

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Ösztrogének által kifejtett patofiziológiai és
transzkriptomikai változások összehasonlító vizsgálata
humán ovárium sejt kultúrákon**

Beke-Varga Alexandra Edit

Témavezető: Dr. Szilágyi-Bónizs Melinda



**DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI
ISKOLA**

Debrecen, 2024

**ÖSZTROGÉNEK ÁLTAL KIFEJTETT PATOFIZIOLÓGIAI
ÉS TRANZKRIPTOMIKAI VÁLTOZÁSOK
ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA HUMÁN OVÁRIUM
SEJTKULTÚRÁKON**

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

Írta: **Beke-Varga Alexandra Edit**
okleveles molekuláris biológus

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

Témavezető: Dr. Szilágyi-Bónizs Melinda, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Nagy Béla, MTA doktora
Dr. Beke Artúr, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, MTA doktora
tagok: Dr. Krasznai Zoárd Tibor, PhD
Dr. Butz Henriett, PhD
Dr. Uray Iván Péter, PhD
Prof. Dr. Bácsi Attila, MTA doktora

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja:
Debreceni Egyetem ÁOK, Belgyógyászati Intézet „A” épület
tanterme, 2025. június 10. 13:00 óra

1. Bevezetés

Az ösztrogének a női szervezet működésében kiemelkedő szerepet betöltő szteroid hormonok, amelyek a reprodukív ciklus szabályozása mellett egyéb szervrendszerek működését is meghatározzák (pl. idegrendszer, szív- és érrendszer, homeosztázis). Ezért posztmenopauzában, amikor az ösztrogén szint lecsökken, számos időskori megbetegedés megjelenése jellemző (pl. szívinfarktus, memóriazavar). Erre nyújt megoldást az ösztrogén alapú, hormonpótló terápia alkalmazása, amely azonban növelheti egyes ráktípusok, tk. a petefészekrák kialakulásának a kockázatát (Langer és mtsai, 2021). A hormonfüggő daganatok megjelenésének esélye az ún. xenoösztrogéneknek való kitettség által is emelkedik, amelyek az endogén ösztrogénekkel megegyező hatást képesek kiváltani a szervezetben. Ide sorolhatóak olyan, a természetben előforduló molekulák, mint pl. a zearalenon (ZEA), amely a *Fusarium* fonalas gombák által termelt mikotoxin. Ezen gombák szántóföldi és raktári kártevők révén megfertőzhetik a haszonnövényeket (pl. kukorica, zab, búza, rizs), így az általuk termelt metabolitok nagy mennyiségben kontaminálhatják a gabonából készült termékeket, ill. az állati takarmányt egyaránt (Paterni és mtsai, 2017). A szintetikus xenoösztrogének csoportjába tartozik a biszfenol A (BPA), amit tk. a polikarbonát műanyagok és epoxi gyanták gyártásánál alkalmaznak. A BPA a műanyagokból képes kiszivárogni az azokban tárolt élelmiszerekbe, italokba, ezáltal nagy egészségügyi kockázatnak kitéve az azokat elfogyasztókat (Urli és mtsai, 2023). Az ösztrogének karcinogén hatása proliferációt és migrációt indukáló hatásukkal van összefüggésben, amelyet elsősorban az ösztrogén receptor α (ER α) közvetít. Ezen receptor a ligand kötődését követően a sejtmagba transzlokálódva számos, az ösztrogén hatáshoz köthető gén transzkripcióját indukálja (Fuentes és Silveyra, 2019).

A tumorok kialakulását és terjedését az ún. mikroRNS-ek (miRNS) is befolyásolják, amelyek kisméretű (~18-22 nt), egyszálú, nem-kódoló RNS molekulák. Hatásukat a mRNS-ek

poszttranszkripcionális szabályozásán keresztül fejtik ki, amely során a cél mRNS-hez való szekvencia specifikus kötődésüket követően a mRNS degradációját, vagy a róla folyó transláció gátlását idézik elő (Ghini és mtsai, 2018). Azon miRNS-ek, amelyek tumor szupresszor fehérjék képződését gátolják onkogén (onkomiR) funkcióval rendelkeznek. Az onkogén fehérjék szintjét csökkentő miRNS-ek pedig tumor szupresszorok (Vishnoi és Rani, 2016). A tumoros és egészséges sejtek miRNS mintázata nagyban eltér, ezért a diagnosztikában ígéretes biomarkereknek tekinthetőek. A bennük rejlő potenciált növeli, hogy a testfolyadékokban is mérhetőek (Ho és mtsai, 2022). Emellett szintjük sejten belüli emelésével (pl. szintetikus miRNS mimik alkalmazásával), vagy csökkentésével (pl. antimiR alkalmazása révén) a terápiában is hasznosíthatóak lehetnek (Contiliani és mtsai, 2021).

A petefészekrák a 7. leggyakoribb, daganatos megbetegedésre visszavehető halálozási ok a nők körében, melynél az 5 éves túlélési arány mindössze 47,7 % (Stewart és mtsai, 2019). Ennek egyik oka, hogy a későn jelentkező, nem specifikus tünetek miatt a diagnózis felállítására gyakran későn, a III-as, IV-es stádiumokban kerül sor. A hagyományos, fizikális, valamint képalkotó (ultrahang, CT, MRI, PET-CT) eljárásokon alapuló diagnosztika kiegészülhet egyes biomarkerek, pl. a CA125 és HE4 meghatározásával, melyek azonban nem megbízhatóak a korai stádiumok meglétekor, ezáltal nem alkalmasak szűrésre sem (Doubeni és mtsai, 2016). Ezek hatékonyságát növelheti a jövőben a testfolyadékokban mérhető szabad nukleinsavak (pl. cirkuláló tumor DNS, mitokondriális DNS, miRNS) szintjének a meghatározása, amely segíthet a pontosabb és gyorsabb diagnózis felállításában (Szilágyi és mtsai. 2020). A petefészekrák terápiájában alkalmazott molekulák köre (pl. ciszplatin, karboplatin, paclitaxel, docetaxel) ugyancsak kiegészülhet a jövőben a tumorsejtek növekedését, ill. terjedését gátló miRNS molekulákkal (Deb és mtsai, 2018).

2. Célkitűzések

Az ösztrogének tumorok növekedésére/terjedésére gyakorolt hatása jól ismert jelenség mellrák esetén, azonban hiányos a szakirodalom a petefészekrák kialakulásában betöltött jelentőségüket illetően. Ez különösen igaz a xenoösztrogének vonatkozásában. Az ösztrogének petefészek tumorokra gyakorolt hatását több megfigyelés is alátámasztja: i) az ösztrogének proliferatív hatással rendelkeznek az ER-ral rendelkező ovárium tumor sejtekre, ii) az ovárium tumorok jelentős része expresszál ER-t, iii) az ovárium tumorsejtek képesek ösztrogén szintézisére, iv) az ösztrogének jelátvitelét (pl. tamoxifén), valamint a szintézisét (pl. aromatáz gátlók) gátló molekulák hatékonyak lehetnek a petefészekrák kezelésében. Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján az E2, ZEA és BPA molekulák fiziológiailag releváns dózisban a proliferáció és migráció fokozódását, valamint jelentős génexpresszióban megfigyelhető változásokat idéztek elő humán ovárium sejtenyészetekben, mely hatás függött az ER α jelenlététől. Emellett számos miRNS (miR-200 család tagjai, miR-203a, miR-205) expressziója is elmozdulást mutatott a kezelések hatására. Ezen munka folytatásaként célul tűztük ki az E2, ZEA és BPA által kiváltott patofiziológiai, valamint mRNS, és miRNS expresszióban megmutatkozó hatások összehasonlító vizsgálatát.

Ennek érdekében az alábbi vizsgálatokat végeztük el:

1. Az alacsony, fiziológiailag releváns dózisu E2, ZEA és BPA kezelések által kiváltott transzkriptomikai változások összehasonlító vizsgálatát RNS szekvenálás (mRNS és miRNS) segítségével.
2. Megvizsgáltuk a magas dózisu E2, ZEA, ill. BPA kezelések ovárium sejtekre gyakorolt hatását. A kezelések hatására monitoroztuk a sejtek fenotípusos válaszát (életképesség, apoptózis, sejtízis), valamint néhány kulcsgén expresszióját.

3. Meghatároztuk a miR-30 családba tartozó, tumorszupresszor funkcióval rendelkező miRNS-ek szerepét az ovárium sejtek ösztrogén válaszában. Ez magában foglalta az expressziójuk monitorozását ösztrogén kezelés hatására, ill. a miR-30d-5p szerepének felderítését az ovárium sejtek ösztrogén jelátvitelére gyakorolt hatásának vonatkozásában.

3. Anyagok és módszerek

3.1 Sejttenyésztés

Kísérleteinkhez a PEO1 (ER α -t expresszáló sejtvonal; Merck KGaA) és az A2780 (ER α -t nem expresszáló sejtvonal; Biofizikai és Sejtbiológiai Tanszék, Debreceni Egyetem) humán ovárium sejtvonalakat használtuk. A sejtvonalak fenntartását 10 % (PEO1), ill. 5 % (A2780) FBS-el és 1 % L-glutaminnal kiegészített RPMI1640 médiumban végeztük, 37 °C-os termosztátban, 90 %-os páratartalom, valamint 5 % CO₂ koncentráció mellett. A kísérletek kivitelezése alkalmával a sejteket a fent említett médiumban 24, ill. 96 lyukú platerre tapasztottuk majd 24 h-t követően a médiumot 5 % DCC-FBS-el és 1 % L-glutaminnal kiegészített PRF-RPMI médiumra cseréltük. Erre az FBS-ben esetlegesen jelenlévő szteroidok és a phenolred interferáló hatásának elkerülése miatt volt szükség. Ezután a sejteket E2, ZEA, ill. BPA molekulákkal 10 nM-100 μ M végkoncentrációban kezeltük. Egyes kísérletek alkalmával a sejteket 10 nM MPP (methylpiperidino-pyrazole), 100 nM AZD8835 és 1 μ M tamoxifen kezeléseknek is kitettük. A kezeléseket követően a sejteket tovább inkubáltuk (24 h-48 h). A kezeléseket hatástalan kontroll tenyészetekhez viszonyítottuk.

3.2 Fenotípusos vizsgálatok

A kezelésekre hatására megfigyelhető fenotípusos változások vizsgálatok az életképesség, az apoptózis, ill. a sejtlízis mértékének változásait monitoroztuk. Az életképesség mértékét MTT teszttel határoztuk meg (Kumar és mtsai, 2018). Az apoptózis mértékének

meghatározását, a mitokondriális membrán potenciál mérésén alapuló DiIC₁(5) assay segítségével végeztük (Markovics és mtsai, 2019). A sejtlízis jelenlétének detektálása a sejtenyészetek felülülőjében mérhető laktát dehidrogenáz (LDH) aktivitás mérésén keresztül, a CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) felhasználásával történt. A kezeletlen kontrollhoz képest szignifikáns elmozdulás meghatározása egyutas ANOVA teszt (posthoc analízis: Dunnett teszt) segítségével történt (GraphPad Prism 7.0).

3.3 mRNS izolálás és kvantifikáció

A génexpresszió meghatározásához a sejtekből totál RNS-t izoláltunk a Quick-RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) segítségével, majd a Maxima first strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével cDNS átíratot készítettünk róluk. A tisztított RNS és a cDNS koncentrációját a NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) készüléken mértük le. A génexpresszió mértékét a Maxima SYBR Green qPCR Master Mix kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg a LightCycler 96 (Roche) készülék felhasználásával. A kezelések hatására végbemenő változások mértékét a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula segítségével határoztuk meg, ahol a *GAPDH* expressziója szolgált referenciaként. A szignifikancia mértékének meghatározása Student t-teszt segítségével, a ΔCt értékek felhasználásával történt (GraphPad Prism 7.0).

3.4 miRNS izolálás és kvantifikáció

A miRNS expresszió meghatározásakor a sejtekből a miRNS frakciót is tartalmazó totál RNS-t izoláltunk a miRNeasy Kit (Qiagen) segítségével, majd a miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) segítségével cDNS átíratot készítettünk róluk. A tisztított RNS és a cDNS koncentrációját a NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) készüléken mértük le. A miRNS szinteket a miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen), valamint a miRCURY LNA PCR (Qiagen) primer assay-k segítségével határoztuk meg a LightCycler 96 (Roche) készülék felhasználásával. A relatív expressziós értékeket a $2^{-\Delta Ct}$

formula segítségével határoztuk meg, ahol a miR-103a-3p expressziója szolgált referenciaként. A szignifikancia mértékének meghatározása Student t-teszt segítségével, a ΔC_t értékek felhasználásával történt (GraphPad Prism 7.0).

3.5 Transzfektálás miRNS mimikkel

A miR-30d-5p funkcionális vizsgálatához a PEO1 és az A2780 sejteket 50 nM és 100 nM végkoncentrációban miR-30d-5p mimikkel transzfektáltuk a miRIDIAN microRNA Mimic (Horizon) kit, valamint a DharmaFECT 1 siRNA Transfection Reagent Kit (Horizon) használati utasításait követve. Negatív kontrollként a miRIDIAN microRNA Mimic Negatív Kontrollt (Horizon) használtuk.

3.6 Transzkriptomikai analízis RNS szekvenálással

Az E2, ZEA és BPA kezelések globális mRNS és miRNS expressziós szintekre gyakorolt hatásának monitorozása RNS szekvenálással történt. A szekvenálás kivitelezését és a nyers adatok genomra illesztését a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium (Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debreceni Egyetem) végezte. A szekvenálás az Illumina NextSeq500 platform felhasználásával került kivitelezésre, referencia genomként a GRCh38.p13 lett alkalmazva. Az adatok analízise -a DESeq algoritmussal való normalizálása és az FPKM értékek generálása- a StrandNGS szoftver segítségével történt. A szignifikáns elmozdulások mértéke moderated T-teszt alkalmazásával lett meghatározva.

A bioinformatikai analízist az FPKM értékek felhasználásával végeztük, mely során meghatároztuk az expressziós elmozdulást jelző \log_2FC értékeket, heatmap-eket és MA plot-okat generáltunk, valamint funkcionális géndúsulási analízist végeztünk az iDEP.96 szoftver és a GO_BP, KEGG, ill. a Reactome adatbázisok felhasználásával. A megváltozott expressziót mutató miRNS-ek, valamint a célgénjeik közötti hálózatanalízist és dúsulási analízist a

miRNet szoftverrel végeztük. A Venn diagramok készítése a BioVenn segítségével történt.

4. Új tudományos eredmények

4.1 Fiziológiailag releváns dózisú E2, ZEA és BPA kezelések által kiváltott transzkriptomikai változások összehasonlítása

Ezen kísérletek során a PEO1 sejtvonalat alkalmaztuk, amelyet 10 nM E2, és ZEA, valamint 100 nM BPA kezelésnek vetettünk alá. Ezen dózisoknál jelentős mértékű elmozdulás volt mérhető a *GREB1*, *CA12*, *DEPTOR* és *AGT* gének esetében, valamint a proliferáció és a migráció fokozódása volt megfigyelhető korábbi vizsgálataink során. Sejthálál azonban nem volt jelen ezen körülmények között (Márton és mtsai, 2020). A mRNS szekvenálás alkalmával az E2 kezelés 1847, a ZEA kezelés 2019, a BPA kezelés pedig 901 gén expressziójára gyakorolt hatást szignifikáns mértékben. A Log_2FC értékek alapján 308, 288 és 63 gén expressziója emelkedett feltehetőleg biológiailag releváns mértékben ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$), míg 292, 260 és 45 gén expressziója csökkent ($\text{Log}_2\text{FC} < -1$) az E2, ZEA és BPA kezelések hatására. Ezek közül 83 gén mindhárom kezelés hatására elmozdulást mutatott, melyek feltehetően kulcsszerepet tölthetnek be az ovárium sejtek ösztrogén válaszában és az ovárium tumorok ösztrogén érzékenységének vonatkozásában ígéretes diagnosztikus biomarker jelöltek lehetnek a jövőben. Érdemes kiemelni, hogy a ZEA és az E2 által kiváltott hatás mértéke megegyezett, amely felhívja a figyelmet a ZEA kontamináció jelentőségére esetleges karcinogén, ill. hormonrendszer működését megzavaró hatásának vonatkozásában. A BPA hatása azonban gyengébbnek bizonyult, ami ezen molekula $\text{ER}\alpha$ -hoz való kisebb affinitásával lehet összefüggésben (Acconcia és mtsai, 2015). Eredményeink validálásához 17 gént választottunk ki, melyek expresszióját qPCR-rel határoztuk meg. A qPCR, valamint a szekvenálás során kapott Log_2FC értékek jól korreláltak egymással, a Pearson korrelációs együttható értéke az E2, ZEA és BPA kezelések esetében $r=0,95$, $r=0,96$ és $r=0,93$ volt.

A megváltozott expressziót mutató gének funkcionális géndúsulási analízise alapján a sejtciklushoz, az aminosav-, és iontranszportoz, valamint az RNS szintézishez (nem-kódoló-, riboszómális- és nukleáris RNS metabolizmus) köthető folyamatok nagymértékű dúsulást mutattak. Ez jó összhangban van korábbi megfigyelésünkkel, miszerint az E2, ZEA és BPA kezelések a sejtproliferáció fokozódását idézték elő (Márton és mtsai, 2020). Ehhez nyújthat segítséget a sejt fehérjeszintetizáló kapacitásának növelése a riboszóma genezis, valamint aminosav transzport fokozásán keresztül. Azonban az epiteliális fenotípus fenntartásához (epiteliális sejt differenciáció, epidermisz kialakulás) és a sejt adhézióhoz (biológiai adhézió, sejt adhézió) köthető folyamatok represszálódtak, ami szintén összefüggésben van azon megfigyelésünkkel, hogy az ösztrogén kezelések a migráció fokozódásához vezettek, mely a metasztázis képzést segítheti elő (Márton és mtsai, 2020).

Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására 74, 47 és 73 miRNS expressziója változott meg szignifikáns mértékben. Ezek közül biológiailag feltehetőleg releváns mértékű változás ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$ vagy $\text{Log}_2\text{FC} < -1$) 13 (E2), 11 (ZEA) és 10 (BPA) miRNS esetében volt detektálható. Ezen miRNS-ek és a target mRNS-ek között kiterjedt hálózatok rajzolódtak ki. A funkcionális géndúsulási analízis alapján ezen miRNS-ek a sejtproliferáció, a sejtm metabolizmus, az apoptózis és a migráció szabályozásában játszhatnak szerepet. Ezzel összefüggésben több – köztük számos hormonfüggő - daganattípus (tk. prosztatarák, endometriumrák, pajzsmirigyrák) kialakulásában is közreműködhetnek.

Az azonosított miRNS-ek közül 6 expresszióját qPCR-el is meghatároztuk. Ez alapján sikerült megerősítenünk a miR-501-5p, let-7a-2-3p, miR-26a-2-3p és miR-197-5p molekulák represszióját az E2 kezelés hatására. Azonban a miR-582-3p esetében a qPCR-es mérés során ugyancsak repressziót tapasztaltunk – a szekvenálással ellentétben. A ZEA kezelés hatására a miR-501-5p és miR-197-5p a qPCR és a szevenálás eredményei alapján is represszálódtak. A BPA

kezelés hatására a miR-197-5p expressziójában tapasztalt csökkenést qPCR-el nem sikerült megerősítenünk.

4.2 Magas dózisú ösztrogén kezelések ovárium sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata

A xenoösztrogének humán sejtekre kifejtett komplex hatásának pontosabb megértése érdekében megvizsgáltuk a nagy dózisban (1-100 μM) való alkalmazásukra adott válaszát. A fenotípusos vizsgálatok az alábbi paramétereket monitoroztuk: (i) az életképesség mértékét; (ii) a mitokondriális membránpotenciál csökkenését, ami a korai apoptotikus folyamatok markere; valamint (iii) a sejtlízis előfordulását, amelyről a sejtek felülészójában mérhető LDH aktivitás adott információt. Kísérleteinkbe a PEO1 sejtvonal mellett, az ER α -t nem expresszáló A2780 sejtvonalat is bevontuk. Eredményeink alapján a nagydózisú ösztrogén kezelések csökkentették az életképesség mértékét, valamint sejthalált indukáltak, melynek mértéke jelentősen eltért a két sejtvonalban. A PEO1 sejtvonal jobban tolerálta a nagydózisú E2 kezelést, ugyanis az életképesség csökkenése 30 μM , míg az apoptózis indukálódása 10 μM fölött jelentkezett, és sejtlízis 40 μM -tól kezdődően volt megfigyelhető. Ezzel szemben az A2780 esetében az életképesség csökkenése már 1 μM E2 esetében megfigyelhető volt, ráadásul 20 μM kezelés hatására intenzív sejtlízis volt detektálható. A nagydózisú ZEA kezelés az E2-hoz hasonló mértékű fenotípusos változásokat idézett elő a sejtvonalakban. A PEO1 sejtvonalban az életképesség csökkenése és az apoptózis indukálódása 30 μM ZEA hatására jelentkezett, 40 μM dózisonál pedig intenzív sejtlízis is megfigyelhető volt. Az A2780 sejtvonalban az életképesség csökkenése már 1 μM ZEA kezelés hatására, sejtlízis pedig 30 μM ZEA kezeléskor is megfigyelhető volt. A BPA kezelés azonban jóval kevésbé bizonyult toxikusnak a PEO1 sejtvonal esetében, itt ugyanis az életképesség csökkenése és a sejtlízis is csak 100 μM BPA kezelés felett jelentkezett. Az A2780 ugyanakkor szintén érzékenynek bizonyult a nagy dózisú BPA kezelésekkal szemben, ugyanis az életképesség

csökkenése már 1 μM BPA hatására megfigyelhető volt. Azonban sejtlízis csak 100 μM BPA alkalmazásakor jelentkezett.

Megvizsgáltuk néhány gén expressziójának változását is a nagy dózisu ösztrogén kezelésekre. Ehhez az ösztrogén válaszhoz (*GREB1*, *CA12*) az apoptózishoz (*TP53*) és az autofágiához (*ATG2B*, *ATG12*, *BAG3*) köthető géneket választottunk. A kezelésekre hatására a PEO1 sejtvonalban a *GREB1* és *CA12* gének indukciója volt megfigyelhető, melynek mértéke a dózis növelésével csökkent. Ez az ER α -mediált ösztrogén válasz aktiválódására utalt. A *TP53*, *ATG2B*, *ATG12* és *BAG3* gének dóziszfüggő indukciója az apoptózis és az autofágia folyamatainak megindulására utalt, amelyek a magasabb E2 és ZEA dózisoknál bizonyultak hangsúlyosabbnak és nem jelentkeztek a BPA hatására. Az A2780-ban elmaradt a *GREB1* és *CA12* gének indukciója, azonban az *ATG2B* és a *BAG3* gének indukciója detektálható volt az E2 és ZEA kezelésekre hatására.

Eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy a PEO1 sejtvonal nagy dózisu ösztrogén kezelésre mutatott magasabb fokú toleranciája – legalábbis részben - az ER α -mediált ösztrogén válasz elindulásával állhat összefüggésben, amely hozzájárulhatott a proliferáció fenntartásához. Ezen feltevésünk bizonyítása érdekében a nagy dózisu E2 kezelést a PEO1 sejtvonal esetében 10 nM MPP (ER α specifikus antagonist) jelenlétében is elvégeztük. Ekkor az E2 kezelés hatására a *GREB1* és *CA12* gének indukciója - elvárásainknak megfelelően – elmaradt. Ez azt eredményezte, hogy a PEO1 sejtvonal érzékenyebben reagált a nagy dózisu E2 kezelésre: az életképesség csökkenése már 1 μM E2, míg a sejtlízis már 20 μM E2 kezelés mellett megfigyelhető volt.

4.3 A miR-30 család jelentőségének vizsgálata az ovárium sejtek ösztrogén válaszában

Munkánk folytatásában megvizsgáltuk a miR-30 család egyes tagjainak (miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-30d-5p és a miR-30e-5p) esetleges szerepét az ovárium sejtek ösztrogén válaszában. Ezen miRNS-ek feltehetőleg tumor szuppresszor funkcióval rendelkeznek és

más sejtvonalak esetében összefüggésbe hozták őket az ösztrogének hatásmechanizmusával (Mao és mtsai, 2018). A vizsgált miRNS-ek mindegyike nagyobb alap expresszióval rendelkezett a PEO1 sejtvonalban, az A2780-nal összehasonlítva, ami arra utal, hogy ezen miRNS-ek nagyobb biológiai relevanciával rendelkezhetnek az ER α -t expresszáló, ösztrogén szenzitív PEO1 sejtvonalban. E2 kezelés (10 nM-100 μ M) hatására a miR-30a-5p, miR-30d-5p és a miR-30e-5p indukciója volt megfigyelhető 50 μ M és 100 μ M E2 dózisok hatására a PEO1 sejtvonalban, ami alapján feltételezhető, hogy ezen miRNS-ek fontosak lehetnek a nagy dózisú E2 hatására elinduló sejthalál szabályozásában. Ezt bioinformatikai analízisünk is megerősítette, mivel ezen miRNS-ek targetjei több, a sejtproliferációhoz és sejthalálhoz köthető folyamatban is dúsulást mutattak. Külön kiemelném a miR-30d-5p-t, mely targetjei a legnagyobb mértékű dúsulást mutatták a sejthalál szabályozásához köthető folyamatokban. Ezért a miR-30d-5p molekulát részletesebben is megvizsgáltuk.

Ekkor megnéztük, hogy a miR-30d-5p sejten belüli szintjének emelése milyen hatást gyakorol a PEO1 és az A2780 sejtvonalakra. A sejteket 50 nM és 100 nM koncentrációban miR-30d-5p mimikkel transzfektáltuk. Eredményeink alapján a miR-30d-5p mimik csökkentette mindkét sejtvonal életképességét. Megvizsgáltuk továbbá, hogy a miR-30d-5p mimik hatására változik-e a korábban vizsgált *GREB1*, *CA12*, *TP53*, *ATG2B*, *ATG12* és *BAG3* gének expressziója. Ezen gének közül csak a *TP53* expressziójában tapasztaltunk csökkenést, ami nem meglepő, hiszen a *TP53* a miR-30d-5p validált target génje (Kumar és mtsai, 2011). Ezen felül megvizsgáltuk a *SOX4* expressziós szintjét is, amely szintén a miR-30d-5p validált target génje (Xu és mtsai, 2021). A qPCR-el végzett vizsgálatunk alapján, ezen gén esetén is expressziós szint csökkenést detektáltunk a PEO1 sejtvonalban.

A továbbiakban megvizsgáltuk a miR-30d-5p esetleges hatását a nagy dózisú E2 által indukált sejthalálra a PEO1 sejtvonalban. Ekkor a sejteket a miR-30d-5p mimikkel való transzfektálást (50 nM) követően nagy dózisú E2 (1-100 μ M)

kezelésnek is alávetettük. Eredményeink alapján a miR-30d-5p mimik jelentősen csökkentette a PEO1 sejtek toleranciáját. Ugyanis már 1 μM E2 az életképesség csökkenését idézte elő, valamint 10 μM E2 hatására intenzív sejtlízis volt megfigyelhető. Ez azzal lehet összefüggésben, hogy csökkent az ER α -mediált ösztrogén válasz intenzitása, amit a *GREB1* és *CA12* gének indukciójának az elmaradása jelzett. A *SOX4* expressziója ugyancsak nagyobb mértékben csökkent, ugyanis az önmagában alkalmazott E2 kezelés 50 μM és 100 μM dózis mellett csökkentette ezen gén expresszióját, ami az E2 és a miR-30d-5p mimik együttes alkalmazásakor már 10 μM E2 mellett megfigyelhető volt. Mivel a miR-30d-5p a *SOX4* expressziójának szabályozásán keresztül a PI3K/Akt útvonal működésére gyakorol hatást (Xu és mtsai, 2021) - mely útvonal az ER α -mediált ösztrogén választ is befolyásolja (Khatpe és mtsai, 2021) - ezért feltételeztük, hogy a miR-30d-5p a PI3K/Akt útvonalra gyakorolt hatásának eredményeként zavarhatta meg az ER α -mediált ösztrogén választ és ez állhatott a nagy dózisú E2-lal szembeni tolerancia csökkenésének háttérében a mimikkel kezelt tenyészetekben. Ennek bizonyítására kísérleteinket elvégeztük az AZD8835 (PI3K inhibitor) jelenlétében is. Eredményeink alapján az AZD8835 (100 nM) alkalmazása a miR-30d-5p mimikhez hasonló hatást fejtett ki: a PEO1 sejtek toleranciája lecsökkent a nagydózisú E2 kezelésekkel szemben, a *GREB1* és *CA12* gének indukciójának a mértéke alacsonyabb volt, ugyanakkor az *ATG2B* és az *ATG12* gének expressziója fokozódott. Ez felveti a miR-30d-5p esetleges alkalmazásának lehetőségét a petefészekrák terápiájában, önmagában, vagy kombinált terápia részeként. A kombinációs terápiának egyik jelöltje lehet a tamoxifén, amelyet antiösztrogénként alkalmaznak az ER+ ovárium tumorok terápiájában (Paleari és DeCensi, 2018). Ezt bizonyítandó megvizsgáltuk ezen két molekula együttes hatását a PEO1 sejtekre. Eredményeink alapján a tamoxifén (1 μM), a miR-30d-5p (50 nM), valamint az AZD8835 (100 nM) egyaránt gátolta a 10 nM E2 proliferatív, valamint a *GREB1* és *CA12* génekre kifejtett induktív hatását. Emellett a tamoxifén kezelés miR-30d-5p mimikkel,

vagy AZD8835-el való kombinálása markánsabb inhibíciót fejtett ki az életképességre.

5. Összefoglalás

Munkánk során az E2, ZEA és BPA petefészekrákban betöltött jelentőségét vizsgáltuk humán ovárium sejtvonalak segítségével. Első lépésben a PEO1 (ER α +) sejteket alacsony, fiziológiailag releváns dózisu E2 (10 nM), ZEA (10 nM) és BPA (100 nM) molekulákkal kezeltük, majd a transzkriptomban bekövetkező változásokat mRNS és miRNS szekvenálással monitoroztuk. A kezelések hatására 308, 288 és 63 gén indukálódott (Log₂FC > 1), valamint 292, 260 és 45 gén represszálódott (Log₂FC < -1). Ezen felül 13, 11 és 10 miRNS expressziója mutatott szignifikáns elmozdulást (Log₂FC > 1, vagy Log₂FC < -1). A funkcionális géndúsulási analízis alapján számos, a sejtproliferációhoz és migrációhoz köthető folyamat indukálódása volt megfigyelhető, ami jó összhangban van korábbi eredményeinkkel. Az E2 és a ZEA hatása azonos mértékűnek bizonyult, 407 gén mozdult el a 2 kezelés hatására. Azonosítottunk továbbá 83 gént, amely mindhárom kezelés hatására génexpressziós változást mutatott. Ezek expressziójának monitorozása diagnosztikus jelentőséggel bírhat az ovárium tumorok ösztrogén érzékenységét illetően. Megerősítettük továbbá a miR-501-5p, let-7a-2-3p, let-7g-3p, miR-26a-2-3p, miR-197-5p és miR-582-3p expressziós változását a qPCR-es vizsgálataink során is.

Munkánk folytatásaként megvizsgáltuk a nagy dózisu (1-100 μ M) E2, ZEA és BPA kezelések PEO1 (ER α +) és A2780 (ER α -) ovárium sejtvonalak fenotípusára gyakorolt hatását. Az E2 és a ZEA kezelések már 30 μ M dózisban az életképesség csökkenését és a sejthalál indukálását váltották ki a PEO1 sejtvonalon, amely hatás kifejtéséhez a BPA esetében 100 μ M kezelésre volt szükség. A *GREB1* és *CA12* gének indukálódása alapján az E2 és a ZEA 1-10 μ M dózisban is képesek voltak az ER α -mediált ösztrogén válasz elindítására, nagyobb dózisban azonban a sejthalál dominált, melyben szerepe lehetett a *TP53*, *ATG2B*, *ATG12* és *BAG3* gének

indukciójának. Az ER α -mediált ösztrogén válasz hiányában csökkent a sejtek nagy dózisú E2-lal szembeni túlélése, mivel az A2780 sejtvonalt, valamint a PEO1 sejtvonalt MPP-vel (ER α szelektív antagonistá) történő kezelése esetén már 1 μ M dózis is az életképesség csökkenését és a sejthalál indukálódását vonta maga után. A PEO1 sejtvonalt esetében a PI3K/Akt útvonal működésének megzavarása az AZD8835 (PI3K inhibitor), vagy miR-30d-5p mimikkal (a *SOX4* targetálásával befolyásolja a PI3K/Akt működését) való transzfektálás által ugyancsak csökkentette a nagy dózisú E2-lal szembeni toleranciát, valamint a tamoxifénnel szembeni érzékenységet, feltehetően az ER α -mediált szignalizáció megzavarásán keresztül. Ez felveti hasonló kombinációs kezelések klinikumban való alkalmazásának lehetőségét petefészekrák esetén.

6. Irodalomjegyzék

Acconcia, F., Pallottini, V., & Marino, M. (2015). Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose-response: a publication of International Hormesis Society*, 13(4), 1559325815610582.

Contiliani, D. F., Ribeiro, Y. A., de Moraes, V. N., & Pereira, T. C. (2021). MicroRNAs in Prion Diseases-From Molecular Mechanisms to Insights in Translational Medicine. *Cells*, 10(7), 1620.

Deb, B., Uddin, A., & Chakraborty, S. (2018). miRNAs and ovarian cancer: An overview. *Journal of cellular physiology*, 233(5), 3846–3854.

Doubeni, C. A., Doubeni, A. R., & Myers, A. E. (2016). Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *American family physician*, 93(11), 937–944.

Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*, 116, 135–170.

Ghini, F., Rubolino, C., Climent, M., Simeone, I., Marzi, M. J., & Nicassio, F. (2018). Endogenous transcripts control miRNA levels and activity in mammalian cells by target-directed miRNA degradation. *Nature communications*, 9(1), 3119.

Ho, P. T. B., Clark, I. M., & Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International journal of molecular sciences*, 23(13), 7167.

Khatpe, A. S., Adebayo, A. K., Herodotou, C. A., Kumar, B., & Nakshatri, H. (2021). Nexus between PI3K/AKT and Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. *Cancers*, 13(3), 369.

Kumar, M., Lu, Z., Takwi, A. A., Chen, W., Callander, N. S., Ramos, K. S., Young, K. H., & Li, Y. (2011). Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene*, 30(7), 843–853

Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(6), 10.1101/pdb.prot095505.

Langer, R. D., Hodis, H. N., Lobo, R. A., & Allison, M. A. (2021). Hormone replacement therapy - where are we now?. *Climacteric: the journal of the International Menopause Society*, 24(1), 3–10.

Márton, É., Varga, A., Soltész, B., Penyige, A., Lukács, J., Póka, R., ... & Szilágyi, M. (2021). Comparative analysis of cell-free miR-205-5p, let-7f-5p, and miR-483-5p expression in ovarian cell cultures and plasma samples of patients with ovarian cancer. *Applied Sciences*, 11(4), 1735.

Márton, É., Varga, A., Széles, L., Göczi, L., Penyige, A., Nagy, B., & Szilágyi, M. (2020). The cell-free expression of miR200 family members correlates with estrogen sensitivity in human epithelial ovarian cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(24), 9725.

Markovics, A., Tóth, K. F., Sós, K. E., Magi, J., Gyöngyösi, A., Benyó, Z., Zouboulis, C. C., Bíró, T., & Oláh, A. (2019). Nicotinic acid suppresses sebaceous lipogenesis of human sebocytes via activating hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCA₂). *Journal of cellular and molecular medicine*, 23(9), 6203–6214.

Mao, L., Liu, S., Hu, L., Jia, L., Wang, H., Guo, M., Chen, C., Liu, Y., & Xu, L. (2018). miR-30 Family: A Promising Regulator in Development and Disease. *BioMed research international*, 2018, 9623412.

Paleari, L., & DeCensi, A. (2018). Endocrine therapy in ovarian cancer: where do we stand?. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 30(1), 17–22.

Paterni, I., Granchi, C., & Minutolo, F. (2017). Risks and benefits related to alimentary exposure to xenoestrogens. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(16), 3384–3404.

Stewart, C., Ralyea, C., & Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Seminars in oncology nursing*, 35(2), 151–156.

Szilágyi, M., Pös, O., Márton, É., Buglyó, G., Soltész, B., Keserű, J., Penyige, A., Szemes, T., & Nagy, B. (2020). Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *International journal of molecular sciences*, 21(18), 6827.

Urli, S., Corte Pause, F., Crociati, M., Baufeld, A., Monaci, M., & Stradaoli, G. (2023). Impact of Microplastics and Nanoplastics on Livestock Health: An Emerging Risk for Reproductive Efficiency. *Animals: an open access journal from MDPI*, 13(7), 1132.

Vishnoi, A., & Rani, S. (2016). *MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. MicroRNA Profiling*, 1–10.

Xu, X., Zong, K., Wang, X., Dou, D., Lv, P., Zhang, Z., & Li, H. (2021). miR-30d suppresses proliferation and invasiveness of pancreatic cancer by targeting the SOX4/PI3K-AKT axis and predicts poor outcome. *Cell death & disease*, 12(4), 350.

7. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni a hálámat a témavezetőm, **Dr. Szilágyi-Bónizs Melinda** felé. Szakmai felkészültsége és a kutatómunkához való hozzáállása példaértékű. Hálásan köszönöm a Humángenetikai Tanszék nyugalmazott vezetőjének, **Prof. Dr. Nagy Bálintnak**, valamint jelenlegi vezetőjének, **Prof. Dr. Balogh Istvánnak**, hogy mindvégig támogatták tudományos munkámat. Szeretném megköszönni munkacsoportunk tagjainak, **Dr. Márton-Deme Évának** és **Magyarné Trefán Katalinnak** pótolhatatlan segítségüket és a professzionális csapatmunkát. Külön köszönet illeti **Dr. Penyige Andrást** és **Dr. Markovics Arnoldot** a bioinformatikai

munkában, valamint a sejtenyésztésben nyújtott segítségükért, továbbá **Dr. Póliska Szilárdot**, a szekvenálások elvégzéséért. Végül, de nem utolsó sorban, hálával tartozom a Humángenetikai Tanszék minden munkatársának, férjemnek, családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig támogattak ezen az úton.

A projekt az NKFIH-138021 pályázat keretein belül valósult meg. 2024.09.01 és 2025.08.31. között az EKÖP-24-4-I-DE-257 ösztöndíjban részesültem.

8. Saját közlemények jegyzéke



**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

Nyilvántartási szám: DEENK/432/2024.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Beke-Varga Alexandra Edit
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Márton, É., **Beke-Varga, A. E.**, Penyige, A., Hádáné Birkó, Z., Balogh, I., Nagy, B., Szilágyi, M.:
Comparative Analysis of Transcriptomic Changes including mRNA and microRNA Expression Induced by the Xenoestrogens Zearalenone and Bisphenol A in Human Ovarian Cells.
Toxins. 15 (2), 1-22, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/toxins15020140>
IF: 3.9
2. **Beke-Varga, A. E.**, Márton, É., Markovics, A., Penyige, A., Balogh, I., Nagy, B., Szilágyi, M.:
Suppressing the PI3K/AKT Pathway by miR-30d-5p Mimic Sensitizes Ovarian Cancer Cells to Cell Death Induced by High-Dose Estrogen.
Biomedicines. 10 (9), 1-19, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/biomedicines10092060>
IF: 4.7





További közlemények

3. Márton, É., **Beke-Varga, A. E.**, Soltész, B., Penyige, A., Lukács, J., Póka, R., Nagy, B., Szilágyi, M.: Comparative Analysis of Cell-Free miR-205-5p, let-7f-5p, and miR-483-5p Expression in Ovarian Cell Cultures and Plasma Samples of Patients with Ovarian Cancer.
Appl. Sci.-Basel. 11 (4), 1-10, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/app11041735>
IF: 2.838
4. Márton, É., **Beke-Varga, A. E.**, Széles, L., Göczi, L., Penyige, A., Nagy, B., Szilágyi, M.: The Cell-Free Expression of MIR200 Family Members Correlates with Estrogen Sensitivity in Human Epithelial Ovarian Cells.
Int. J. Mol. Sci. 21 (24), 1-19, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21249725>
IF: 5.924

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,362

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 8,6

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

Debrecen, 2024.08.23.

