk. Az eredmények azt mutatták, hogy a shikonin mindössze 24 óra elteltével, már 2,5 μM koncentrációnál jelentősen gátolta az A-498 és a CAKI-2 sejtek szaporodását is. Azonban a sunitinib által indukált jelentős sejtszaporodás-gátlás az A-498 sejtekben csak 20 μM koncentrációnál volt megfigyelhető, valamint a CAKI-2 sejtszaporodás gátlását már csak a 40 μM -nál és csak a vegyület alkalmazását követő 48 órával később észleltük. A shikonin gátló hatása az idő előrehaladtával fokozatosan növekedett, ami a shikonin vesesejtes karcinómára gyakorolt időfüggő hatását jelzi. Az inverz mikroszkóppal (Nikon Eclipse TS 100, Melville, NY, USA) végzett morfológiai megfigyelés szintén a shikonin rendkívül kifejezett hatását mutatta mindkét sejtvonalon.

Ezt követően a shikonin gátló hatását a kiválasztott vesedaganat sejtek klónképző képességére vizsgáltuk. A proliferációs aktivitás vizsgálati eredményei alapján a sejteket két hétig növekvő dóziséű shikoninnal és sunitinibbel kezeltük (1–40 μM), hogy teszteljük és összehasonlítsuk a shikonin és a sunitinib hatását a CAKI-2 és az A-498 sejtek kolóniaképző képességére. A shikonin kolóniaképződést gátló képessége hatékonyabbnak bizonyult az A-498 sejtek esetében, mint a CAKI-2-ben. Az A-498 sejtekben a kolóniák száma körülbelül harmadára csökkent, amikor 1 μM shikonint használtunk a kontroll csoporthoz képest, és körülbelül nyolcadára csökkent 2,5 μM koncentrációnál. A CAKI-2 sejtekben a hatás csak 2,5 μM -nál volt észlelhető (~hatszoros). A sejtszaporodási vizsgálat eredményeivel összhangban a shikonin sokkal alacsonyabb koncentrációnál (1 μM) gátolta a daganatos sejtek kolóniaképződését, mint a sunitinib, ami csak 20 μM -nál fejtette ki hasonló intenzív gátló hatását a kolóniaképződésre.

IV.9. A shikonin által indukált apoptózis a CAKI-2 és az A-498 humán vesedaganat sejtvonalakon

Mivel a kaszpáz-3 és -7 proteázok aktiválása kulcsfontosságú az apoptotikus sejthalálban, ezért a kaszpáz-3 és -7 aktivitását a shikoninnal kezelt CAKI-2 és A-498 sejteken is vizsgáltuk. A shikoninnal történő kezeléseket követően azt figyeltük meg, hogy 48 óra elteltével ezekben a sejtvonalakban a kaszpáz-3 és -7 aktivitásában körülbelül hatszoros növekedést mutatott aktivitásában a kontroll sejtekhez képest. Tehát a kaszpáz-3 és kaszpáz-7 aktivitás szignifikánsan növekedett a shikonin kezelés hatására, a maximális aktivitás 10 μM koncentrációnál tetőzött.

Mivel a kaszpáz-függő apoptózis általában befolyásolja más fehérjék hasítását is (példaként említhető a poli (ADP-riboz) polimeráz (PARP)), ezért a PARP expresszióját is

elemztük a shikonin kezelés hatására. A PARP szintjét Western blot segítségével mértük, ami szerint a PARP jelentősen fokozott expresszióját mutatta 24 órával a kezelés után, amely tovább növekedett 48 óra elteltével.

Az immunoblotting eredmények kimutatták, hogy a fokozott kaszpáz-3 és kaszpáz-7 szintek csökkent antiapoptotikus fehérjeként funkcionáló B-sejtes limfóma 2 (Bcl-2) szintekkel jártak együtt, azonban a proapoptotikus fehérje, a Bcl-2-asszociált X-fehérje (Bax) kifejeződésére vonatkozóan a shikoninnak nem volt észlelhető hatása a kezeletlen kontroll sejtekkel összehasonlítva.

IV.10. A shikonin hatása az apoptózisra és a tumorszuppresszor gének kifejeződésére

A humán CAKI-2 és A-498 sejtvonalakban vizsgáltuk a PI3K és a foszforilált-AKT (p-AKT) fehérjeexpressziókat is. A Western blot elemzések alapján a CAKI-2 sejtekben a PI3K és a p-AKT expresszió szintjének növekedése volt megfigyelhető, amely a kezelés után 48 órával érte el a legmagasabb szintet. Az A-498 sejtekben a PI3K expresszió folyamatos növekedést mutatott a kísérlet során, de a p-AKT fehérje szintjében egyértelmű csökkenés volt megfigyelhető.

A Foszfataz és Tensin Homológ (PTEN) fontos szerepet játszik a shikonin által indukált apoptózisban is. Mindkét sejtvonal esetében már igen korán jelentős csökkenést figyeltünk meg a PTEN expressziójában, majd a kezelés időtartama alatt enyhe növekedést tapasztaltunk.

IV.11. A MAPK/PI3K útvonalak szerepe a shikonin által indukált apoptózisban

Annak értékelésére, hogy a shikonin képes-e módosítani az extracelluláris jelátviteli kinázok (ERK) által szabályozott jelátviteli útvonalakat, megvizsgáltuk a shikonin hatását a p44/42 MAPK (tErk) foszforilációjára. Az A-498 és CAKI-2 sejtek 2,5 μ M shikoninnal történő 24 órás kezelése jelentős mértékben gátolta a foszfo-p44/42 MAPK (pErk) expressziós szintjét a teljes p44/42 MAPK fehérje expressziós szintjéhez képest. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a shikonin időfüggő módon csökkentheti ezeknek a fehérjéknek a foszforilációját. Összességében az eredmények azt mutatják, hogy a shikonin az apoptotikus sejthalál indukálásán keresztül gátolta a vesedaganat sejtek proliferációját. Emellett az eredmények arra is utalnak, hogy a shikonin által indukált apoptózis a vesedaganat sejtekben feltehetőleg egy mitokondrium-függő úton keresztül valósulhat meg.

A CAKI-2 és A-498 sejtekben a növekvő dózisú shikoninnal (2,5–10 μ M) végzett 24, 48 és 72 órás inkubációs periódusokat követően elvégeztük az NF- κ B gén expressziójának qRT-PCR-rel történő elemzését is. Megközelítőleg ötszörös csökkenést figyeltünk meg az NF-

κ B mRNS expressziójában a shikoninnal kezelt A-498 és CAKI-2 sejtekben a kezeletlen kontroll csoporthoz képest. A qRT-PCR adatokkal összhangban az NF- κ B fehérje szintjének jelentős csökkenését (~kétszeres) észleltük 48 óránál a Western blot analízissel.

Célunk volt továbbá az NF- κ B és az apoptózissal kapcsolatos faktorok, mint például a p53 közötti összefüggés vizsgálata, amelyek hatással lehetnek a tumorigenezisre, és szerepet játszanak a sejtciklus szabályozásában. A p53 jelentős csökkenését mutatja a CAKI-2 sejtekben ($p < 0,05$) a 24 órás shikonin kezelést követően. Az A-498 sejtekben a p53 expressziójában viszont enyhe csökkenés volt kimutatható 24 órás shikoninnal való inkubáció elteltével, míg 72 órás kezelés után mintegy háromszoros növekedés volt megfigyelhető a p53 gén expressziójában a kontroll sejtekhez viszonyítva ($p < 0,05$).

IV.12. A shikonin hatása a multidrog-transzporter gének expressziójára

A MDR-ek fokozott expressziója multidrog rezisztenciát jelenthet a tumoros sejtek számára, ugyanakkor a tumorsejt effluxának gátlása hatékonyan növelheti a tumoros sejtek érzékenységet a kemoterápiás szerekkel szemben.

Célunk volt megvizsgálni a leggyakoribb multidrog-transzporter gének (BCRP1, ABCC6, ABCB1, ABCB5) expresszióját shikoninnal kezelt A-498 és CAKI-2 sejtekben. A shikoninnal történő 24 órás kezelést követően körülbelül kétszeres növekedést figyeltünk meg a BCRP1 gén expressziójában úgy az A-498, mint a CAKI-2 sejtekben, amelyek előzőleg csökkent expressziót mutattak a kontroll sejtekben a 72 órás shikonin kezelés után. Szignifikáns különbségeket ($p < 0,05$) figyeltünk meg a BCRP1 gén expressziójában mindkét sejtvonal esetében a 24 órás kezelést követően. Az ABCC6 expressziója szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkent a 24 órás shikoninnal történő inkubáció elteltével az A-498 sejtekben, ami 72 óra után visszatért a kontroll szintre. Az ABCC6 transzporter gén expressziója nem volt kimutatható sem a kontroll, sem a shikoninnal kezelt CAKI-2 sejtekben. Az ABCB1 expresszió szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkent mindkét sejtvonalban már 24 órával a kezelés után. Az ABCB5 expressziója szinte teljesen lecsökkent a shikoninnal kezelt CAKI-2 sejtekben. Az A-498 sejtek ABCB5 expressziója 24 óra után 50%-kal csökkent, majd a shikonin kezelést követően 48 órával majdnem háromszorosára nőtt a kontroll, kezeletlen A-498 sejtekhez viszonyítva.

IV.13. A shikonin hatása az extracelluláris mátrix fehérjék expressziójára

Az RT-qPCR eredményeink azt mutatták, hogy a shikonin kezelés szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a CXCR4, az MMP-2, az MMP-9 és az E-kadherin expresszióját a CAKI-2

sejtekben. A CXCR4, az MMP-2 és az E-kadherin kifejeződésének csökkenése volt megfigyelhető A-498 sejtekben is, azonban a CXCR4 expressziójában mintegy kétszeres növekedést lehetett megfigyelni a 72 órás kezelés után a kezeletlen kontroll sejtekhez viszonyítva. Az MMP-9 enyhe növekedést mutatott már alig 24 óra elteltével, majd csökkent a shikoninnal történő 48 óra inkubációt követően.

Az E-kadherin és a CXCR4 expresszióját fehérje szinten is elemeztük. A CAKI-2 sejtek esetében szignifikáns csökkenést észleltünk az E-kadherin expressziójában, és mindössze enyhe csökkenést a CXCR4 szintjében. A kezelés után 72 órával hirtelen jelentkező emelkedést figyeltünk meg mindkét fehérje expressziójában a 24 és 48 órás mintákhoz képest. Az A-498 sejtekben az E-kadherin expressziója szignifikáns növekedést mutatott 24 órás shikonin kezelés után, azonban 48–72 óra shikoninnal történő inkubáció esetén az E-kadherin expressziója a kontroll sejtek szintje alá csökkent. A CXCR4 expressziója már 24 órával a shikoninnal történő kezelés után szignifikánsan csökkent, és nem mutatott növekedést a 48 és 72 órás kezelés után sem.

IV.14. A shikonin hatása a miR-21 és a miR-155 expressziójára

Mind a miR-155, mind a miR-21 onkogén miRNS-ként szolgál, melyek széles körben fejeződnek ki különböző humán szövetekben, és számos daganat típusban mutatták már ki a fokozott expressziójukat. Feltehetőleg szabályozzák a sejtosztódást, migrációt és inváziót, valamint gátolhatják az apoptózist. A CAKI-2 és A-498 sejteket 48 órán keresztül shikoninnal kezeltük, majd a kezelt és kontroll sejtekből RNS-t izoláltunk, és a miRNS-ek expressziós szintjét qRT-PCR segítségével vizsgáltuk. Eredményeink alapján szignifikáns változás nem volt megfigyelhető a vizsgált miRNS-ek expressziós szintjében a kezelt sejtek esetében.

V. Összegzés

Munkánk során a vesetumороk kialakulásában szerepet játszó egyes epigenetikai faktorok (miRNS-ek) expressziós mintázatát vizsgálatuk a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikáján vesetumорral diagnosztizált betegek mintáin. A hsa-miR-15b, a hsa-miR-99b valamint a hsa-miR-181a expressziós szintjeit vizsgálva nemcsak azt figyeltük meg, hogy a tumoros szövetminták szignifikánsan alacsonyabb szinten expresszálják az említett miRNS-eket, hanem azt is, hogy ezen miRNS-ek expressziójának mértéke összefügg a tumoros minták patológiai grádusával. Számos miRNS kapcsolódik az RCC tumorképződésében részt vevő molekuláris jelátviteli útvonalak szabályozásához, mely miRNS-ek alapot szolgáltathatnak az RCC terápiájához, mivel képesek kiegyensúlyozni a pro- és antiangiogén folyamatokat, és képesek szabályozni az angiogenezis egyes lépéseit. A hsa-miR-15b, a hsa-miR-99b és a hsa-miR-181a angiogenezisben potenciálisan szerepet vállaló targetjeit *in silico* adatbáziselemzéssel azonosítottuk. A targetek expressziós szintjeit qRT-PCR-al vizsgálva megfigyeltük az ANG, a VEGF és a HIF-1 α emelkedését a tumoros mintákban, továbbá a VEGF receptorai közül a VEGFR-1 és a VEGFR-3 is növekedett expressziót mutatott. Megállapítottuk továbbá, hogy a VEGF és a HIF-1 α erősebb expressziót mutat a daganatos szövetekben a patológiai grádus előrehaladásával. A mátrix metalloproteinázok és inhibitorai közül az MMP-9/MMP-2 és TIMP-1/TIMP-2 ko-expresszióját figyeltük meg, melyek szerepet játszhatnak a tumorok vaszkularizálásában. A metasztatikus vesedaganatok terápiáját érintően vizsgáltuk egy természetes hatóanyag, a shikonin sejtproliferációra és apoptózisra kifejtett hatását humán vesedaganat sejtvonalakon. A shikonin a már terápiában alkalmazott sunitinibhez hasonlóan tirozin-kináz inhibitoroként fejt ki hatását, és mint az a vizsgálatainkból kiderült, a sunitinibbel ellentétben jóval alacsonyabb koncentrációban is hatásos. Az apoptózisra kifejtett hatását a PI3K/AKT és MAPK útvonalak szabályozásán keresztül fejt ki, az extracelluláris mátrix fehérjék (CXCR4, MMP-2/-9, E-kadherin) expressziójának csökkentése révén pedig gátolja a sejtek invázióját. Megfigyelésünk szerint a shikonin kezelés eredményesen csökkenti egyes multidrog transzporterek expresszióját, ezáltal jelentős szerepe lehet a kialakult gyógyszer-rezisztencia ellen.

Remélhetőleg eredményeink a jövőben jelentősen hozzájárulnak az vesedaganatok korai diagnózisának felállításához, a szükséges biomarkerek vagy akár angiogén markerek időben történő azonosításához, továbbá az *in vitro* kísérleteink alapján eredményes hatóanyagként bizonyult shikonin fontos szerepet kaphat a jövőben elsősorban kombinált-, de akár monoterápiás alkalmazásként is.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Szabó Zsuzsannának, a Debreceni Egyetem Gyógyszerésztudományi Kar munkatársának, hogy az évek alatt doktori munkámat fáradhatatlanul támogatta, motivált, tudást és segítséget biztosított számomra kísérleteim elvégzéséhez, eredményeim publikálásához és nem utolsósorban a disszertációm elkészítéséhez. Köszönet Dr. Szabó Erzsébetnek, aki szintén rengeteg szakmai támogatást nyújtott kutatásaim során. Köszönet illeti Dr. Flaskó Tibort, a Debreceni Egyetem Urológiai Klinikájának igazgatóját és Dr. Szegedi Krisztiánt, akik a veseszövet minták gyűjtésében voltak a segítségünkre. Köszönettel tartozom Dr. Kovácsné Prof. Dr. Bácskay Ildikónak, a Debreceni Egyetem, Gyógyszerészeti Tudományi Kar Dékánjának aki anyagi támogatásaival járult hozzá kutatásaimhoz. Köszönettel tartozom Professzor Dr. Halmos Gábornak, aki biztosította számomra, hogy doktori munkámat a Biofarmácia Tanszéken végezhessem. Továbbá szeretném megköszönni a Biofarmácia Tanszék valamennyi munkatársának a támogatást.



Nyilvántartási szám: DEENK/414/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Király József

Doktori Iskola: Gyógyszerészeti Tudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Király, J.**, Szabó, E., Fodor, P., Vass, A., Choudhury, M., Gesztelyi, R., Szász, C., Flaskó, T., Dobos, N., Zsebik, B., Steli, Á. J., Halmos, G., Szabó, Z.: Expression of hsa-miRNA-15b, -99b, -181a and Their Relationship to Angiogenesis in Renal Cell Carcinoma. *Biomedicines*. 12 (7), 1-18, 2024.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines12071441>
IF: 3.9 (2023)
2. **Király, J.**, Szabó, E., Fodor, P., Fejes, Z., Nagy, B. J., Juhász, É., Vass, A., Choudhury, M., Kónya, G., Halmos, G., Szabó, Z.: Shikonin Causes an Apoptotic Effect on Human Kidney Cancer Cells through Ras/MAPK and PI3K/AKT Pathways. *Molecules*. 28 (18), 1-22, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28186725>
IF: 4.2





További közlemények

3. Farkasinszky, G., Péli-Szabó, J., Károlyi, P. K., Rácz, S., Dénes, N., Papp, T., **Király, J.**, Szabó, Z., Kertész, I., Mező, G., Halmos, G., Képes, Z., Trencsényi, G.: In Vivo Imaging of Acute Hindlimb Ischaemia in Rat Model: a Pre-Clinical PET Study.

Pharmaceutics. 16 (4), 1-14, 2024.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/pharmaceutics16040542>

IF: 4.9 (2023)

4. Szegedi, K., Szabó, Z., Kállai, J., **Király, J.**, Szabó, E., Bereczky, Z., Juhász, É., Dezső, B., Szász, C., Zsebik, B., Flaskó, T., Halmos, G.: Potential Role of VHL, PTEN, and BAP1 Mutations in Renal Tumors.

J Clin Med. 12 (13), 1-18, 2023.

DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm12134538>

IF: 3

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 16

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

8,1

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

Debrecen, 2024.07.24.

