

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Dr. Máténé Sári Zsanett Mercédesz

**Az indol származékok szerepe rosszindulatú
emlődaganatok patogenezisében**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Az indol származékok szerepe rosszindulatú emlődaganatok patogenezisében

Dr. Máténé Sári Zsanett Mercédesz

Témavezető: Dr. Bay Péter



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések.....	6
2. Bevezetés.....	11
2.1. A mikrobiom szerepe tumorok indukciójában és működésében.....	11
3. Irodalmi áttekintés.....	13
3.1. A humán mikrobiom	13
3.1.1. Diszbiózis – onkobiózis	13
3.1.2. Az onkobiom kapcsolata az emlődaganatos megbetegedésekkel	17
3.2. Az emlő rosszindulatú daganatai.....	19
3.2.1. Epidemiológia	19
3.2.2. Emlődaganat osztályozási rendszerek	21
3.2.3. Tumor mikrokörnyezet.....	23
3.2.4. A neoplasztikus sejtekre jellemző folyamatok.....	27
3.3. Antitumor hatások	30
3.3.1. Reaktív intermedierek és antioxidánsok	30
3.3.2. Sejtproliferációs kontroll és oxidatív stressz.....	33
3.3.3. Epiteliális-mezenchimális tranzíció és az emlő rosszindulatú daganatai.....	34
3.3.4. Az emlődaganatok metabolizmusa.....	39
3.3.5. Emlőrák őssejtek és oxidatív stressz	40
3.4. Triptofán eredetű bakteriális metabolitok	43
3.4.1. Az indolpropánsav és az indoxil szulfát élettani szerepe.....	47
4. Célkitűzések	50
5. Anyagok és módszerek.....	51
5.1. Reagensek.....	51
5.2. Sejtvonalak és sejttenyésztés.....	51
5.3. <i>In vitro</i> sejtproliferációs vizsgálatok	52
5.3.1. Szulforodamin B teszt	52
5.3.2. Kolónia formálás vizsgálat.....	52
5.4. Citotoxicitás meghatározása.....	53
5.5. Apoptózis vizsgálata AnnexinV-FITC-propidium-jodid kettős jelöléssel.....	53
5.6. Impedancia alapú sejtanalízis.....	53
5.7. Immuncitokémia.....	54
5.8. Sejtmigrációs teszt.....	54
5.9. Az emlődaganat őssejtek vizsgálata	55

5.9.1. Oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás mérés	55
5.9.2. Aldehyd-dehidrogenáz (ALDH) pozitívítás mérés	55
5.10. A lipidperoxidáció vizsgálata.....	56
5.11. mRNS izolálás, reverz transzkripció és RT-qPCR.....	56
5.12. Fehérje extrakció és Western blot	58
5.13. Humán székletfehérje lizátumok előállítása.....	59
5.14. E. coli TnaA meghatározása.....	60
5.15. Állatkísérletek	61
5.15.1. Kísérleti állatok	61
5.15.2. 4T1 emlőtumor xenograft létrehozása BALB/c egerekben.....	62
5.15.3. IPA kezelés.....	62
5.15.4. IS kezelés.....	62
5.15.5. Tumor infiltrációs kapacitás, tumor tömeg és TIL meghatározása	63
5.16. Humán mintákon végzett epidemiológiai vizsgálatok	64
5.16.1 Humán széklet DNS minták vizsgálata (Betegcsoport 1.)	64
5.16.2. Az IPA és IS hatásait közvetítő receptorok kifejeződése emlőtumoros betegek szövetmintáiban (Betegcsoport 2.)	66
5.16.3. E. coli TnaA expresszió meghatározása humán széklet fehérje mintákban (Betegcsoport 3.)	67
5.17. <i>In silico</i> analízis.....	68
5.18. Statisztikai analízis.....	68
6. Eredmények.....	69
6.1. Antitumor hatású indolpropánsav jellemzése emlőkarcinómákban.....	69
6.1.1. Az indolpropánsav szupplementáció csökkenti az emlőrák progresszióját <i>in vivo</i>	69
6.1.2. Az indolpropánsav antineoplasztikus hatásai.....	71
6.1.3. Az indolpropánsav-mediálta citosztatikus és antineoplasztikus hatásokat reaktív intermedierek termelése okozza	78
6.1.4. Az indolpropánsav hatásait Aril-Hidrokarbon Receptor (AHR) és Pregnán X-Receptor (PXR) közvetíti	80
6.2. Citosztatikus tulajdonságú indoxil szulfát karakterizálása emlődaganatokban	82
6.2.1. Az indoxil szulfát kezelés csökkenti az emlőrák agresszivitását egérmodellben ..	82
6.2.2. Az indoxil szulfát antineoplasztikus hatásai	85
6.3. Humán emlőtumoros betegek mintáin végzett tanulmányok	97
6.3.1. Az AHR és a PXR expressziója pozitív korrelációt mutat az emlőtumoros betegek túlélésével.....	97

6.3.2. A SULT és a Cyp2E1 magasabb expressziója korrelál az emlődaganatos betegek hosszabb túlélésével	100
6.3.3. Az AHR és a PXR kifejeződése emlőtumoros betegek szövetmintáiban (Betegcsoport 2.)	106
6.3.4. A bakteriális indol bioszintézis csökken a korai stádiumú emlődaganatokban ...	108
6.3.5. Az E. coli TnaA székletfehérje expressziója korrelál a tumort infiltráló limfociták számával (Betegcsoport 3.)	111
7. Megbeszélés	112
7.1. Az indolpropánsav és az indoxil szulfát citosztatikus hatása emlődaganatban	112
7.2. Megfigyeléseink relevanciája humán emlőtumoros betegek vonatkozásában.....	117
8. Összefoglalás.....	119
9. Summary	121
10. Irodalomjegyzék.....	123
11. Tárgyszavak	137
12. Köszönetnyilvánítás	138
13. Publikációs lista.....	140
14. Függelék.....	142

1. Rövidítések

4HNE	4-hidroxinonenál
5-HT	szero-tonin (5-hidroxi-triptamin)
AANAT	aril-alkil-amin-N-acetil-transzferáz
ACC	acetyl-Coa-karboxiláz
AHR	aril-hidrokarbon receptor
Akt	protein kináz B
ALDH	aldehid-dehidrogenáz
AML	akut mieloid leukémia
AMP	adenozin-monofoszfát
AMPK	adenozin-monofoszfát aktivált protein kináz
ANOVA	variancia-analízis
ArAT	aromás-aminosav-aminotranszferáz
AREG	amfiregulin
ASMT	acetyl-szerotonin-metiltranszferáz
ATP	adenozin-trifoszfát
BCA	bikinolinil-dikarbonsav
BRCA1/2	emlőrák 1/2 gén
BSA	szarvasmarha szérum albumin
CAEC	karcinóma-asszociált endotél sejt
CAF	karcinóma-asszociált fibroblaszt
cAMP	ciklikus adenozin-monofoszfát
CAP	katabolit gén aktivátor fehérje
CAT	kataláz
CD	csopordetermináns fehérjék (cluster of differentiation)
Cyp2E1	citokróm P 450 2. család E alcsoad-1
DBD	DNS-kötő domén
DNS	deoxiribonukleinsav
DTT	ditiotreitól
E2F1	E2F transzkripciós faktor-1
E-cadherin	epiteliális cadherin
ECAR	extracelluláris savasodási ráta

ECM	extracelluláris mátrix
EGF	epidermális növekedési faktor
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor
EMT	epiteliális-mezenchimális tranzíció
ER	ösztrogén receptor
ErbB/HER	humán epidermális növekedési faktor receptor
EREG	epiregulin
FBS	fötális marha szérum
FGF	fibroblaszt növekedési faktor
Fgfbp1	fibroblaszt növekedési faktor kötő protein-1
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FIDH	fenil-laktát-dehidrogenáz
FN	fibronektin
FOXO1	forkhead box O1 fehérje
GPX2/3	glutation-peroxidáz 2/3
GR	glutation-reduktáz
GSH	redukált glutation
GSSG	glutation diszulfid
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HER2	humán epidermális növekedési faktor receptor 2
IA	indol-3-akrilsav
IAA	indol-3-ecetsav
IAAld	indol-3-acetaldehid
IAld	indol-3-aldehid
IAM	indol-3-acetamid
IC	immunsejt
IDO	indolamin-2,3-dioxigenáz
IFN- γ	interferon- γ
IL-10	interleukin-10
ILA	indol-3-laktát
ILC	invazív lobuláris karcinóma
iNOS	indukálható nitrogén-monoxid szintáz
IPA	indolpropánsav/indol-3-propánsav
IPYA	indol-3-piruvát

IS	indoxil szulfát
KEAP1	Kelch-like ECH-associated protein 1
LBD	ligand-kötő domén
log2FC	fold change érték kettes alapú logarimusa
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz
MD	minimal disease
MDA	malondialdehid
MET	mezenchimális–epiteliális tranzíció
MMP	mátrix metalloproteináz
MMP9	mátrix metalloproteináz 9
mTOR	mammalian target of rapamycin
NAC	N-acetil-cisztein
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
N-cadherin	neurális cadherin
NF-κB	nukleáris faktor kappa-B
NO	nitrogén-monoxid
Notch1	Notch transzmembrán receptor-1
NRF2	eritroid nukleáris faktor 2
NST	duktális karcinóma nem speciális típus
NTyr	nitrotirozin
O ₂ ^{•-}	szuperoxid anion
OCR	oxigénfogyasztási ráta
OH•	hidroxil gyök
ONOO-	peroxinitrit
pACC	foszforilált acetyl-Coa-karboxiláz
PAGE	poliakrilamid gélelektroforézis
pAMPK	foszforilált adenzin-monofoszfát aktivált protein kináz
PBS	foszfát-puffer
PCR	polimeráz lánreakció
PDGF	trombocita eredetű növekedési faktor
PGC1α/β	peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma koaktivátor-1α/β
PI	propidium-jodid
PI3K	foszfatidil-inozitol-3-kináz
PMSF	fenil-metil-szulfonil-fluorid

PR	progeszteron receptor
PS	foszfatidil-szerin
PXR	pregnán X-receptor
qPCR	kvantitatív polimeráz lánreakció
Rb	retinoblasztóma
RNI	reaktív nitrogén intermedier
RNS	ribonukleinsav
ROS	reaktív oxigén származékok
RT	reverz transzkripció
SDF-1	sztrómasejt eredetű faktor-1
SDS	nátrium-dodecil-szulfát
SEM	mintaközép hiba (standard error of mean)
Slug	snail család transzkripciós represszor-2
Snail	snail család transzkripciós represszor-1
SOD3	szuperoxid-diszmutáz 3
SPF	specifikus patogén mentes
SRB	szulforodamin B
SULT1/2	szulfotranszferáz 1A család -1/2
TBA	tiobarbitursav
TBARS	tiobarbitursav-reaktív termékek
TBS	tris pufferelt sóoldat
TCA	triklór-ecetsav
TDC1	triptofán-dekarboxiláz 1
TDO	triptofán-2,3-dioxigenáz
TGF α/β	transzformáló növekedési faktor α/β
TIL	tumor infiltráló limfocita
TMA	szöveti mikroarray
TMO	triptofán-monooxigenáz
Tna	triptofanáz
TnaA	sav indukálható triptofanáz
TnaB	triptofán-specifikus transzporter
tnaCAB	triptofanáz operon
TNBC	tripla negatív emlődaganat
TNF- α	tumornekrózis-faktor- α

TP53	tumor protein 53
TPH1	triptofán hidroxiláz 1
TRP	triptofán
Twist1	twist család transzkripció faktor-1
VEGF-A	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A
Vim	vimentin
WHO	Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation)
Wnt	wingless jelátviteli út
ZEB1/2	cink-ujj E-box kötő homeobox-1/2
ZO-1	zonula occludens-1
β -catenin	catenin beta-1

2. Bevezetés

Az emberi szervezetben, a külső és belső felszíneken számos baktériumfaj él, mely szimbióta, kommenzális és patogén mikroorganizmusok összessége a mikrobióta, kollektív genomjára a mikrobiom kifejezést használjuk. Külső és belső tényezők együttesen (életkor, étrend, higiénia, genetikai faktorok, immunrendszer, antibiotikumok és xenobiotikumok szedése stb.) határozzák meg a mikrobiom összetételét. Az emésztőrendszeri mikrobióta szabályozó szerepe kulcsfontosságú a gazdaszervezet egészségének fenntartásában és a betegségek megelőzésében. Az emésztésben, a metabolizmusban, a gyulladással járó kórfolyamatokban, az immunreakcióban, a bélrendszer endokrin működésében, a sejtproliferációs és érési folyamatokban, az energiaháztartás szabályozásában, a neurológiai jelátviteli folyamatokban, a patogén flóra visszaszorításában, a vitaminok és enzimek szintézisében, valamint a méregtelenítésben egyaránt meghatározó szerepet játszanak a gasztrointesztinális rendszert kolonizáló mikroorganizmusok [1].

2.1. A mikrobiom szerepe tumorok indukciójában és működésében

A mikrobióta dinamikus egységet képez a gazdaszervezettel, kétirányú interakciókon keresztül befolyásolja az egészségügyi állapotot, élettani folyamatokat és patológiás kórképek kialakulását. A normális mikroflóra egyensúlyának felborulása a mikrobiom összetételének eltolódásához és működésének módosulásához vezet. Az emésztőrendszeri mikrobiom diszbiózisát számos kórkép megjelenésével összefüggésbe hozták, így gyulladással [2] és anyagcsere [3] rendellenességekkel, kardiovaszkuláris [4] és neurodegeneratív betegségekkel [5], továbbá bél- [6], húgyúti-, prosztatata- [7], tüdő- [8], hasnyálmirigy- [9], gége- [10], bőr- [11], méhnyak- [12] és emlődaganatos megbetegedések [13-16] kialakulásával. Az onkológiai kórképekkel kapcsolatban álló mikrobiális diszbiózist onkobiózistak nevezük. Az emésztőrendszeri mikrobiom egyensúlyának zavara patogén folyamatokat indukál, elősegítve daganatos kórképek progresszióját. Ennek ellenére még számos összefüggés és patomechanizmus tisztázatlan, kevés ismeret áll rendelkezésre arról, hogy a mikrobiomban bekövetkező változások a karcinogenezis kiváltó oka vagy következménye-e [17].

A neoplasztikus sejtekre jellemző folyamatokat elsőként Douglas Hanahan és Robert A. Weinberg foglalta össze [18], melyben a rákos sejtek korlátlan proliferációs képességét elősegítő biológiai változásokat összegezték. Az onkobiom tumorok indukciójában betöltött

szabályozó szerepe sokrétű. Többek között az onkobiózis epiteliális-mezenchimális tranzíciót (EMT) indukál [19-21], elősegíti a tumorsejt migrációt és inváziót [19], támogatja a tumor vaszkularizációját [20], korlátozza a daganatellenes immunválaszt [20, 22], széleskörű metabolikus változásokat idéz elő [19, 20], megváltoztatja a rákos őssejtek differenciálódását [19], valamint tartós gyulladást kiváltva DNS-károsodást és genom instabilitást okoz [23, 24], mely mutációk felhalmozódásán keresztül karcinogenezishez vezet. Ezek az onkogén folyamatok támogatják a tumor növekedését, a rákos sejtek beszűrődését a környező szövetekbe [19, 20], valamint metasztázisok kialakulását [19, 20, 22, 25].

A mikrobiom diszbiózisával asszociált tumorerőssége elsősorban a mikrobákkal direkt kapcsolatban álló szerveket érintik. Ugyanakkor több tanulmány megerősítette, hogy a bélrendszerben keletkező bakteriális metabolitok a véráram útján eljutva, az emberi test távoli szerveiben is hatást gyakorolhatnak [26]. A rövid szénláncú zsírsavak, a litokólsav és a kadaverin citosztikus hatásúak emlőtumor sejtekre [19, 20, 26, 27]. Továbbá emlődaganatos megbetegedésekben csökkent fajgazdagságú mikrobiomot mutattak ki [20, 28], mely a citosztikus metabolitok termelésének csökkenésére utalhat. Értekezésemben a mikrobiom összetételében bekövetkezett változások és az emlőrák kialakulása, valamint progressziója közötti összefüggéseket vizsgáltuk.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. A humán mikrobiom

Az emberi test felszínén és a testüregekben (többek között a bőrön, szájbán, orrban, hüvelyben, belekben) élő mikroorganizmusok összessége által alkotott ökológiai rendszer a mikrobióta, mely elnevezés Joshua Lederberg Nobel-díjas, amerikai molekuláris genetikus nevéhez fűződik. Az emberi mikrobiomot több milliárd mikroorganizmus alkotja. Ezen bakteriális közösség diverzitása és funkciója meghatározza a szervezet egészséges anyagcseréjének kialakulását, a homeosztatisz egyensúly felbomlása patogén folyamatokat indíthat el. A mikrobiom egyedi összetételt mutat az egyes szervekben, valamint individuális variabilitással is jellemezhető, ami az egyedek közötti különbségekhez vezet [29]. Az utóbbi évtizedekben előtérbe került a mikrobiom egészségfenntartó és egyes betegségek, mint például malignus tumorok kialakulásában betöltött szerepe. Illetve, nagyfokú változatossága következtében, a mikrobiom potenciális biomarker lehet [30].

3.1.1. Diszbiózis – onkobiózis

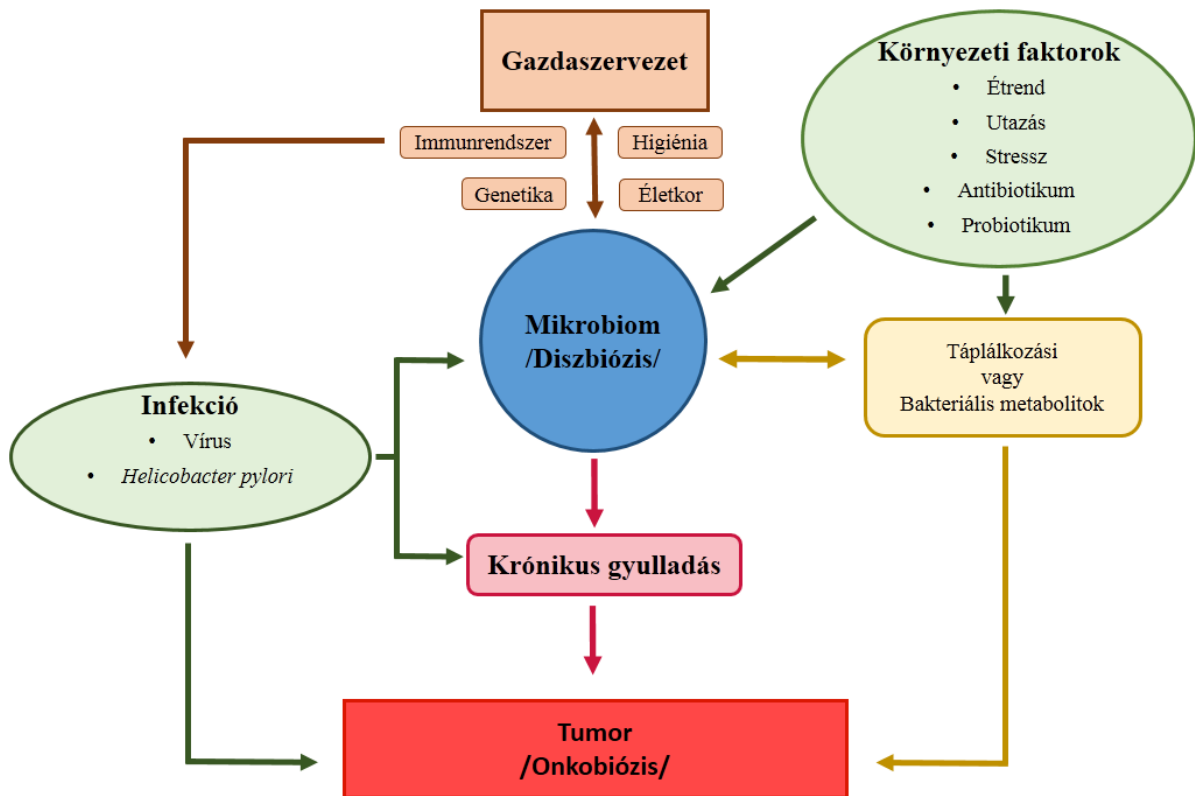
Az emberi gasztrointesztinális rendszerben nagyszámú, becslések szerint 10^{14} baktérium fordul elő [29]. A MetaHit mikrobiom tanulmányban mintegy 3,3 millió mikrobiális gént írtak le [31], illetve további metaanalízis vizsgálatok több, mint 9,7 millió bakteriális gént azonosítottak egészséges felnőttek székletében [32]. Az emésztőrendszer ökoszisztémája nagyfokú diverzitással jellemezhető, mely a homeosztatisz egyensúly megőrzésében meghatározó faktor.

Molekuláris filogenetikai vizsgálatokban azonosították a bél mikrobiomban domináló baktérium törzseket, a legfontosabbak a Gram-negatív *Bacteroides*, valamint a Gram-pozitív *Firmicutes*, melyek a bélflóra 90%-át reprezentálják, míg az *Actinobacteria*, a *Fusobacteria*, a *Proteobacteria*, a *Verrucomicrobia*, valamint a *Tenericutes* kevésbé gyakori törzsek. A legjelentősebb nemzetségek a következők: *Bacteroides*, *Alistipes*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Ruminococcus*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, valamint a *Bifidobacterium* és *Streptomyces* [33, 34].

A bélflóra szabályozza a táplálék lebontást, részt vesz az epesavak és a szterolok metabolizmusában, az energia homeosztázis szabályzásában, vitaminok és enzimek előállításában, valamint hatást gyakorol az adipociták leptin és a máj glükóz termelésére [1, 35, 36]. A mikrobiom képes neurotranszmitterek és neurotransmitter-szerű anyagok szintézisére, melyeken keresztül befolyásolhatja az idegrendszer működését (úgynevezett bél-agy tengely). A mikrobiom összetétele befolyásolja az epiteliális sejtek proliferációját és differenciációját, továbbá immunfunkciókat lát el és segít fenntartani az intesztinális barrier épségét. A mikrobióta fontos szerepet játszik az immunsejtek érésében, allergiás reakciók megelőzésében, illetve a kórokozó mikroorganizmusok elleni védelemben [1]. A mikrobiális ökoszisztéma változatos regulatórikus funkciókat lát el, mely kulcsfontosságú a gazdaszervezet egészségének fenntartásában és patológiás folyamatok prevenciójában.

Minden szerv eltérő mikrobiális közösséggel rendelkezik, mely szervspecifikus hatásukra utal krónikus betegségek és onkológiai kórképek patomechanizmusában. Továbbá az egyéni variabilitás következtében a személyes mikrobiom összetétel szintén hozzájárulhat a patológiás folyamatok közti egyedi különbségekhez [29].

A béltraktus mikrobiótát külső és belső faktorok egyaránt modulálják, melyek közül a legfontosabbak az életkor, a stressz, genetikai tényezők, higiénia, illetve az életmód, beleértve a táplálkozást, fizikai aktivitást, és dohányzást. Emellett probiotikum- és antibiotikum expozíció, valamint patogének inváziója szintén befolyásolhatja a mikrobiom összetételét [1]. Az emésztőrendszeri mikrobiom változatos összetételének és stabilitásának abnormális megváltozása következtében diszbiózis alakulhat ki. A mikroflóra egyensúlyának zavarai patológiás folyamatokat indukálhatnak, szabályozatlan sejtmetabolizmus és DNS-károsodást okozó krónikus gyulladás előidézésével meghatározó szereppel bír neurológiai betegségekben, anyagcsere-, szív- és érrendszeri rendellenességekben, valamint emésztőrendszeri kórképekben [37]. Számos tanulmányban megfigyelték, hogy a bakteriális diverzitás csökkenése daganatos kórképekkel társul (1. táblázat), a neopláziára jellemző transzformált mikrobiomot onkobiomnak nevezzük (1. ábra) [9, 13, 14, 38].



1. ábra A gazdaszervezet – mikrobiom diszbiózis – onkobiózis kapcsolata

A gazdaszervezet és a mikrobiom között dinamikusan és kétirányúan áll fenn a kapcsolat, számos külső (környezeti faktorok) és belső tényező (gazdaszervezet individuális sajátosságai) egyaránt befolyásolhatja a gasztrointesztinális mikrobiomot. A mikrobiális összetétel megváltozása és instabilitása következtében diszbiózis alakulhat ki, mely patológiai folyamatok indukcióján keresztül, többek között krónikus gyulladást előidézve rosszindulatú daganatok kialakulásához vezethet. Az onkológiai kórképekkel összefüggésbe hozható mikrobiális diszbiózist onkobiózisnak nevezzük [39].

1. táblázat Humán metagenomikai vizsgálatokban azonosított mikrobiom diszbiózis és onkológiai kórképek közötti összefüggés

Az első oszlop a karcinóma típusát mutatja, míg a következők egyes neoplasztikus betegségekkel asszociált mikrobiális összetétel változást jelölik. Bizonyos baktérium fajok jelenléte megnövekedett vagy csökkent emlőtumoros betegek szövetmintáiban [16, 40-42].

Rosszindulatú elváltozás típusa	Diszbiózis-onkobiózis	
	Megnövekedett baktériumfajok	Csökkent baktériumfajok
Nyelőcső	<i>Streptococcus</i> <i>Prevotella</i> <i>Veillonella</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
Kolorektális	<i>Fusobacterium</i> <i>Selenomonas</i> <i>Leptotrichia</i>	<i>Lactobacillus</i> <i>Microbacterium</i> <i>Roseburia</i>
Fej- és nyak	<i>Fusobacterium</i> <i>Prevotella</i> <i>Gemella</i>	<i>Streptococcus</i> <i>Rothia</i>
Prostata	<i>Propionibacterium acnes</i>	
Hasnyálmirigy	<i>Enterobacteriaceae</i> <i>Pseudomonadaceae</i> <i>Moraxellaceae</i> <i>Enterococcaceae</i>	
Emlő	<i>Alistipes</i> <i>Sphingomonas</i> <i>Methylobacterium</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Streptococcus</i>	

Egyes bakteriális kórokozók etiológiai tényezőként karcinogenezist válthatnak ki [43], mint a *Helicobacter pylori* fertőzés esetében, mely gyomorhurutot, fekélyt, végül gyomorrák kialakulását eredményezi [44, 45]. Epehólyag rákkal asszociálták bizonyos *Salmonella* törzsek okozta krónikus infekciót [46]. Metagenom vizsgálatok jellegzetes mikrobiális eltéréseket mutattak számos rosszindulatú elváltozásban, melyet elsősorban az intenzíven kolonizált bél- és urogenitális traktus, valamint tüdőkarcinómák esetében figyeltek meg, szemben az egészséges kontroll csoporttal [40]. A mikrobiom tumorgenezisben betöltött funkcionális jelentőségét állatkísérletekben is igazolták. Csíramentes egereken végzett vizsgálatokban

megegerősítették a mikrobiális diszbiózis tumor-promótáló szerepét bőr, vastagbél, máj, tüdő és emlődaganatok esetében is [38].

Mikrobiális diszbiózist elsősorban a bakteriális közösséggel közvetlen kapcsolatban álló szervekkel asszociált onkológiai kórképekben írtak le. Azonban a bakteriális metabolitok a keringéssel távoli szervekbe is eljuthatnak, ahol kifejthetik hatásukat [26]. Az ismert onkogén bakteriális metabolitok egy része a mikrobák módosítatlan intermedier metabolizmus közti-termékei, míg azonosítottak a gazdaszervezet által tovább módosított metabolitokat is.

3.1.2. Az onkobiom kapcsolata az emlődaganatos megbetegedésekkel

Számos neoplasztikus betegséggel, köztük az emlőrák kialakulásával is összefüggésbe hozták a mikrobiális közösség összetételének megváltozását. Jelentős különbséget találtak a gasztrointesztinális traktus [13, 14, 28, 47-51], az emlő [15, 42, 52, 53], valamint a szájüregi- és húgyúti mikrobiom összetételében emlődaganatos betegeknél [53] (2. táblázat).

2. táblázat Az emésztőrendszer, az emlőszövet, a szájüregi- és a húgyúti mikrobiom domináns baktérium törzsei [15, 33, 34, 54-56]

Mikrobiom összetétel			
Bél legjelentősebb baktérium törzsei	Emlő leggyakoribb baktérium törzsei	Szájüreg leggyakoribb baktérium törzsei	Húgyút leggyakoribb baktérium törzsei
<i>Bacteriodes</i>	<i>Bacteriodes</i>	<i>Bacteriodes</i>	<i>Bacteriodes</i>
<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>	<i>Firmicutes</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinobacteria</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>	<i>Proteobacteria</i>
<i>Fusobacteria</i>		<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteria</i>
<i>Verrucomicrobia</i>			
<i>Tenericutes</i>			
		<i>Spirochaetes</i>	

A mikrobiom változások elsősorban a bakteriális közösség sokféleségének és diverzitásának csökkenését okozták emlőrákos betegeknél, egészséges kontrollokhoz képest [13, 14, 28, 48, 50, 57, 58]. Ezen változások összefüggést mutattak a minták földrajzi származásával [42], valamint a molekuláris altípussal. A tripla negatív emlőrákos esetek mikrobiális összetétele eltér a többi típustól [47, 48], mely korrelál a betegség gráduásával [52] és agresszivitásával is [15] (3. táblázat).

3. táblázat A megváltozott mikrobiális összetétel összefüggésben áll az emlőrák stádiumával, grádusával, valamint egyes altípusaival [14, 15, 19, 20, 48, 52, 59, 60]

Mikrobiom összetétel változás emlődaganatokban		
Megnövekedett mennyiségű baktériumfajok	Csökkenett mennyiségű baktériumfajok	Megfigyelés
<i>Clostridiaceae</i> <i>Ruminococcaceae</i> <i>Faecalibacterium</i>	<i>Dorea</i> <i>Lachnospiraceae</i>	Posztmenopauzás emlőrákos nőknél megváltozott a széklet mikrobiom összetétele egészséges nőkhöz képest.
<i>Fusobacterium</i> <i>Atopobium</i> <i>Gluconacetobacter</i> <i>Hydrogenophaga</i> <i>Lactobacillus</i>		Az emlőtumor agresszivitása korrelál az emlő mikrobiom kevésbé gyakori baktériumfajainak fokozott előfordulásával.
<i>Propionibacteriaceae</i> <i>Micrococcaceae</i> <i>Caulobacteraceae</i> <i>Rhodobacteraceae</i> <i>Nocardioideae</i> <i>Methylobacteriaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i>	<i>Bacteroidaceae</i>	A mikrobiom összetétele megváltozik rosszindulatú emlődaganatokban, mely összefüggést mutat a szövettani grádussal.
<i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Arcanobacterium haemolyticum</i> <i>Peptoniphilus indolicus</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Propionibacterium jensenii</i> <i>Capnocytophaga canimorsus</i>		Tripla negatív emlőrákos esetekben egyedi mikrobiális összetételt mutattak ki.
	<i>Clostridium sordelli</i> <i>Pseudomonas putida</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Csökkenett bakteriális diverzitás, elsősorban korai klinikai stádiumú betegek székletmintáiban.
	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Hafnia alvei</i>	Jelentős diverzitás csökkenés, mely 0. és I. klinikai stádiumú emlőrákos esetek székletmintáiban a legkifejezettebb.
<i>Bacteroidetes</i> <i>Clostridium coccoides</i> <i>Clostridium leptum</i> <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> <i>Blautia sp.</i>		Egyes baktériumfajok szignifikánsan magasabb mennyisége II./III. klinikai stádiumú emlődaganatos betegekben, összevetve 0. és I. stádiumú esetekkel.
<i>Citrobacter koseri</i> <i>Acinetobacter</i> <i>Enterococcus gallinarum</i> <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Erwinia amylovora</i> <i>Actinomyces sp.</i> <i>Salmonella enterica</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Eubacterium rightsens</i> <i>Roseburia inulinivorans</i>	Fokozott emésztőrendszeri mikrobiom fajgazdagság posztmenopauzás emlőrákos betegeknél egészséges kontrollokhoz képest.

Több bizonyíték utal arra, hogy a mikrobiom változásoknak valós patológiai szerepe lehet az emlő adenokarcinómában. Az antibiotikumok használata csökkenti a mikrobiális diverzitást és ezzel párhuzamosan növeli az emlőrák kialakulásának és kiújulásának kockázatát, amit állatmodellekben [61-63] és humán epidemiológiai vizsgálatokban is kimutattak [63-65]. Állatokban a *Cephalosporin* antibiotikum alkalmazása során csökkent a bakteriális közösség sokfélesége, fokozva az emlőtumor kialakulásának esélyét. Emlőtumor sejtekkel graftolt egérmodellben a *Vancomycin*, a *Neomycin*, a *Metronidazole*, az *Amphotericin* és az *Ampicillin* kombinált terápia elősegítette a tumor progresszióját [61], ugyanakkor a probiotikumok csökkentették az emlőrák előfordulásának kockázatát [66, 67]. Ezen megfigyelések arra utalnak, hogy az onkobiózis központi szerepet játszik az emlőrák patomechanizmusában.

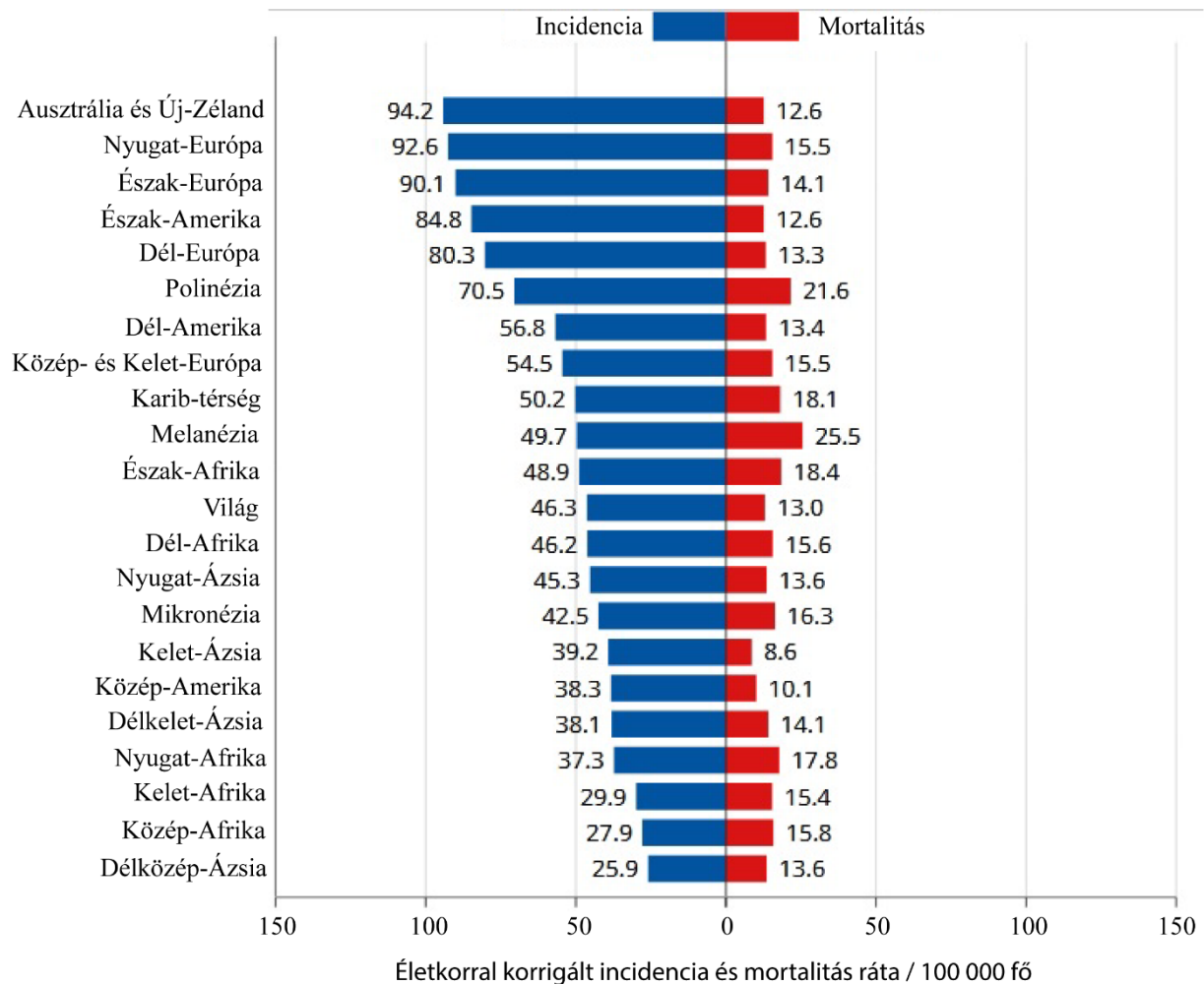
3.2. Az emlő rosszindulatú daganatai

3.2.1. Epidemiológia

A rosszindulatú tumor többszörösen összetett sejtélettani és genomiális módosulások eredményeként kialakuló szisztémás betegség [68, 69], mely hazánkban is egyre súlyosbodó egészségügyi problémát jelent. A Magyar Nemzeti Rákregiszter adatai alapján 2017-ben több, mint 100 000 új daganatos beteget azonosítottak, melyből 8981 esetben az emlő rosszindulatú daganatát regisztrálták [70].

Fejlett országokban a legnagyobb prevalenciájú malignus megbetegedés az emlőrák, mely a második leggyakoribb haláloknak tekinthető a nők körében [71]. Évente megközelítőleg egy millió beteget diagnosztizálnak, az életkorral korrigált becsült éves mortalitás 23,1 haláleset 100 000 lakosra nézve Európában [72]. Az American Cancer Society által közzétett 2019-es emlőrák jelentés alapján 2012 és 2016 között évente 0,3 % -al nőtt az emlőrák incidenciája [73], ugyanakkor a halálozási arány jelentősen csökkent az elmúlt évtizedekben a rendszeres szűrés elterjedésével [74]. Az Egyesült Államokban az újonnan diagnosztizált invazív emlőrákos esetek száma 2020-ban 276 480 fő volt, míg a becslések szerint 48 530 *in situ* esetet rögzítettek. A statisztikai adatok alapján, 2020-ban várhatóan 42 170 nő fog emlőrák következtében elhunyni az Egyesült Államokban [75]. Jelentős földrajzi és gazdasági megoszlást mutat az emlőrák incidenciája, a fejlett országokban magasabb előfordulási kockázatot figyeltek meg [76] (2. ábra). Azonban a szűrőprogramok népszerűsítése és következményesen a korai

felismerés miatt az emlőrák öt éves túlélési aránya meghaladhatja a 80% -ot a fejlett világban [77].



2. ábra Emelőrák statisztikai adatok 2019-ben

A Global Cancer Observatory szabadon hozzáférhető adatbázis alapján készült oszlopdiaagram, mely az életkorral korigált emlőrák incidenciája és mortalitása arányát mutatja 100 000 női lakosra vonatkoztatva, 2019-ben világszerte [78].

A rosszindulatú emlődaganatoknak számos kockázati faktora ismert, ennek ellenére az esetek jelentős részének az oka tisztázatlan marad [79]. A betegség kialakulásának elsődleges rizikó faktorai a nem, az életkor és a genetikai háttér. Az emlőrák előfordulási gyakorisága jelentősen megemelkedik az életkorral, a betegség elsősorban a posztmenopauzális nőket érinti. Tartós hormon expozíció, mint például orális fogamzásgátlók szedése, hormonpótló terápiák, valamint korai menarche vagy a késői menopauza szintén növeli az emlőrák kockázatát [79].

Genetikai és epigenetikai faktorok, köztük a BRCA1 és BRCA2 génmutációk, magas epidermális növekedési faktor receptor (EGFR), humán epidermális növekedési faktor receptor (HER2) kifejeződés, valamint pozitív családi anamnézis vagy egyéb neoplastikus elváltozások a kórtörténetben hozzájárulhatnak az emlőrák kialakulásához. Továbbá az obezitás, rendszeres dohányzás és alkoholfogyasztás fokozott kockázatnak minősül [80]. Végül a sűrű emlőállományt szintén az emlőrák független kockázati tényezőjeként azonosították [72, 81]. Ezzel szemben a terhesség, szoptatás, rendszeres fizikai aktivitás és káros szenvedélyektől mentes egészséges életmód csökkentheti az emlőrákra való fogékonyságot [82].

3.2.2. Emlődaganat osztályozási rendszerek

Az emlőrák nagymértékű heterogenitást mutató betegség, ezért a hatékony osztályozási rendszerek alkalmazása, beleértve a szövettani típus, Nottingham-grádus, TNM stádium, illetve a receptor státusz meghatározása kiemelt jelentőségű. A prediktív és a prognosztikus markerek ismerete kulcsfontosságú a megfelelő terápia beállításához.

A rosszindulatú emlődaganatok sejteredetük szerint két fő csoportba sorolhatóak, megkülönböztetnek hám eredetű karcinómát, valamint mezenchimából kiinduló szarkómát. Hisztopatológiai osztályozásukat az Egészségügyi Világszervezet (World Health Organisation - WHO) által előírt kritériumrendszer alapján végzik [83]. Az emlő rosszindulatú elváltozásai elsősorban hám eredetűek, többségükben duktális vagy lobuláris karcinómák *in situ* vagy invazív formái. Az *in situ* karcinómák jellegzetessége, hogy a malignus sejtek csak az emlő duktuszokon belül helyezkednek el és nem infiltrálják a bazális membránt. Ezzel ellentétben az invazív daganatok képesek a bazális membránon áttörni, majd a nyirok- és vérkeringésbe jutva távoli metasztázisokat képezni [84]. Az invazív emlődaganatok jelentős része duktális karcinóma, a WHO által meghatározott beosztás alapján nem speciális típusként (NST) azonosított daganattípus [83]. A rossz prognózisú emlő szarkóma előfordulása kevésbé gyakori [85].

A szövettani grádus a daganatsejtek differenciáltsági fokát jellemző prognosztikai faktor. A Nottingham-grádus értékeli a tubulus formálási tendenciát, figyelembe veszi a nukleáris pleomorfizmust (sejtmag alak, méret, magvacskák száma), a mitotikus aktivitást (mitózis index), valamint a nyirok- és érbetörést. Ezek alapján az 1-es grádusú tumorok jól differenciált rákos sejteket tartalmaznak, kis mértékben beszűrődnek a sztrómába, valamint nem mutatnak mitotikus aktivitást. A 2-es grádusú tumorok közepesen differenciált daganatok,

a rákos sejtek a mirigyállományban is megjelennek, illetve mérsékelt mitotikus sebességgel jellemezhetőek. A rosszul differenciált tumorokat a 3-as grádusba sorolják, melynél a daganattömeget amorf neoplasztikus sejtek alkotják, s jelentős nukleáris atypiát és magas mitotikus rátát mutatnak, továbbá kifejezetten rossz prognózissal társulnak [86].

A betegség várható lefolyásának megítéléséhez elsődleges a daganat TNM stádiumának meghatározása, a primer tumor mérete, a regionális nyirokcsomók érintettsége és a távoli áttétek jelenléte alapján [87]. A 0. stádium rákmegelőző állapotot vagy *in situ* karcinómát (duktális vagy lobuláris) jelent, míg az 1-3. stádiumot a primer tumor mérete és a nyirokcsomóba történő beszűrődés determinálja, ugyanakkor áttétek nem fedezhetőek fel. A metasztatikus emlőrákot 4. stádiummal jelölik, melyet kedvezőtlen prognózis és túlélési arány jellemez [88].

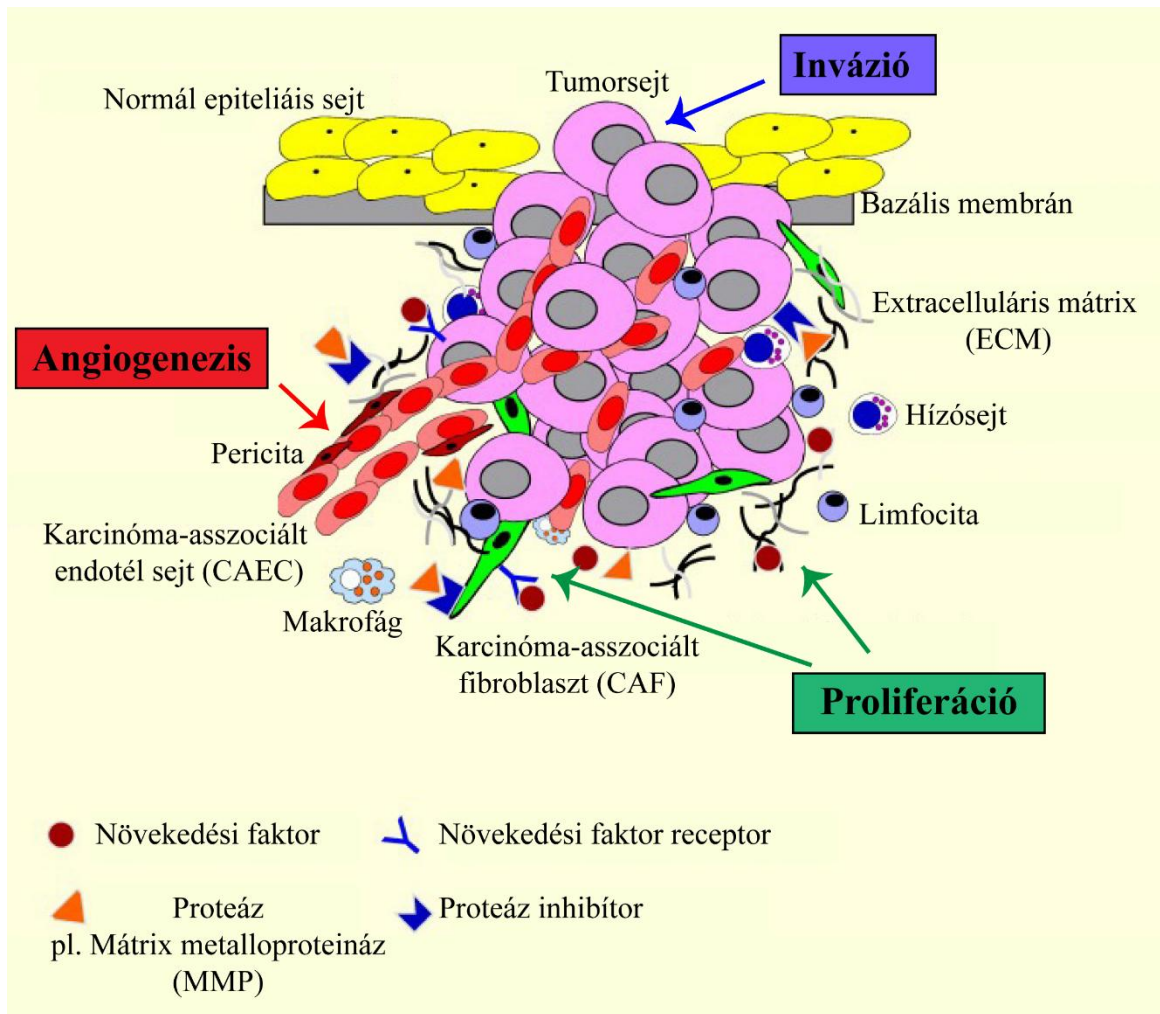
Az emlőrák diagnosztikája során a betegség prognózisának megítéléséhez, valamint az adjuváns kezelések alkalmasságának és hatékonyságának megállapításához nélkülözhetetlenek az immunhisztokémiai módszerek. Az emlőtumor sejtek felszínén a hormonreceptorok kifejeződése, mint például a HER2 (EGFR2), az ösztrogén vagy a progeszteron receptorok terápiás prediktív értékű információt adnak, meghatározzák a kezelési tervet. Az ösztrogén receptor (ER+) és progeszteron receptor (PR+) pozitív daganatokat összességében kedvezőbb kimenetel jellemzi, szemben a HER2 gén fokozott expressziója negatív prognosztikus marker [72]. A rosszindulatú emlődaganatok adjuváns kezelése során ezen receptorok targetként szolgáltak az első célzott terápiák kifejlesztéséhez [89]. Ellenben a tripla negatív (ER-, PR-, HER2-) esetek célzott kezelési modalitás hiányában jelentősen rosszabb prognózissal jellemezhetőek [90]. Az emlőtumorok immunfenotípusuk alapján a következő molekuláris altípusokba sorolhatóak [91]:

- Luminális A: ER +, PR +, HER2-, alacsony proliferációs aktivitás
- Luminális B (HER2-): ER +, PR-, HER2-, magas proliferációs aktivitás
- Luminális B (HER2 +): ER +, PR +, HER2 +, alacsony/magas proliferációs aktivitás
- HER2 +: ER- vagy PR-, HER2 +
- Bazális típus (tripla negatív): ER-, PR-, HER2-, gyakori BRCA1 génmutáció

3.2.3. Tumor mikrokörnyezet

A daganatokat nem csak homogén malignus sejtek alkotják. A rosszindulatú daganatok összetett abnormális szervek, melyek komplexitása a normál egészséges szövetekének felel meg. A tumoros mikrokörnyezet nagyfokú heterogenitást mutat, a nem malignus sejteknek is meghatározó szerepet tulajdonítanak a tumor progresszióban és a terápiás hatékonyságban [92]. A tumorok biológiai viselkedését a daganatot felépítő sejtek és a szöveti környezet együttes tanulmányozásával interpretálhatjuk [93].

A rosszindulatú és a nem transzformált szöveti sejtek közötti kétirányú kölcsönhatások hozzák létre a tumor mikrokörnyezetét. A rákos sejtek képesek befolyásolni az egészséges szöveti sejtek működését, valamint a túlélést, a proliferációt és a tumor progresszióját elősegítő folyamatokat indukálnak bennük. A szolid tumorok két különálló, ugyanakkor egymástól függő részből, a rákos sejteket és a rákos őssejteket magába foglaló parenchimából, és a sztrómából állnak [94]. A tumor sztrómát alkotó leggyakoribb sejtípusok a karcinóma-asszociált fibroblasztok (CAF), a periciták, a karcinóma-asszociált endotél sejtek (CAEC), az immunsejtek (IC) és a sztróma ős- és progenitor sejtek, míg a parenchima magas proliferációs aktivitású invazív tumorsejteket tartalmaz (3. ábra) [68].



3. ábra A primer tumor mikrokörnyezet

A rosszindulatú tumor egy összetett, heterogén rendszer, mely rákos sejteken és rákos őssejteken kívül különféle sztrómasejteket tartalmaz. Számos sejttípus megjelenik a primer daganatokban, melyek hozzájárulnak a daganat biológiai viselkedéséhez, valamint szabályozzák a tumormetabolizmust. Az ábra Koontongkaew és munkatársai közleménye alapján készült [95].

A karcinogenezis során a malignus sejtek kezdetben homogén sejtpopulációt alkotnak, majd egészséges szöveti sejtek toborzásával és működésük megváltoztatásával erősen proliferáló, klonálisan heterogén alpopulációkat hoznak létre. A dinamikus tumor-promótáló kapcsolat az egyes sejttípusok között citokinek, kemokinek, növekedési faktorok, gyulladási mediátorok és extracelluláris mátrix (ECM) moduláló enzimek aktivációján keresztül valósul meg [96].

A daganatőssejteket elsőként Bonnet és Dick mutatták ki akut mieloid leukémiában (AML), mely sejtek fenotípusa abban a tekintetben megegyezik a normál őssejtekkel, hogy

korlátlan önmegújulásra képesek [97]. Sokáig úgy vélték, hogy csak a hematopoetikus rendellenességekben járulnak hozzá a daganatössejtek a karcinogenezishez [98], azonban számos tumortípusban azonosítottak távoli áttétek kialakulását indukáló daganatössejteket, többek között rosszindulatú emlődaganatokban is [99]. A daganatössejtek ellenállóbbak a kemo- és sugárterápiás kezelésekkkel szemben a daganat sztrómasejtekhez képest [100]. Fontos megemlíteni, hogy normál össejtek az EMT útján daganatos össejtekké alakulhatnak [101].

A reaktív, tumorsegítő mikro környezetben esszenciális a CAF sejtek jelenléte. A CAF-ok csontvelői eredetű sejtekből, vagy normál fibroblasztok átalakulásából származtathatóak [102]. Állatkísérletekkel igazolták szerepüket a tumorsejtek növekedésében, inváziójában, angiogenesis stimulálásában, valamint távoli áttétek kialakításában [103]. Újabb tanulmányokban a rákos sejtek és a CAF-ok között metabolikus kapcsolatot, úgynevezett „fordított Warburg hatást” írtak le. A malignus sejtek hidrogén-peroxidot szekretálnak, amely oxidatív stresszt indukál a CAF-ban. Az oxidatív stressz hatására a CAF-ok az aerob glikolízis során keletkezett piruvátot, laktátot, ketontesteket és zsírsavakat szecernálják, melyet a daganatos sejtek felvesznek és ATP termelésre fordítanak, elősegítve a tumor növekedését és az angiogenezist [104]. Továbbá a CAF-ok sztrómasejt eredetű faktor-1 (SDF-1) és transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) jelátviteli utak stimulálásán keresztül hozzájárulnak a daganat progressziójához [105].

A normál endotél sejtek TGF- β jelenlétében EMT-n mennek keresztül, mely során jellegzetes génexpressziós profillal, sejt felszíni markerekkel és morfológiával jellemezhető CAEC-k jönnek létre. Ezen sejtek alkotják az erek belső rétegét a szolid tumorokban, valamint biztosítják a tumor-asszociált angiogenezist és vaszkularizációt a fejlődő tumorszövet számára [106]. A CAEC-k abnormális morfológiája túlélési előnyt biztosít a daganatsejteknek, a szivárgó érrendszer, a magas intersticiális folyadéknyomás és csökkent véráramlás elősegíti a tumorsejtek heterogenitását, valamint hátráltatja az antitumor hatású gyógyszerek szállítását, mely rezisztencia kialakulásához vezet [107].

A periciták speciális mezenchimális sejtek, amelyek kívülről borítják a kapillárisokat, részt vesznek angiogenesis folyamatában [108], a bazális membrán remodellálásában, a tumorigenezisben [109], valamint az immunsejtek szabályozásában [107].

A daganat immunaktivitásának karakterizálását az infiltráló immunsejtek azonosítása segíti. A tumor vagy a tumor-asszociált sztróma által előállított kemokinek és gyulladási mediátorok hatására nagy mennyiségű immunsejt jelenik meg a tumor mikro környezetében, melyek támogathatják vagy antagonizálhatják a tumor progresszióját. Gyakran jellemzik a

neoplasztikus elváltozásokat „nem gyógyuló sebként”, mely háttérében a gyulladási környezet folyamatos jelenléte áll [110]. Cirkuláló immunsejtek, köztük a neutrofil granulociták, a makrofágok és a B- és a T-limfociták a gyulladási állapotot előidéző szignálmolekulákat (tumor növekedési faktor, angiogén növekedési faktor, citokinek és kemokinek) szabadítanak fel. Továbbá az extracelluláris mátrix proteolitikus bontásában fontos mátrix metalloproteinázokat (MMP), például mátrix metalloproteináz 9-et (MMP9) szekretálhatnak, mely folyamat a malignus sejtek metasztázis képzését támogatja [111]. Ugyanakkor az immunsejtek reaktív oxigén származékok (ROS) termelésén keresztül apoptózist indukálhatnak, illetve a reaktív oxigéngyökök aktiválhatják a citotoxikus T-sejteket, természetes ölüsejteket vagy B-limfocitákat. Az immunsejtek gátolhatják a tumorigenezist, ugyanakkor immunmediátorok felszabadításával kedvező környezetet teremthetnek a tumorsejtek proliferációjához, ellenállóvá válnak apoptózissal szemben, elősegítik az angiogenezist, valamint metasztázisok kialakulását [112, 113]. A tumor sztrómát infiltráló limfociták (TIL) aránya prognosztikus jelentőségű marker, meghatározza az emlőrák neoadjuváns kezelésre adott választ. A magasabb TIL arány korrelál a jobb terápiás hatékonysággal, valamint daganatellenes immunitás közvetítésén keresztül kedvezőbb prognózist jelez [114].

Ezen sztrómális változások, és a reaktív tumor-promótáló mikrokörnyezet kialakulása hozzájárulnak a tumorigenezishez, a túlélési és antiapoptotikus szignálok stimulálásával, valamint az angiogenezis, a migráció és az invázió támogatásán keresztül optimális környezetet biztosítanak a tumor növekedéséhez és metasztázisok képződéséhez. A malignus sejtek anyagcseréjét elsősorban a tumor mikrokörnyezete szabályozza. A mikrobiom a tumor mikrokörnyezetének fontos részét képezi, mely az egészséges barrier funkciók fenntartásával, gyulladás előidézésével, valamint különféle genotoxinok és bakteriális metabolitok termelésével befolyásolja a daganatsejtek metabolizmusát [19].

3.2.4. A neoplasztikus sejtekre jellemző folyamatok

A rákos sejtek működése több tekintetben különbözik a normál sejtektől. A daganatos szövet egy komplex, heterogén rendszer, melyben a folyamatosan proliferáló malignus sejtek és a különféle sejttípusokat magába foglaló tumor mikrokörnyezet között dinamikus heterotípusos kölcsönhatás áll fenn [68].

A nem transzformált szövetek normál szerkezetük, metabolizmusuk és funkciójuk fenntartása céljából szigorúan szabályozzák a növekedési faktorok felszabadítását. Ellenben a neoplasztikus sejtekben kulcsfontosságú gének szomatikus mutációja és amplifikációja következtében, többek között a MAPK (mitogén-aktivált protein kináz) útvonalat [115], PI3K (foszfatidil-inozitol-3-kináz) vagy az Akt (szerin/treonin kináz B) szignalizációt érintő módosulásuk [116], valamint „negatív feedback” szabályozó mechanizmust közvetítő mTOR (*mammalian target of rapamycin*) működési zavara [117], *konstitutív módon biztosítják a proliferációs szignálokat*. Ezen gyakori génmutációk *korlátlan osztódási képességet* biztosítanak a malignus sejteknek [118], mely a hagyományos terápiákkal szembeni rezisztenciát és kedvezőtlen prognózist eredményez számos ráktípus esetében [119].

A *növekedést szabályozó mechanizmusok elvesztése* lehetővé teszi a neoplasztikus sejtek számára, hogy korlátlan replikációs képességet szerezzenek, és elkerüljék a tumorszuppresszorok által történő növekedés gátlását és eliminációt. A tumor protein 53 (TP53) és retinoblasztóma (Rb) kulcsfontosságú tumorszuppresszor gének [120], melyek gátolják a mutált sejtek proliferációját a sejtciklus progressziójának szabályozásával, továbbá apoptózist indukálnak. Szolid tumorokban azonosított leggyakoribb genetikai mutációk ezen tumorszuppresszor gének elvesztése, a rosszindulatú daganatok több, mint 70%-ában megfigyelhető, mely folyamatos és korlátlan daganat növekedést idéz elő [121].

A malignus sejtek különféle mechanizmusokat alkalmaznak az *apoptózis korlátozására* vagy *elkerülésére* [122]. Az apoptotikus enzim kaszkád (kaspázok) expressziója az E2F transzkripciós faktor 1 (E2F1) vagy a TP53 gének transzkripciós szabályozása alatt áll, funkcióvesztéses mutációjuk védelmet nyújt apoptotikus szignálokkal szemben, ezáltal a rákos sejtek túlélését eredményezve [123].

Szomatikus sejtekben az eukarióta kromoszómavégeken lévő telomerek biztosítják a genomiális integritást. A replikáció során történő progresszív telomer-erózió kromoszóma instabilitást vált ki, mely a sejt öregedéséhez és osztódásának leállításához vezet. A rákos sejtek

többségénél az optimális telomer hossz fenntartását és a tumor növekedését a telomeráz enzim fokozott aktivitása indokolja, ezáltal kulcsfontosságú szerepet játszva a tumorigenezisben, valamint a *korlátlan replikatív potenciál* megszerzésében [124].

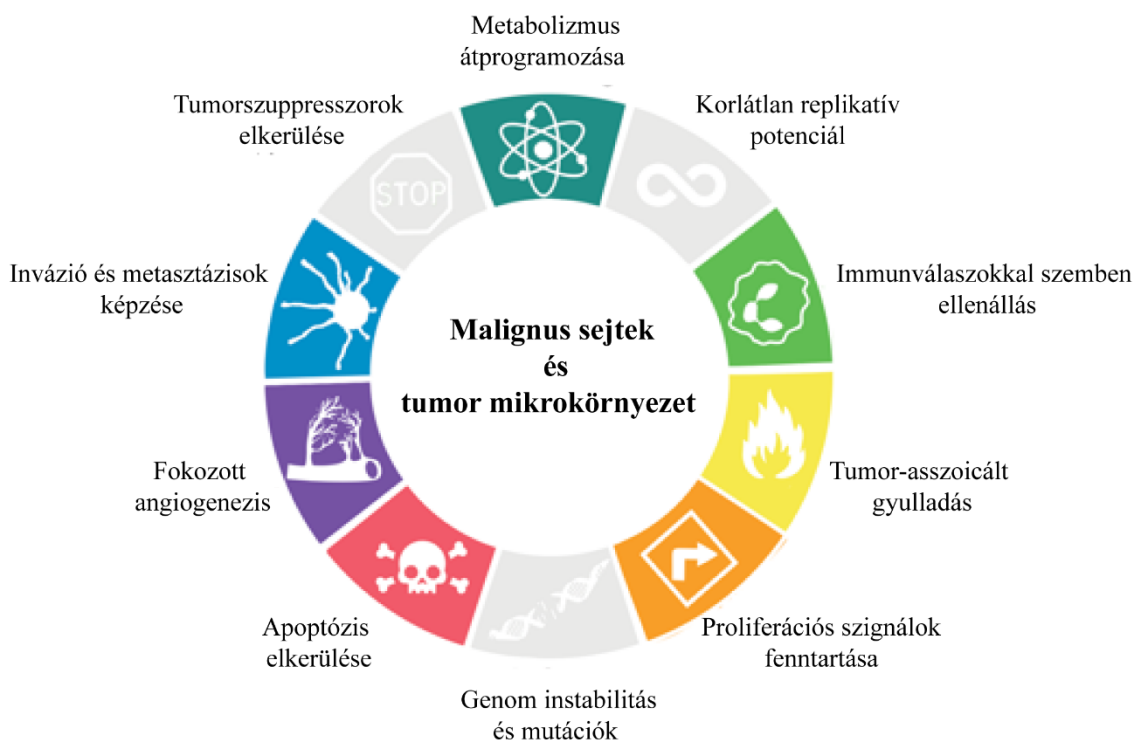
Az érrendszer által biztosított folyamatos oxigén- és tápanyagellátás, valamint az anyagcsere végtermékek eliminációja mind a normál, mind a daganatos sejtek szempontjából döntő jelentőségű [125]. Fiziológias körülmények között az angiogenezis szigorúan szabályozott folyamat, mely fontos szerepet tölt be az embriogenezisben, a sebgyógyulásban és a menstruációs ciklusban. A normál szövetekben a neovaszkularizáció folyamatát számos növekedési faktor stimulátor és inhibitor kontrollálja, mely egyensúlynak a felborulása *fokozott angiogenezist*, és ezáltal kontrollálatlan tumor növekedést eredményez. Számatalan angiogén faktort leírtak, közülük az egyik legfontosabb a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor A (VEGF-A), mely funkciója normál és patológias folyamatokban is ismert. Továbbá a trombocita eredetű növekedési faktor (PDGF) -B és -C, valamint a fibroblaszt növekedési faktor (FGF) -1 és -2 szintén hozzájárul az endotél sejtek proliferációjához és migrációjához, az angiogenezis során [126].

A rosszindulatú daganatok jelentős részénél figyelhető meg a rákos sejtek *inváziója* környező szövetekbe, továbbá a daganatos betegek több, mint 90%-ánál a halál elsődleges okaként *távoli metasztázisok* jelenlétét írják le [127]. A neoplasztikus sejtek jellegzetes morfológiai jegyeket, valamint az ECM-ben bekövetkezett sejtadhéziós változásokat mutatnak. A legjobban karakterizált változás a sejt-sejt és a sejt-felszín kapcsolatok kialakításában esszenciális E-cadherin csökkent expressziója, mely a malignus sejtek invázióját és metasztázisok képződését is gátolja [128]. Ezzel szemben az embriogenezis és a gyulladásos folyamatok során végbemenő fiziológias sejt migrációval összefüggésbe hozható adhéziós molekulák kifejeződése emelkedett az invazív karcinóma sejtekben. Többek között a migráló neuronokra és a mezenchimális sejtekre jellemző N-cadherinnek fokozott a kifejeződése, mely a rákos sejtek invázióját és metasztatizálását indukálja [129].

A malignus sejtek fokozott érzékenységet mutatnak mutagén szerekkel szemben, növelve a mutációk kialakulásának lehetőségét és sebességét [130]. A rosszindulatú daganatok patogenezisében kulcsfontosságúak a *genomiális instabilitást* előidéző onkogén mutációk és a tumorszuppresszorok inaktiválása [131]. Habár a genom instabilitás önmagában nem nyújt funkcionális előnyt a rákos sejteknek, azonban lehetővé teszi a neoplasztikus folyamatokra jellemző biológiai változások hozzáférhetőségét, elősegítve a tumor progresszióját [130].

Számos tanulmányban igazolták, hogy tumor mikro környezetében fennálló *krónikus gyulladás* hozzájárulhat a malignus sejtek proliferációjához, túléléséhez, angiogenezist és metasztázisok kialakulását indukálja, EMT-t idéz elő a tumorsejtekben, valamint az adaptív immunitás módosításával csökkenti a terápiás válaszkészségét [132].

A daganat sejtekben *megváltozott metabolizmust* elsőként Otto Warburg ismerte fel. Fokozott energiatermelés céljából a sejtek megnövekedett glikolitikus rátát és fokozott laktát szintézist mutatnak oxigén ellátottságtól függetlenül, ez az úgynevezett „Warburg hatás” a neoplasztikus sejtek többségében megfigyelhető jelenség [133]. Mindemellett újabb vizsgálatokban beszámoltak arról, hogy a szolid tumorok képesek *elkerülni az immunrendszer által történő felismerést* vagy korlátozzák az immunsejtek effektor funkcióit, mely új antitumor terápiaik potenciális célpontjává szolgál (4. ábra) [68, 134].



4. ábra Neoplasztikus sejtekre jellemző folyamatok

A malignus sejtek korlátlan proliferációs képességét elősegítő biológiai változásokat elsőként Douglas Hanahan és Robert A. Weinberg összegezte. A rákos sejtek és mikro környezetük között fennálló dinamikus kölcsönhatások hozzájárulnak a tumorsejtek növekedéséhez, túléléséhez és metasztázisok kialakulásához [68, 135].

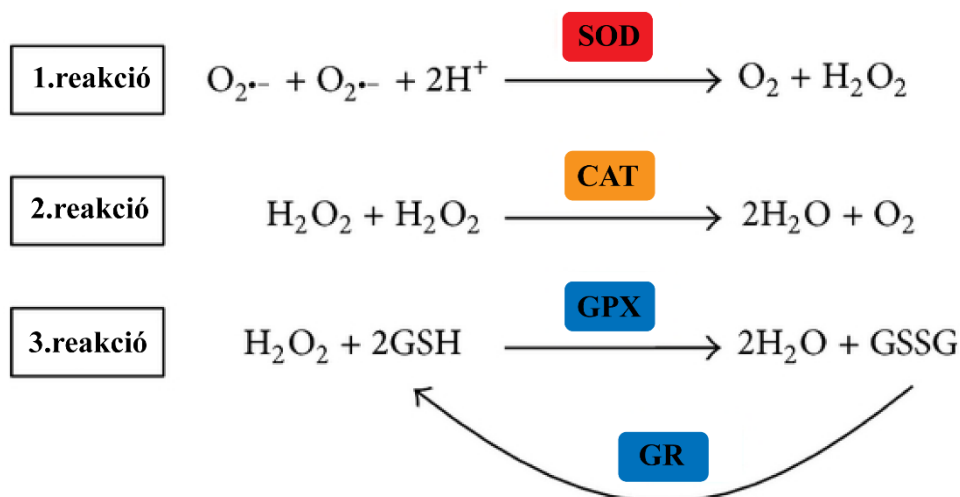
3.3. Antitumor hatások

3.3.1. Reaktív intermedierek és antioxidánsok

A sejtek redox-homeosztázisának szigorú szabályozása, a megfelelő pro- és antioxidáns arány fenntartása kulcsfontosságú élettani folyamatokban. Számos daganatos megbetegedésnél megfigyelhető a redox-egyensúly megbomlása [136-139].

A molekuláris oxigénből keletkező ROS az élő aerob szervezetben endogén, illetve exogén módon termelődnek. A ROS magába foglalja a szuperoxid aniont ($O_2^{\cdot-}$) és hidroxil gyököt ($OH\cdot$), továbbá a párosítatlan elektronnal ugyan nem rendelkező, de erősen reaktív hidrogén-peroxidot (H_2O_2) [140]. A ROS és nitrogén-monoxid (NO) reakciójából származó oxidánsok az úgynevezett reaktív nitrogén intermedierek (RNI), melyek közül a szuperoxid anionból és nitrogén monoxidból képződő nagy reakciókészséggel jellemezhető peroxinitrit (ONOO-) a legjelentősebb [141]. Az oxidatív hatásokkal szemben az aerob szervezetek integrált antioxidáns védelmi rendszert alakítottak ki, mely enzimatis és nem enzimatis antioxidánsokat magába foglalva meghatározó szerepet játszik az oxidáció és a kontrollálatlan szabadgyökös láncreakció megelőzésében [142].

Elsődleges antioxidáns enzimek a szuperoxid-diszmutáz (SOD), a kataláz (CAT), a glutation peroxidázok (GPX) és a glutation-S-transzferáz (GST), melyek egymással együttműködve a ROS/RNI elimináló reakciókat katalizálnak. A SOD a szuperoxid anion hidrogén-peroxiddá és oxigénné történő átalakulását katalizálja. Míg a keletkezett hidrogén-peroxidot a CAT és a GPX vízzé és oxigénné alakítja [137]. A GPX a redukáló erőt a gyökfogóként is ismert redukált glutationról (GSH) nyeri, míg az oxidált glutationt a glutation-reduktáz (GR) enzim regenerálja (5. ábra). Továbbá az elektrofil és toxikus vegyületek semlegesítését a glutation-S-transzferáz katalizálja kofaktora, a GSH részvételével [142, 143].



5. ábra Enzimatis antioxiidáns védelmi rendszer

Az aerob élő szervezetekben elsődleges antioxiidáns enzimek, a szuperoxid-diszmutáz (SOD), a kataláz (CAT), a glutation peroxidázok (GPX) és a glutation-reduktáz (GR) által katalizált reakciók a szabadgyökök és a hidrogén-peroxid (H_2O_2) eltávolítása céljából [144].

A kis molekulatömegű, nem enzimatis antioxiidánsok a reaktív oxigén és nitrogén származékokkal kölcsönhatásba lépve terminálják a szabadgyökös láncreakciókat. Ezen antioxiidánsok közé tartoznak az endogén termelt fehérjék és metabolitok, a tiol-reduktánsok (tioredoxin, glutation, N-acetil-cisztein), bilirubin, nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát (NADPH), valamint az exogén vitaminok: A és C vitamin, α -tokoferol (E-vitamin), β -karotin szelén és húgysav [137, 143].

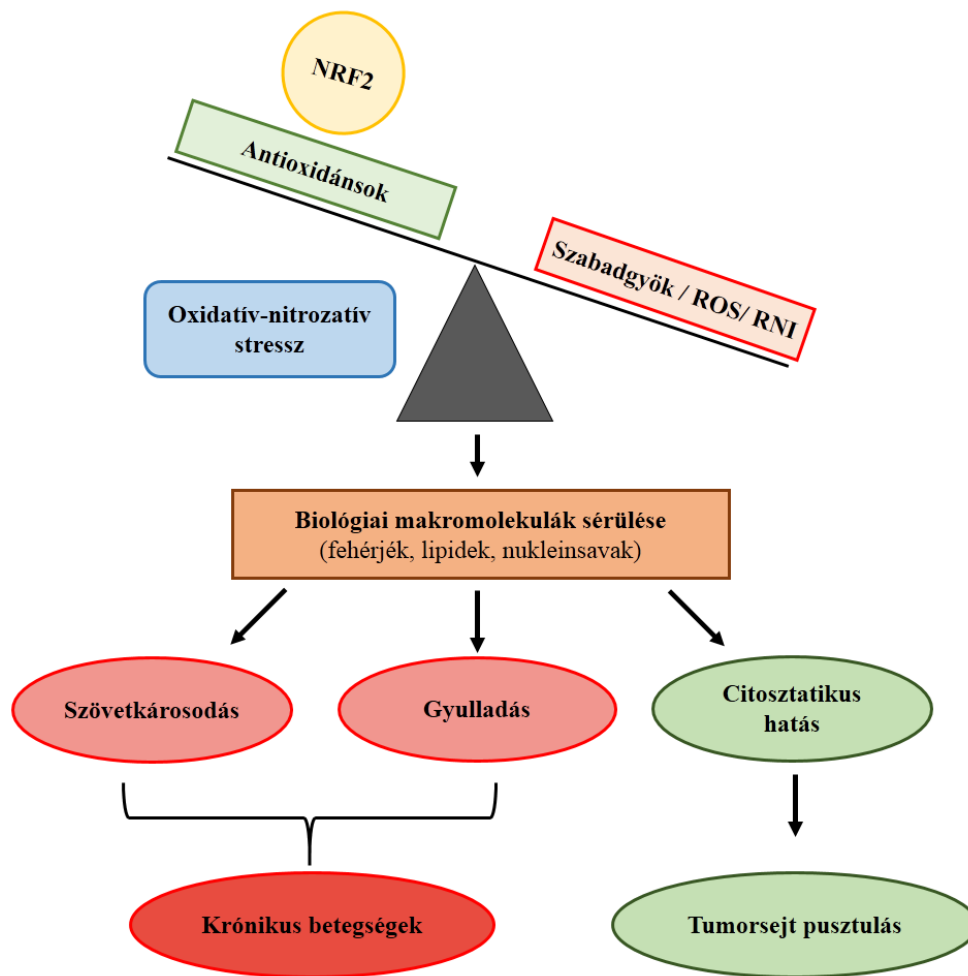
3.3.1.1. Oxidatív és nitrozatív stressz

A reaktív oxigén és nitrogén származékok fiziológiás körülmények között is termelődnek különféle biokémiai reakciók során, jelentős élettani funkciókat látnak el, részt vesznek többek között a patogén flóra visszaszorításban és a jelátvitelben, így a sejtek célja nem a teljes elimináció, hanem a megfelelő prooxidáns és reduktáns egyensúly fenntartása [139].

Fokozott szabadgyök és reaktív metabolit termelődés, valamint csökkent antioxiidáns kapacitás következtében redox-homeosztázis zavar léphet fel, mely oxidatív stresszt indukálhat. A folyamat során fontos biomolekulák (fehérjék, lipidek, nukleinsavak) és sejtek károsodhatnak, súlyos esetben apoptózis vagy nekrozis mehet végbe, amely potenciális hatást

gyakorol az egész szervezetre [143, 145, 146]. Az oxidatív stresszt összefüggésbe hozták számos patológiás kórkép kialakulásával, beleértve neurológiai rendellenességeket, atheroszklerózist, hipertenziót, iszkémiát-reperfúziót, cukorbetegséget, akut légzési distressz szindrómát, idiopátiás tüdőfibrózist, krónikus obstruktív tüdőbetegséget, asztmát és neoplasztikus megbetegedéseket is [142]. A tartós gyulladás és az ebből következő oxidatív stressz DNS-károsodást és genom instabilitást idézhet elő, ennek következtében a felhalmozódott mutációk karcinogenezist indukálhatnak [23, 147]. Ugyanakkor bizonyos rosszindulatú daganatokban, többek között emlőrákban, a fokozott oxidatív stressz citosztatikus hatását állapították meg [24, 138, 148].

A redox-egyensúly fenntartásában létfontosságú az eritroid nukleáris faktor 2 (NRF2) transzkripció faktor, amely döntő szerepet játszik az antioxidáns gének expressziójának szabályozásában. Az NRF2 védelmet biztosít a sejteknek az exogén és endogén oxidatív stressz indukálta hatásokkal szemben, így kiküszöbölve az intracelluláris lipidperoxidációt, a fehérjék, a nukleinsavak és a szénhidrátok károsodását [149]. Több, mint ezer NRF2 célgént azonosítottak [150], többségük az antioxidáns védelmi rendszer fontos részét képezi, mint a SOD, a CAT vagy a GPX [151]. Az NRF2 aktivitását a KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) represszor szabályozza, mely az NRF2 ubiquitinálódását, majd proteozómális degradációját segíti elő [152, 153]. Azonban emelkedett ROS és RNI jelenlétében a represszor cisztein tiol oldalláncai oxidálódhatnak, blokkolva az NRF2 proteozómális lebontását, mely az aktiváció kulcslépése [154]. Az evolúciósan konzervált citoprotektív tulajdonságú NRF2 általában pro-neoplasztikus hatású [155]. Az NRF2 aktiváció hozzájárul a sejtek túléléséhez antiapoptotikus szignálok stimulálásával, metabolikus változásokat indukál, valamint a migráció és az invázió támogatásával kedvező környezetet teremt a tumorsejtek proliferációjához és metasztázisok kialakulásához [24]. A fokozott NRF2 aktiváció terápia rezisztenciához vezethet, ami szintén támogatja a tumor progressziót [156] (6. ábra).



6. ábra Oxidatív-nitrozatív stressz

Fokozott szabadgyök és reaktív intermedier termelődés (reaktív oxigén származék (ROS) és reaktív nitrogén intermedier (RNI)), valamint csökkent antioxidáns kapacitás következtében a redox-homeosztázis felborul, mely oxidatív-nitrozatív stresszt indukálhat. A folyamat során fontos biomolekulák (fehérjék, lipidek, nukleinsavak) és sejtek károsodhatnak, valamint tartós gyulladás léphet fel, különféle krónikus betegségek kialakulását eredményezve. Ugyanakkor a prooxidáns hatásoknak lehet citosztatikus vagy antiproliferatív jelentősége.

3.3.2. Sejtproliferációs kontroll és oxidatív stressz

Az eukarióta sejtek növekedési és osztódási ciklusa szigorúan szabályozott folyamat, mitogén hatású proliferációs szignálok kontrollált termelése és felszabadulása biztosítja a szövetek normális felépítésének és működésének fenntartását. A normális növekedési kontroll alól kitért sejtek autonóm proliferációja neopláziák kialakulásához vezet.

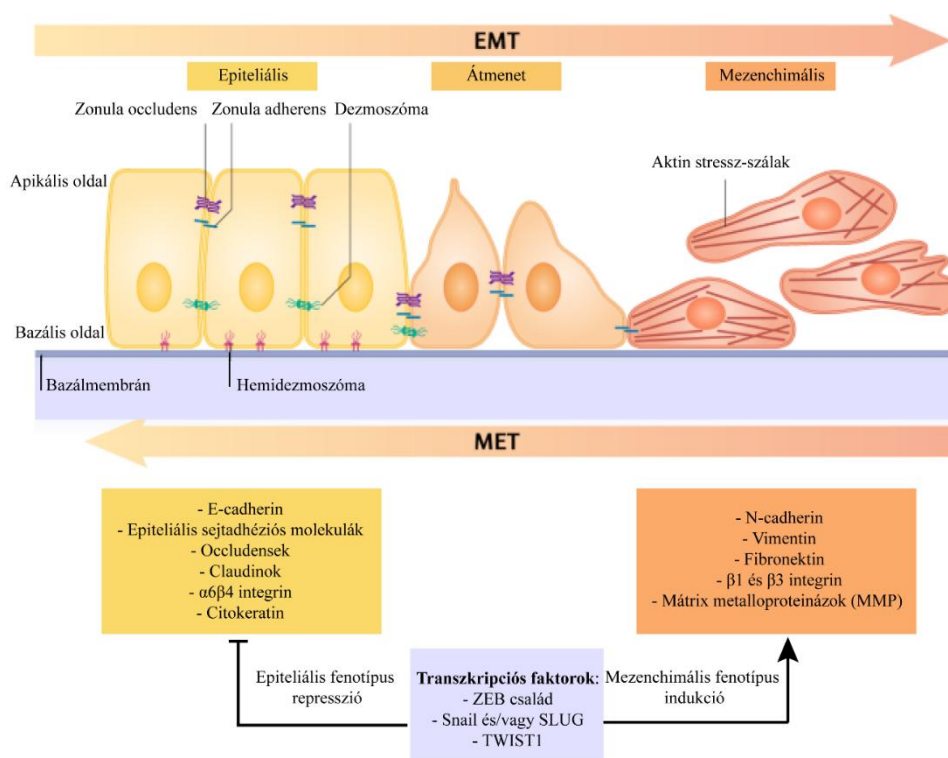
A neoplasztikus sejtek mitogén jelátvitel megváltozik, amelyben számos proliferatív szignalizációt fenntartó alternatív útvonalat azonosítottak [68, 157, 158]. Ennek egyik lehetséges módja, hogy a rákos sejtek növekedési faktor ligandumokat szintetizálnak, többek között az epidermális növekedési faktor (EGF), amfiregulin (AREG), epiregulin (EREG), trombocita eredetű növekedési faktor (PDGF) és a transzformáló növekedési faktor α (TGF α) autokrin szekrécióját figyelték meg emlőrák sejtek esetében, ezáltal csökkentve függőségüket a normális szöveti mikro környezet stimulációjától [159]. Ezen mitogének a neoplasztikus sejtek által expresszált sejtfelszíni receptorokhoz kötődve úgynevezett „pozitív feedback szignálhurkot” hoznak létre, a sejtek autokrin aktivációját eredményezve [18, 160].

A receptor jelátvitelben bekövetkezett változások szintén meghatározó szerepet játszanak a tumor patogenezisében. Az emlődaganatos sejtek felszínén fokozottabban fejeződnek ki bizonyos növekedési faktor receptorok, például a sejtek növekedését és fejlődését szabályozó humán epidermális növekedési faktor receptor (ErbB) tirozin kináz családba tartozó epidermális növekedési faktor 1 és 2 (EGFR/HER1 és HER2) [160], melyek a rákos sejtek hiperreakcióját váltják ki, korlátozott mennyiségű mitogén szignál jelenlétében is [68]. Továbbá a receptorok szerkezeti modifikációját is megfigyelték emlőtumoros betegségekben, ami elősegíti a sejtproliferáció ligandum független aktivációját [68, 161]. Megfigyelték, hogy a ROS mediálta citotoxikus hatás a neoplasztikus sejtek apoptózist okozva megakadályozza a tumor progresszióját [162]. Továbbá állatkísérletekben is igazolták, hogy a reaktív intermedierek akkumulációja G1 vagy G2/M fázisban sejtciklus blokkot idéz elő, meggátolva a tumorsejtek proliferációját, mely specifikus daganatellenes terápiák célpontjaként szolgálhat [163].

3.3.3. Epiteliális-mezenchimális tranzíció és az emlő rosszindulatú daganatai

Tumor progresszió során a sejtekben végbemenő morfológiai és molekuláris változások meghatározó szerepet játszanak az apoptózissal szembeni rezisztencia és az invazív fenotípus kialakulásában, elősegítve a tumorsejtek túlélését és disszeminációját a környező szövetekbe [164]. A folyamat kulcslépése, hogy az epitheliális sejtek elveszítik apiko-bazális polaritásukat, valamint a sejtek közötti- és a bazális membránnal való kapcsolatokat és jellegzetes génexpressziós mintázatot mutató, migrációra képes mezenchimális jellegű sejtekké válnak. Ezen fenotípus konverzió hátterében az epitheliális sejtek molekuláris átprogramozása áll, mely biológiai folyamatot epitheliális-mezenchimális tranzíciónak nevezünk [164, 165]. Az EMT

során a sejtek citoskeletális rendszere átrendeződik [166], a hámsejtekre jellemző citokeratin intermedier filamentum hálózat vimentinre (Vim) cserélődik ki, valamint az aktin rendszer átrendeződik és a sejtmozgást elősegítő aktin stressz-szálak képződnek. A sejtek elnyúlt, orsó alakú fibroblaszt-szerű morfológiára tesznek szert [167], valamint a sejtek közötti szoros sejtkapcsolatok (*zonula occludens*, *tight junction*) felbomlanak és megszűnnek [168]. Továbbá, az adherens interakciókban résztvevő E-cadherin kifejeződése csökken, ellenben a mezenchimális marker, neurális-cadherin (N-cadherin) expressziója megemelkedik (7. ábra) [169].



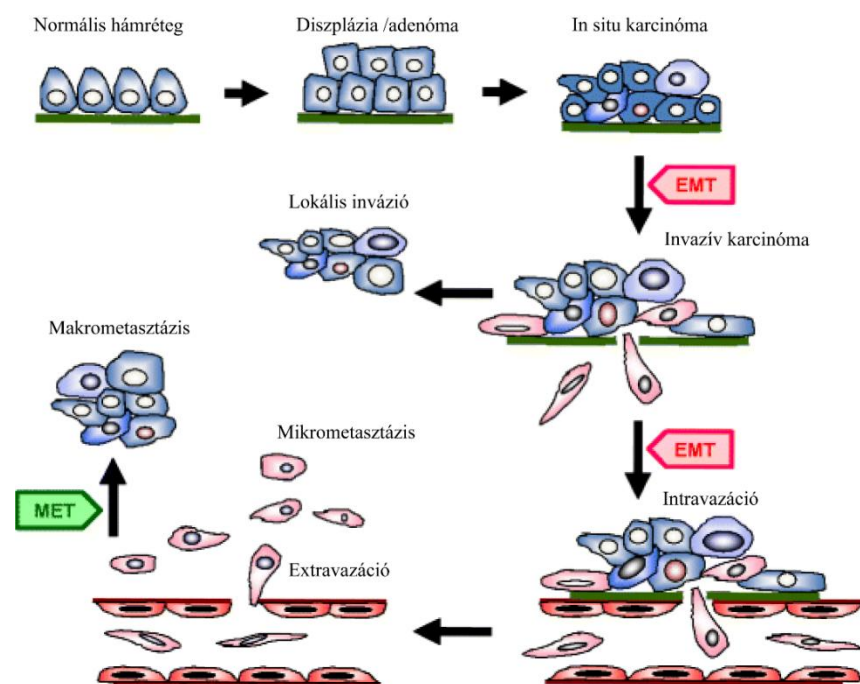
7. ábra Az onkogén epiteliális-mezenchimális tranzíció folyamata

Az apikális-bazális polaritást mutató epiteliális sejteket szoros (zonula occludens) és adherens (zonula adherens) sejt-kapcsolatok, valamint desmoszómák tartják össze, továbbá hemidesmoszómákon keresztül kötődnek a bazális membránhoz. Az epiteliális sejtek jellegzetes molekulákat expresszálnak (epiteliális markerek), melyek segítenek fenntartani a sejtek polaritását. Az epiteliális-mezenchimális tranzíció (EMT) során az EMT-t indukáló transzkripciós faktorok (ZEB, Snail, Slug és Twist) fokozottan expresszálnak, melyek gátolják az epiteliális marker gének kifejeződését, ugyanakkor aktiválják a mezenchimális markerek transzkripcióját. Ezen génexpressziós változások hatására a hámsejtek elveszítik apikális-bazális polaritásukat, a sejtek közötti interakciók felbomlásával, illetve aktin stressz-szálak képződésével migrációra képes, mezenchimális jellemzőket mutató invazív fenotípus alakul ki. Az EMT reverzibilis folyamat, így a mezenchimális sejtek a mezenchimális-epiteliális tranzíción (MET) keresztül visszatérhetnek az epiteliális állapotba. Az EMT és a MET számos fiziológiai folyamatban kulcsfontosságú (embriogenezis, sebgyógyulás), ugyanakkor a karcinogenezis során is meghatározó szerepet játszik [170].

Az EMT számos biológiai folyamatban meghatározó szerepet tölt be, melynek háromféle típusát különböztetik meg. Az I. típusú EMT az embrionális morfogenezisben és a szervfejlődésben kulcsfontosságú, hozzájárul új szövetek és szervek kialakulásához [164]. A II. típus elsősorban gyulladással társult szervfibrózis és szövetregeneráció során figyelhető meg, mely a sebgyógyulásban elősegíti a sérült sebszélek záródását. A III. típus az úgynevezett onkogén EMT neoplasztikus folyamatokat jellemez, lehetővé teszi a primer

daganatsejtek migrálását, melyek a bazálmembránon átjutva (intravazáció) a keringésbe kerülnek és távoli metasztázisok kialakulásához vezetnek [164, 171].

A tumor mikrokörnyezettől függően az EMT különböző mértékben mehet végbe, egyes tumoros sejtek bár mezenchimális tulajdonságokat szereznek, ugyanakkor nem teljesen veszítik el az epiteliális jellegüket [164]. A metasztázis képződése során a metasztázist képző mezenchimális jellegű sejtekben gyakran lejátszódik az EMT reverz folyamata, az úgynevezett mezenchimális-epiteliális átmenet (MET), amely visszaállítja a neoplasztikus sejtek epiteliális jellegét (8. ábra) [172, 173].



8. ábra Az emlőrák progresszió során végbemenő folyamatok

Az ábra az epiteliális-mezenchimális tranzíció (EMT) és mezenchimális-epiteliális tranzíció (MET) eseményeit mutatja be, melyek az emlőrák progressziójában és metasztázisok kialakulásában kulcsfontosságú szerepet töltenek be. A normál hámszövetek rosszindulatú transzformációja, valamint klonális proliferációja invazív karcinóma kialakulásához vezet. EMT során a neoplasztikus sejtek migrációs képessége fokozódik, lehetővé téve lokális inváziójukat a környező szövetekbe, továbbá indukálja a sztrómasejtek mátrix metalloproteináz (MMP) szekrécióját. Az invazív tumorsejtek a bazálmembránon áthatolva beléphetnek a nyirok- és vérkeringésbe (intravazáció), ahol keringő tumorsejtek maradhatnak vagy extravazáció révén az ér-endotél rétegen áttörve kikerülnek a keringésből, ezáltal képesek lesznek a primer tumortól távoli szövetekbe mikrometasztázisok képzésére vagy MET útján makrometasztázisokat hoznak létre, elősegítve az emlőrák progresszióját [174, 175].

Az onkogén EMT jelenségét emlődaganatokban is azonosították, mely összefügg a tumor progressziójával, kulcsfontosságú a környező szövetek inváziójában, ugyanakkor távoli metasztázisok (csont, agy és tüdő) kialakítása során a fordított mechanizmus (MET) jelentőségét írták le [174, 176].

Számos transzkripciós faktor és molekuláris esemény szabályozza az EMT jelenségét emlődaganatokban. Különböző DNS mutációk, mint az adherens sejtkapcsolatokban kulcsfontosságú, az epiteliális integritást biztosító E-cadherin elvesztése az EMT egyik meghatározó lépése. Az E-cadherin gén hipermetilációját figyelték meg invazív mell-, prosztata- és szájüregi karcinómákban. Az E-cadherin alacsony expressziója elősegíti a sejtek mobilitását és lehetővé teszi a tumorsejtek migrációját és invázióját [177, 178]. Mindemellett a tumor mikrokörnyezete által szekretált proteolitikus MMP-k is jelentős szerepet játszanak az onkogén EMT-ben. Az MMP enzimek szükségesek a szöveti morfogenetikus folyamatokhoz és sejtmigrációs folyamatokhoz. Magas MMP expressziót figyeltek meg többek között emlőtumor sejtekben, ahol a tumorgenezist elősegítve stimulálják a sejtinváziót és az áttétképződést [179].

Több EMT-ben résztvevő transzkripciós faktor ismert (4. táblázat), közülük a Snail (Snai1), a Slug (Snai2), a Twist1, a ZEB1 és a ZEB2 aktivációja indukálja az EMT-t és a metasztázisok kialakulását az E-cadherin represszióján keresztül [167, 180]. Ezen transzkripciós faktorok kulcsfontosságúak a mezenchimális jelleg fenntartásában, valamint az őssejt-szerű fenotípus megjelenésében [181], ezzel elősegítve a metasztázis képzést, a betegség kiújulásának kockázatát, illetve a terápiás rezisztencia kialakulását, mely kedvezőtlen prognózist vetít előre [182]. Számos jelátviteli útvonal, például TGF β , Wnt/ β -catenin, NF- κ B, Notch, Hedgehog, integrinek és tirozin-kináz receptorok befolyásolhatják az EMT folyamatát, illetve hatást fejtenek ki az őssejtek önmegújuló képességére és differenciációjára. A szignalizációs folyamatok közötti funkcionális kölcsönhatás szinergista hatású, elősegítve az EMT-t és az áttétek kialakulását [182].

4. táblázat Az epitheliális-mezenchimális tranzíció (EMT) folyamatát szabályozó faktorok és markerek

Az első oszlop az epitheliális illetve mezenchimális markereket, valamint az EMT folyamatát szabályozó transzkripciós faktorokat és szignalizációs útvonalakat foglalja össze, míg a jobb oldali oszlop jelöli azt, hogy epitheliális vagy mezenchimális sejtekben fejeződnek ki elsősorban, továbbá a fenotípus kialakulását elősegítő folyamatot [167, 180, 183-186].

EMT marker név	Marker
Epitheliális cadherin (E-cadherin)	epitheliális
Zonula occludens-1 (ZO-1)	
Neurális cadherin (N-cadherin)	mezenchimális
Vimentin (Vim)	
Mátrix metalloproteinázok (MMP)	
Catenin beta-1 (β -catenin)	
Fibronectin (FN)	
EMT-TF transzkripciós faktorok	Marker
Snail család transzkripciós represszor-1 (Snai1)	EMT indukció (mezenchimális)
Snail család transzkripciós represszor-2 (Slug)	
Twist család transzkripciós faktor-1 (Twist1)	
Cink-ujj E-box kötő homeobox-1 (ZEB1)	
Cink-ujj E-box kötő homeobox-2 (ZEB2)	
Jelátviteli útvonalak/receptorok	Marker
Transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β)	EMT indukció (mezenchimális)
Nukleáris faktor kappa-B (NF- κ B)	
Wnt/ β -catenin	
Notch receptor-1 (Notch1)	
Ras fehérje/Extracellulárisan regulált kináz (RAS/ERK)	
Tirozin-kináz receptorok (RTK)	
Hedgehog (Hh)	

3.3.4. Az emlődaganatok metabolizmusa

Számos neoplasztikus folyamat támogatásán keresztül az anyagcsere változások jelentős szerepet töltenek be a tumor patogenezisben, elősegítik a tumorsejtek fokozott proliferációs aktivitását [20, 187], az angiogenezist [188], valamint az EMT-t [189]. Az emlőrák sejtek metabolizmusa jellegzetes patológiás változásokat mutat. Csökkent mitokondriális oxidáció, valamint emelkedett glikolitikus fluxus és pentóz-foszfát

transzformáció jellemzi az emlőrák sejteket, melyet a jelenség leírója, Otto Warburg után Warburg-hatásnak neveznek [190]. A daganatos progressziót támogató átrendeződött anyagcsere folyamatok nemcsak fokozott „aerob glikolízisben” nyilvánulnak meg, hanem számos anyagcsere útvonal, mint például a glutamin metabolizmus [191], a lipid és a zsírsav útvonal [192], a fehérje transláció vagy a koleszterin metabolizmus is érintett [193, 194]. A metabolikus változások hátterében többek között az mTOR [195], a forkhead box O1 fehérje (FOXO1) [196], az adenzin-monofoszfát aktivált protein kináz (AMPK) [197], valamint a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma koaktivátor-1 α és β (PGC1 α és PGC1 β) celluláris energiaszenzor útvonal szabályozóknak a komplex újraprogramozása állhat [198].

Az mTOR-komplexek (mTORC1 és mTORC2) indukálódásával a Warburg-hatásban, valamint a glutaminolízisben résztvevő gének kifejeződése és aktivitása fokozódik, míg a FOXO1 transzkripciós faktor elsősorban az mTORC1 gátlásán keresztül a sejtciklus leállítását vagy a sejtproliferációs kapacitás csökkenését váltja ki. Ezáltal az mTORC1 gátlás a FOXO1 tumorsuppresszív hatásának részét képezheti [199, 200]. Mindemellett emlőrákos betegeknél megfigyelték az „aerob glikolízist” (Warburg-effektus) negatívan szabályozó AMPK szerin/treonin kináz alulműködését, mely elősegíti a tumor növekedését [197, 201]. Az antitumor hatású AMPK - aktivációjára az acetyl-CoA-karboxiláz (ACC) fehérje fokozott foszforilációja utal [197] - kulcsfontosságú szerepet játszik az energia-homeosztázis fenntartásában, valamint a PGC1 α és PGC1 β szabályozásával stimulálja a mitokondriális biogenezist [198, 202].

Daganatos megbetegedésekben, többek között az emlőrákban is azonosított Warburg-féle metabolikus változások helyreállítását, valamint a regulatórikus funkciót ellátó enzimeket célzó terápiás eljárások antiproliferatív hatásúak, meghatározó szerepet töltenek be a jövő tumoros betegeinek kezelésében [203].

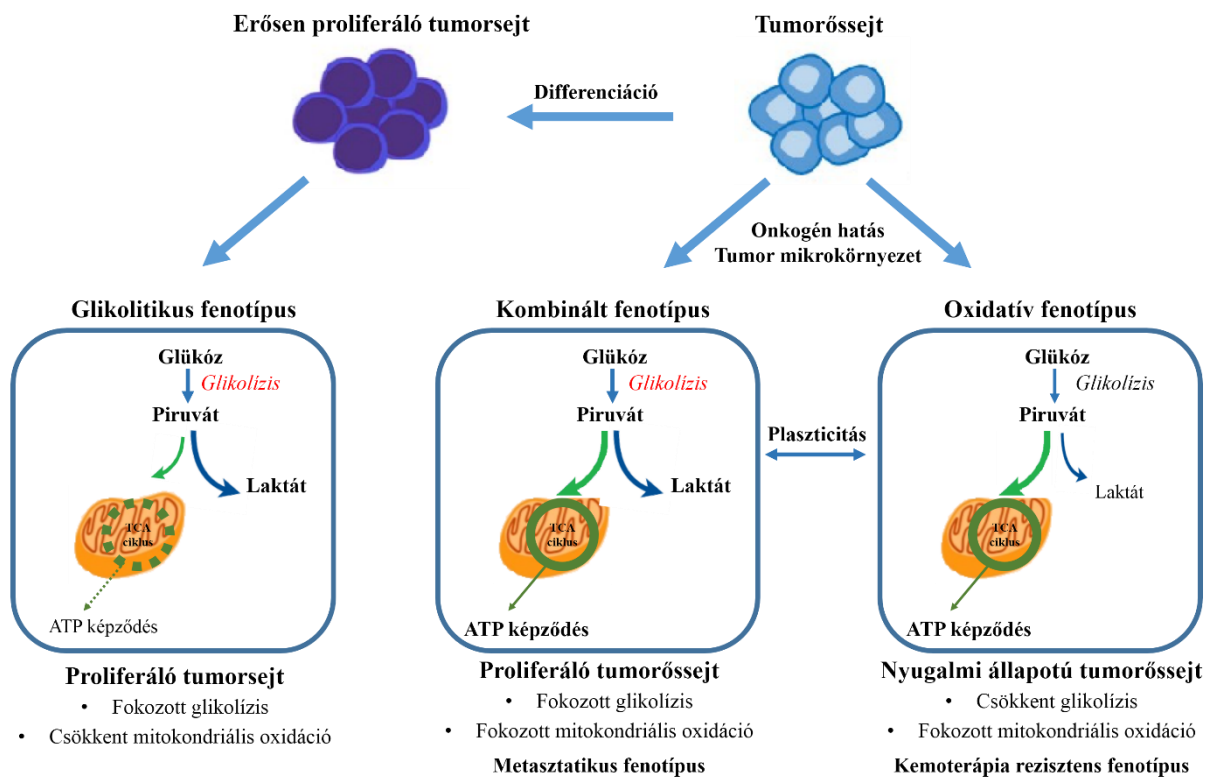
3.3.5. Emlőrák őssejtek és oxidatív stressz

Az elmúlt évek tanulmányai arra utalnak, hogy létezik az őssejteknek egy speciális alcsoportja. A daganatőssejtek korlátlan önmegújulásra képesek, melyekből az aszimmetrikus osztódás eredményeképp az őssejttel azonos, további differenciálódásra elkötelezett heterogén tumorsejt populáció létrehozására alkalmas progenitor utódsejtek keletkeznek [204]. Az emlőrák őssejtek kritikus jelentőségűek a tumor-iniciációjában, fejlődésében, a metasztázis

képződésben, a gyógyszer rezisztencia kiváltásában, valamint a betegség relapszusában [163, 204].

A daganatőssejtek aránya eltérő egyes emlőtumor sejtmodellekben, a tumoros sejttömeg kis hányadát adják elsősorban, ugyanakkor egyes emlő adenokarcinómákban (például SKBR-3 humán emlőkarcinóma sejtvonala) magasabb számban vannak jelen [205, 206]. Egy 2003-as tanulmányban immunszupprimált egereket (NOD/scid) xenograftoltak primer emlőtumorból izolált sejtekkel, és megállapították, hogy csak a sejtek kis szubpopulációja képes emlődaganatot iniciálni [99]. Ezen őssejtek jellegzetes génexpressziós mintázatot (CD44+/CD24-) mutatnak [207, 208]. A tumorőssejtek is képesek az EMT-re, így magas invazivitással jellemezhető emlődaganat őssejtek jöhetnek létre, melyek fokozott disszeminációval és kedvezőtlen tumor progresszióval társulnak [209]. A neoplasztikus sejtek többségével ellentétben a daganatőssejteknek alacsony a proliferációs kapacitása, s jóval ellenállóbbak az apoptotikus szignálokkal szemben, ugyanakkor aktívabb *DNA hibajavítással* jellemezhetőek, ami a hagyományos kemo- és radioterápia hatékonyságát csökkenti [210].

A tumor asszociált sztrómasejtek metabolizmusa Warburg átrendeződést mutat, főként a glikolízist részesítik előnyben. Az emlőrákos őssejtek metabolizmusát elsősorban fokozott mitokondriális oxidáció és jelentős metabolikus flexibilitás jellemzi [188, 211], ami elősegíti a tumor progresszióját, valamint hozzájárul a kemorezisztencia kialakulásához (9. ábra) [212].



9. ábra A daganatössejtek metabolikus jellemzői

A magas proliferatív kapacitású tumorsejtek metabolizmusa elsősorban a glikolízist részesíti előnyben (Warburg-hatás), ezáltal elősegítve a tumor növekedését. Ellenben a tumorössejtek anyagcsere folyamatait nagyfokú plaszticitás jellemzi, mely az onkogén hatásokra, mikroenvironmenti vagy az energiaszükséglet változásaira könnyen reagál. A daganatössejteknek kétféle metabolikus fenotípusáról számoltak be, mely szerint a mitokondriális oxidációra támaszkodó fenotípus gyakran kombinálódhat magas glikolitikus fluxussal, ezzel biztosítva a sejtmigrációhoz és metastázisok kialakulásához az energiaforrásokat [213].

Az emlőrák össejteknek két formáját különítjük el, a mezenchima-szerű össejtek CD44 sejt felszíni markert expresszálnak (CD44+/CD24-), míg az epiteliális fenotípusúak aldehid-dehidrogenáz-1 (ALDH1) pozitívást mutatnak [26]. Az emlőtumor össejtek azonosításához gyakran alkalmazott eljárás a nem transzformált emlőszövetben is jelenlévő aldehid-dehidrogenáz enzimaktivitás detektálása. Ginestier és munkatársai alátámasztották, hogy humán emlődaganatokból izolált ALDH1 pozitív sejtek daganatössejtek, melyek NOD/scid egerekben tumorigén hatásúak, képesek tumorok kialakulását indukálni, szemben az ALDH1 negatív sejtekkel [214], ezáltal expressziójuk erős összefüggésben áll a daganat kiújulás kockázatával, valamint a túlélés rövidítésével [164, 173].

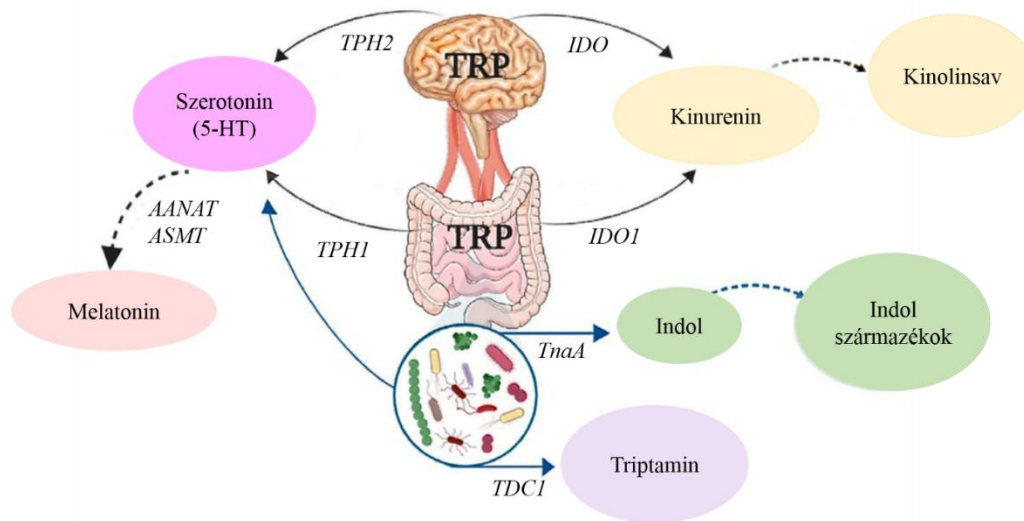
Nemrégiben felismerték, hogy mind az egér és humán emlődaganat őssejtek, illetve mind a korai progenitorok alacsonyabb ROS-szinttel jellemezhetőek, mint a tumorigén potenciállal nem rendelkező sejtek. Az alacsony ROS képződés kritikusnak bizonyult az őssejtek működésének fenntartásában. Az emlőrák őssejtek alacsonyabb ROS tartalma a szabadgyököket eltávolító antioxidáns gének fokozott expressziójával jár. Ha az oxidatív stressz megemelkedik, az csökkenti az őssejtek klonogenitását, és radioszenzitizációt eredményez [163, 215]. A neoplasztikus sejtek a nem transzformált sejtekhez képest érzékenyebben reagálnak a ROS akkumulációra, mely kihasználható a terápia során. Következésképpen az oxidatív stressz indukciója ígéretes megközelítésnek tűnik a rákos sejtek, beleértve a daganatőssejtek szelektív eliminálásához, a normál sejtek működésének minimális károsítása mellett [216, 217].

3.4. Triptofán eredetű bakteriális metabolitok

A triptofán egyike annak a kilenc úgynevezett esszenciális aminosavnak, amelyet az emberi szervezet nem tud előállítani, így megfelelő táplálkozással szükséges a bevitelről gondoskodni. A triptofán fehérjegazdag élelmiszerekben, többek között vörös húsokban, tojásban, halakban, sajt és diófélékben található meg [218]. A táplálékfehérjék emésztése a vékonybélben triptofán felszabaduláshoz vezet, mely a bélhámon keresztül felszívódva a véráramba juthat [219]. Más aminosavaktól eltérően a vérben cirkuláló triptofán elsősorban albuminhoz kötődik, s mindössze 10–20%-a marad szabad formában, mely a szervezet fehérjeszintéziséhez járul hozzá [220]. Ugyanakkor a vastagbélbe lépő triptofán frakciót (4-6 %) kommenzális mikróbák tovább alakítják különféle indol származékokat hozva létre [221]. Habár a bakteriális fehérje katabolizmus termékeket gyakran káros hatásokkal asszociálták, az utóbbi években a mikrobiális triptofán metabolitok pozitív hatásait mutatták ki a szervezet fiziológiai funkcióira [218].

A bakteriális triptofán metabolizmus jelentős mértékű, csíramentes egerekben a szérumban triptofán mennyisége megemelkedik [221, 222]. Az elégtelen táplálék eredetű triptofán bevitel befolyásolja a bél mikrobiom összetételét és az egerek intesztinális immunitását [223], ami megerősíti a bélflóra és a triptofán metabolizmus közti funkcionális kapcsolatokat. Bár több, triptofán - indol konverzióra képes baktériumot is azonosítottak, a humán mikrobiom triptofán metabolizmusban részt vevő komponensei közül számos még ismeretlen [222].

A triptofán bakteriális anyagcseréje több elágazással rendelkezik az alábbiak szerint (10. ábra) [221, 224]:



10. ábra A triptofán metabolizmus három fő útvonala

A táplálék eredetű triptofán esszenciális aminosav, számos bioaktív molekula prekursoraként szolgál, amelyek közül a kék nyíllal jelöltek bakteriális fehérje katabolizmus eredményeként keletkeznek. A szervezetbe kerülő triptofán kisebb hányada szerotoninná (5-hidroxi-triptamin (5-HT)) és a melatoninná alakul a triptofán hidroxiláz (TPH) katalizálta metoxi-indol útvonalon, ugyanakkor a triptofán jelentős részét az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) enzim metabolizálja a kinurenin útvonalon. A triptofán direkt transzformációja során a kommenzális baktériumok által kifejezett triptofanáz (TnaA) az indol származékok képződését katalizálja, míg a mikrobiális triptofán-dekarboxiláz 1 (TDC1) a szerotoninhoz hasonló szerkezetű monoamint, a triptamint állítja elő [225].

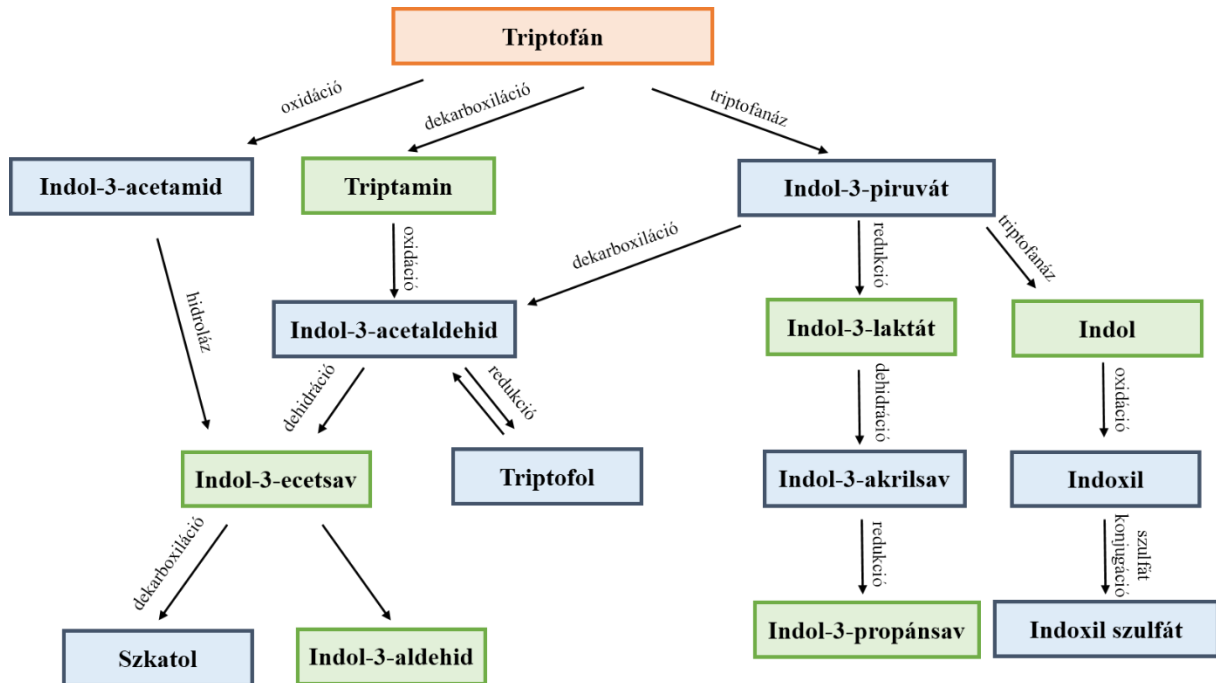
Rövidítések: ASMT (Acetil-szerotonin-metiltransferáz), AANAT (Aril-alkil-amin-N-acetil-transferáz), TPH (triptofán hidroxiláz), IDO (indolamin-2,3-dioxigenáz), TnaA (triptofanáz), TDC1 (triptofán-dekarboxiláz 1), TRP (triptofán)

- A triptofán dekarboxilezése során kommenzális baktériumok triptofán-dekarboxiláz 1 (TDC1) enzime triptamint, a szerotoninhoz hasonló szerkezetű monoamint állít elő [226]. Vad típusú egerekhez képest, a csíramentes egerekben csökkent triptamin szintet állapítottak meg az emésztőrendszerben [227], összhangban a vérkeringésben megnövekedett triptofán mennyiséggel [228]. Az emberi populáció legalább 10%-a tartalmaz minimum egy TDC1 kódoló baktériumot bélközösségükben. Elsősorban a *Clostridium*, a *Ruminococcus*, a *Blautia* és a *Lactobacillus* baktériumfajokat

azonosították, amelyek képesek a triptofánt TDC-függő módon triptaminná alakítani [229].

- Az emésztőrendszeri mikrobiom a triptofánt metabolizálhatja indol- és származékaivá, melyek közül élettanilag a legfontosabbak az indol-3-ecetsav (IAA), az indol-3-aldehid (IAld), és az indol-3-propánsav (IPA) [230]. Az indol képződést a triptofanáz (TnaA) enzim katalizálja, amelyet számos Gram-negatív és Gram-pozitív baktériumfaj, beleértve az *Escherichia coli*, a *Clostridium*, illetve *Bacteroides* fajok is kifejeznek [219, 231]. A TnaA dezaminálja a triptofánt indol-3-piruváttá (IPYA), mely ezt követően indollá metabolizálódik. Az indol további oxidációja, valamint szulfáttal történő konjugálása indoxil szulfátot (IS) eredményez [232].
- Az IAA indol-3-acetamidból (IAM) keletkezik, amelyet *Clostridium*, *Bacteroides* és *Bifidobacterium* fajok által expresszált triptofán-monooxygenáz (TMO) állít elő triptofánból [218, 219], ezt követően elsősorban a *Lactobacillus* nemzetségbe tartozó fajok indol-3-aldehiddé (IAld) alakítják. Az IAA dekarboxilezése során a sertéshús mellékízét okozó 3-metil-indol, más néven szkatol keletkezhet *Bacteroides* és *Clostridium* baktériumfajok révén [218].
- Továbbá a triptofánból két eltérő reakcióúton triptamin és indol-3-piruvát képződhet, melyek, dekarboxiláción illetve oxidáción keresztül indol-3-acetaldehiddé (IAAld) konvergálnak. A keletkező IAAld reverzibilis módon triptofollá (indol-3-etanol) redukálható [233], míg az aldehid-dehidrogenáz (ALDH) enzim IAA-vá alakíthatja [234].
- Aromás-aminosav-aminotranszferáz (ArAT), valamint fenil-laktát-dehidrogenáz (FIDH) függő útvonalon keresztül a triptofánból néhány *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetségbe tartozó baktériumfaj indol-3-laktátot (ILA) termelhet, mely dehidratálása indol-3-akrilsavat (IA) eredményez [23, 219]. Továbbá beszámoltak arról, hogy egyes baktériumok, köztük a *Clostridium sporogenes*, illetve a

Peptostreptococcus fajok az ILA-ot redukálva IPA-vá alakítják (11. ábra) [218, 229, 235].



11. ábra A triptofán bakteriális metabolizmusának áttekintése az emésztőrendszerben

A triptofán összetett anyagcserével rendelkező esszenciális aminosav, mely jelentős része (4–6%) a mikrobiális katabolizmus során számos bioaktív indoltartalmú metabolit prekursoraként hasznosul. A humán gasztrointesztinális traktusban leggyakrabban előforduló indol származékok zöld színnel jelöltek [218, 221, 236, 237].

Az enterális baktériumok triptofánból indol szintézisét katalizálják TnaA enzimaktivitásuk révén, mely a triptofánt hidrolizálva indolt, piruvátot és ammóniát hoz létre [238]. A reakció reverzibilitását figyelték meg, így az enzim indolból és szerinből triptofánt állíthat elő [239]. Számos Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumfajból izolálták a TnaA enzimet [240, 241], mely többek között az IPA és az IS bakteriális metabolitok képződését modulálja [218].

A legszélesebb körben az *Escherichia coliból* származó triptofanáz operont (tnaCAB) tanulmányozták [241], mely két fő szerkezeti génből és egy regulátor génből áll. A TnaA gén az enzimaktivásért felelős, míg a TnaB alacsony affinitású, nagy kapacitású triptofán-

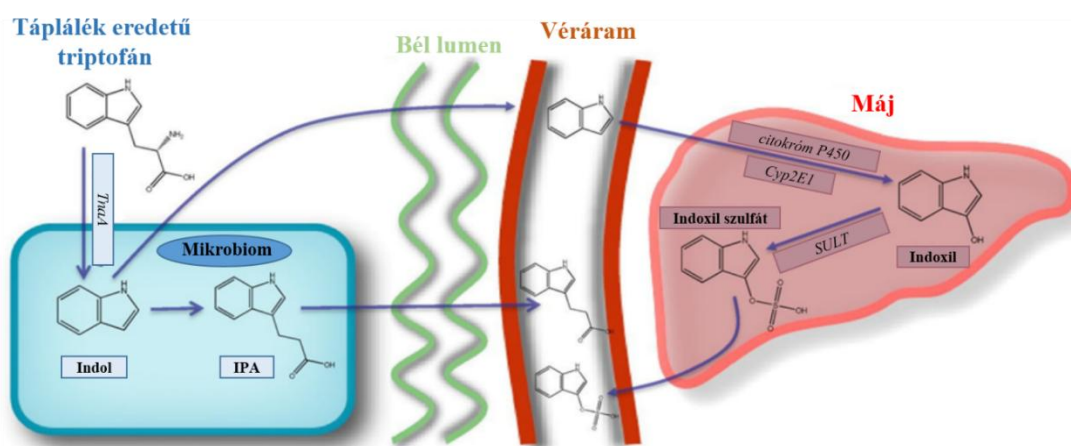
specifikus transzportert kódol [242]. A tnaCAB operont transzkripcióját katabolit represszió szabályozza. A funkcionális gének expresszióját ciklikus AMP (cAMP) és katabolit gén aktivátor fehérje (CAP) komplex váltja ki [243, 244]. Mindemellett az *E. coli* triptofán metabolizmusát a mikrokörnyezet hőmérséklete, pH-ja, valamint antibiotikumok jelenléte is befolyásolja [238]. Ugyanakkor azonosítottak néhány olyan baktériumfajt korábbi vizsgálatokban, melyek nem indukálható módon, hanem konstitutívan termelik az enzimet [240].

3.4.1. Az indolpropánsav és az indoxil szulfát élettani szerepe

Az emésztőrendszeri mikrobiom számos indoltartalmú metabolit előállítására képes, amelyek szisztémásan különféle molekuláris mechanizmusok révén befolyásolhatják a szervezet funkcióit. Az IPA táplálék eredetű triptofán dezaminációja során keletkező, vérkeringésben és cerebrospinális folyadékban egyaránt kimutatható specifikus mikrobiális termék, mely képződéséért a bakteriális TnaA enzim felel [218, 245]. Az emberi szervezet IPA termelését elsősorban *Clostridium sporogenes* jelenléte határozza meg, azonban több kommenzális baktérium, például a *Peptostreptococcus spp.* köztük a *P. russellii*, a *P. anaerobius* és a *P. stomatis*, valamint a *Clostridium cadaveris* és a *Clostridium botulinum* esetében ismert, hogy a triptofánt IA-vá, majd IPA-vá konvertálják [218, 246]. Az IPA szérum koncentrációja az egészséges felnőttekben 0.291–1.095 μM [218, 236, 247].

A bioaktív indoltartalmú metabolitok számtalan molekuláris mechanizmus révén hatást gyakorolnak az élettani folyamatokra. Az IPA modulálja a pro- és antiinflammatorikus gének kifejeződését a bél hámsejtekben [248], jelentősen fokozza az IL-10 gyulladáscsökkentő interleukin termelését, valamint csökkenti a gyulladással kapcsolatos citokinek tumornekrózis-faktor- α (TNF- α) és IFN- γ felszabadulását, hozzájárulva az emésztőrendszeri mikrobiom gyulladásgátló hatásához [219, 221]. Továbbá megfigyelték, hogy colitis ulcerosával diagnosztizált betegekben, illetve colitis ulcerosa egérmodellben, a szérumban csökken az IPA mennyisége, ami arra utal, hogy az orálisan adagolt IPA protektív tulajdonságú lehet ebben a betegségben [230]. Az IPA nemcsak a gasztrointesztinális traktusban expresszálódik, hanem a központi idegrendszer sejtjeiben is, beleértve az idegsejteket, asztrocitákat, és mikroglia sejtet, ahol meghatározó szerepet játszik a neuronok proliferációjában, differenciálódásában, valamint neuroprotektív hatással rendelkezik [219, 236].

Az IS szintén triptofán eredetű bioaktív indol származék [218, 246], mely a triptofán mikrobiális metabolizmusa során keletkezik. A bakteriális TnaA katalizálta reakcióban a triptofán IPYA intermedieren keresztül indollá alakul, majd a szisztémás keringésen át belép a májba, ahol az indolt Cyp2E1 (citokróm P450 2E1) hidroxilálja, valamint a SULT1 és a SULT2 (szulfotranszferáz) enzimek szulfáttal konjugálva IS-t hoznak létre [218, 222]. Ezt követően a keletkező IS ismét a véráramba választódik ki, végül a vesén keresztül ürül (12. ábra) [221, 222].



12. ábra Az indolpropánsav és az indoxil szulfát bakteriális metabolizmusa

A bioaktív indoltartalmú metabolitok, többek között az indolpropánsav (IPA) és az indoxil szulfát (IS) képződését a bakteriális triptofanáz (TnaA) enzim katalizálja, mely a táplálék eredetű triptofánt dezaminálva indol-3-piruvát intermedieren keresztül indolt állít elő. Az indolgyűrűt az emésztőrendszeri mikrobiom, elsősorban *Clostridium sporogenes* által tovább metabolizálhatja aromás-aminosav-aminotranszferáz (ArAT), valamint fenil-laktát-dehidrogenáz (FIDH) függő útvonalon keresztül indolpropánsavvá. Továbbá a keletkező indol a vérkeringésen át a májba jutva Cyp2E1 enzim által hidroxilálódhat, majd szulfotranszferáz enzimek szulfáttal konjugálva indoxil szulfátot hoznak létre. A mikrobiális fehérje katabolizmus során létrejövő indol származékok a vérkeringésbe kiválasztódva számos molekuláris mechanizmus révén befolyásolhatják a szervezet fiziológias működését [218, 232, 246].

Rövidítések: IPA (indolpropánsav), TnaA (triptofanáz), SULT (szulfotranszferáz), Cyp2E1 (citokróm P450 2E1)

Az IS képződését determinálja a kommenzális baktériumflóra, ezáltal csíramentes egerekben nem mutatható ki [246]. Az IS átlagos szérumszintje az egészséges szervezetben 2 μM körül mozog [218, 249, 250]. Magas koncentrációban citotoxikus hatású lehet, krónikus veseelégtelenséggel és vaszkuláris betegségekkel is összefüggésbe hozták,

valamint endoteliális proliferáció és migráció gátlást figyeltek meg, ugyanakkor a pontos patomechanizmus még tisztázatlan [221, 251]. Egyes közlemények beszámoltak az IS oxidatív stresszben betöltött szerepéről, *in vitro* körülmények között fokozza a ROS termelődését [248, 251], mely potenciális hatással lehet az emlőtumor progressziójára.

Az indol származékok, köztük az IPA és az IS Aril-Hidrokarbon Receptor (AHR) ligandumok, továbbá kötődhetnek a Pregnán X-Receptorhoz (PXR) is [218, 252, 253]. Ezen magreceptorok számos molekuláris mechanizmus révén szabályozhatják a biológiai folyamatokban, beleértve a sejtproliferációban, differenciációban és metabolizmusban résztvevő gének transzkripcióját. A magreceptorokat a plazmamembránon áthatoló különféle hormonok (szteroidok, retinoidok és pajzsmirigyhormonok) és lipofil molekulák aktiválhatják, melyek meghatározott DNS-szakaszokhoz kötődve aktiválhatják vagy gátolhatják a szabályozott gének expresszióját. Evolúciósan konzervált, jellegzetes szerkezeti és funkcionális egységekből állnak. Az aminoterminális régió hordozza a variábilis transzaktivációs egységet, az úgynevezett A/B domént, míg a centrális DNS-kötő domén (DBD) két cink-ujj egységet tartalmaz és biztosítja a specifikus DNS-szekvenciához és válaszadó elemekhez való kötődést. A ligand-dependens aktivitásért a karboxiterminális ligand-kötő domén (LBD) felelős, mely elősegíti a lipidoldékony molekulák specifikus felismerését és megkötését [254, 255].

Az AHR a xenobiotikumok metabolizmusában és a vaszkuláris fejlődésben jelentős szerepet játszó, a magreceptorok közé tartozó citoszólikus ligand-aktivált transzkripciós faktor [256]. Az AHR aktiváció kulcsfontosságú az immunrendszer szabályozásában, ligand-specifikus módon befolyásolhatja a veleszületett és adaptív immunválaszt [221], valamint szabályozza a nyálkahártya immunitást. Az elégtelen triptofán bevitel AHR-dependens immunszuppresszív hatású [218, 257]. Az AHR tumorgenezisben betöltött funkcionális jelentősége napjainkban még nem tisztázott, azonban egyes tanulmányokban az AHR agonisták hatásosnak bizonyultak a sejtproliferációs- és a migrációs potenciál csökkentésében [258].

A magreceptor szupercsalád fontos tagja a PXR. Aktivációját számos endogén és exogén ligandum kiválthatja, többek között a szteroidok, antibiotikumok, antimikotikumok és epesavak [259], mely következtében kulcsfontosságú a detoxifikáció szabályozásában, a gyulladásozó immunválaszban, a sejtproliferációban, a glükóz, a koleszterin és a lipid anyagcsere folyamatokban, valamint az endokrin homeosztázis fenntartásában [260]. A PXR tumorszuppresszor funkciójú transzkripciós faktor, azonban az általa közvetített tumorszuppresszív hatások molekuláris háttere nem pontosan ismer [261]. Emlődaganat sejtekben apoptózist és sejtciklus leállást váltott ki iNOS indukcióján keresztül [262].

4. Célkitűzések

Az emberi testben a gazdaszervezettel szoros kapcsolatban nagyszámú baktériumfaj él. Külső és belső tényezők (étrend, higiénia, genetikai tényezők, immunrendszer antibiotikumok és xenobiotikumok szedése stb.) befolyásolhatják a mikrobiom összetételét. Az emésztőrendszeri mikrobiom diszbiózisa számos betegséggel, többek között az emlőtumor kialakulásával is összefüggésbe hozható. Feltételezzük, hogy a bélrendszerben keletkező triptofán eredetű bakteriális metabolitok, az IPA és az IS a vérárammal eljutnak az emlőtumor sejtekhez és megváltoztathatják a tumorsejtek jelátviteli útvonalait, ezáltal befolyásolhatják a rákos sejtek működését. Feltételezzük továbbá, hogy megváltozik ezen metabolitok bioszintézise emlődaganatban.

Ezek alapján vizsgálataink főbb céljai és megválaszolandó kérdései a következők voltak:

- Az IPA és az IS biológiai és citosztikus hatásainak vizsgálata *in vivo* emlőtumor sejtekkel oltott egérmodellben.
- Meghatározni a folyamatokat, amelyeken keresztül az indol származékok daganatellenes hatást gyakorolnak az emlő adenokarcinóma sejtvonalakra.
- Összefüggéseket azonosítani az emlődaganatos betegek túlélése és az antitumor hatásokat közvetítő receptorok, valamint az IS bioszintézist reguláló enzimek kifejeződése között *in silico* elemzések során.
- Az indol származékok hatásaiért felelős receptorok intratumorális expressziójának karakterizálása emlőrákos betegek szövetblokkjain.
- Az indol bioszintézisben résztvevő baktériumok és bakteriális enzimek mennyiségének meghatározása humán emlődaganatos mintákban.

5. Anyagok és módszerek

5.1. Reagensok

A felhasznált anyagokat, többek között az IPA-t (57400) és az IS-t (I3875), a GSH-t (G4251), N-acetil-ciszteint (NAC) (A7250), MitoTEMPO-t (SML0737) és ketokonazol (K1003) Sigma-Aldrich-tól (St. Louis, MO, USA) szereztük be. Kísérleteink során IPA és IS bakteriális metabolitokat a humán referencia szérumkoncentrációnak (IPA 0,4 és 0,8 μM ; IS 2 és 4 μM) megfelelő koncentrációtartományban alkalmaztuk [218, 236, 247, 249, 250, 263]. Az antioxidáns kezeléseket 5 mM végkoncentrációjú GSH és NAC jelenlétében végeztük. A mitokondriumba irányított antioxidáns MitoTEMPO-t 5 μM végkoncentrációban használtuk. A PXR jelátvitelét 25 μM koncentrációjú ketokonazol alkalmazásával gátoltuk, míg a MedChemExpress cégtől (MCE, Monmouth Junction, NJ, USA, HY-12684) beszerzett AHR inhibitor (CH223191) 10 μM végkoncentrációban használtuk.

5.2. Sejtvonalak és sejtenyésztés

Az egér emlőtumor 4T1 és humán emlő adenokarcinóma ZR75-1 sejtvonalakat RPMI-1640; (Sigma-Aldrich, R5886) sejtenyésztő médiumban, 10% hőinaktivált főtális marha szérum (FBS) (Sigma-Aldrich, F2442), 1% penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, P4333), 1% glutamin (Sigma-Aldrich, G7513) és 1% piruvát (Sigma-Aldrich, S8636) jelenlétében 37 °C-on, 5 % szén-dioxid tartalmú inkubátorban tenyésztettük.

Az SKBR-3 és MDA-MB-231 humán emlő adenokarcinóma sejteket Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, 1000 mg/l glükóz, D5546) tápfolyadékban tartottuk fenn, kiegészítve 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin és 1% glutamin keverékkel.

Az MCF7 humán emlő adenokarcinóma sejtvonalat a következő tápközegben növesztettük: Minimum Essential Médium (MEM; Sigma-Aldrich, R8042), 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin és glutamin koktél.

Humán primer fibroblaszt sejteket 20% FBS, 1% penicillin/streptomycin és glutamin tartalmú DMEM (Sigma-Aldrich, 1000 mg/l glükóz, D5546) tápfolyadékban tartottuk fenn 5% szén-dioxid jelenlétében, 37 °C-on.

5.3. *In vitro* sejtproliferációs vizsgálatok

5.3.1. Szulforodamin B teszt

A sejtek proliferációját szulforodamin B (SRB) (Sigma-Aldrich, 230162) festéssel vizsgáltuk. Triklór-ecetsavval (TCA) (Sigma-Aldrich, T6399) fixált mintákban az SRB festék a fehérjék bázikus aminosav oldalláncaihoz pH-függő módon elektrosztatikusan kötődik. Lúgos közegben a festék felszabadul és mennyisége spektrofotometriás módszerrel határozható meg. A sejteket 96-lyukú lemezen (4T1-1500 sejt/lyuk; ZR75-1 – 3000 sejt/lyuk; SKBR-3 – 5000 sejt/lyuk; MDA-MB-231-3000 sejt/lyuk; MCF7–4000 sejt/lyuk; humán fibroblaszt - 7500 sejt/lyuk) tenyésztettük és különböző koncentrációjú IPA-val (0,1 μM ; 0,2 μM ; 0,4 μM ; 0,8 μM ;) vagy IS-sel (0,25 μM ; 0,5 μM ; 1 μM ; 2 μM ; 4 μM) kezeltük 24 órán keresztül. Ezt követően a sejteket 50%-os TCA-ban fixáltuk (végkoncentráció: 10%), és 1 órán át 4 °C-on inkubáltuk. A sejtenyésző lemezeket desztillált vízzel mostuk 5 alkalommal, majd 0,4% (m/V) 1 %-os ecetsavas SRB oldattal festettük 10 percig. A nem kötődött festéket 1%-os ecetsavval, ötször ismételt mosással távolítottuk el. A kötött festéket 10 mM-os Tris bázisban oldottuk fel, majd az abszorbanciát 540 nm hullámhosszon detektáltuk spektrofotométerrel (Thermo Labsystems Multiskan MS, Waltham, MA, USA) [203].

5.3.2. Kolónia formálás vizsgálat

A sejtek kolónia formáló képességének vizsgálatához 6-lyukú lemezekben szélesztettük a sejteket (4T1-500 sejt/lyuk; MCF7-1000 sejt/lyuk; SKBR-3-1500 sejt/lyuk) teljes táptalajban, majd IPA és IS bakteriális metabolitokkal kezeltük 7 napon át. Kezeléseket követően a kolóniákat kétszer mostuk PBS-ben, majd 15 percen keresztül metanolban fixáltuk, levegőn szárítottuk, végül May-Grünwald-Giemsa oldattal 20 percig festettük. A kolóniák számát Image J szoftver segítségével határoztuk meg.

5.4. Citotoxicitás meghatározása

Az IPA és IS kezelések által kiváltott sejtpusztulást propidium-jodid (PI; Biotium, Fremont, CA, USA, 40016) felvétellel vizsgáltuk. A sejteket 6-lyukú lemezen szélesztettük (4T1-75000 sejt/lyuk; MCF7-150000 sejt/lyuk; SKBR-3–200000 sejt/lyuk; humán fibroblaszt - 200000 sejt/lyuk) és kezeltük IPA-val és IS-sel 24 órán keresztül. A sejteket 100 µg/ml PI oldattal jelöltük 37 °C-on 30 percig, majd PBS mosást követően áramlási citométerrel (FACS Calibur, BD Biosciences) analizáltuk a mintákat.

5.5. Apoptózis vizsgálata AnnexinV-FITC-propidium-jodid kettős jelöléssel

Az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányának meghatározásához AnnexinV-FITC-propidium-jodid (Invitrogen, OR, USA, V13242) kettős festést végeztünk. Az apoptotikus sejtek korai markere a citoplazmamembrán belső oldalán lokalizálódó foszfatidil-szerin (PS) áthelyeződése a külső membránra, melyet fluoreszcens festékekkel (FITC) konjugált AnnexinV molekula kötődésével detektáltunk. A nekrotikus sejtek elkülönítéséhez PI jelölést alkalmaztunk. A sejteket 6-lyukú lemezekon (4T1-75000 sejt/lyuk; MCF7–150000 sejt/lyuk; SKBR-3–200000 sejt/lyuk; humán fibroblaszt - 200000 sejt/lyuk) szélesztettük, majd 24 óráig IPA és IS kezelés után 10^5 számú sejtet 100 µg/ml PI oldattal és 5 µl AnnexinV-FITC festékekkel jelöltük, a gyártói utasítást követve. Az apoptotikus és a nekrotikus sejtek számát áramlási citometriával, Flowing Software 2.5.1. segítségével elemeztük.

5.6. Impedancia alapú sejtanalízis

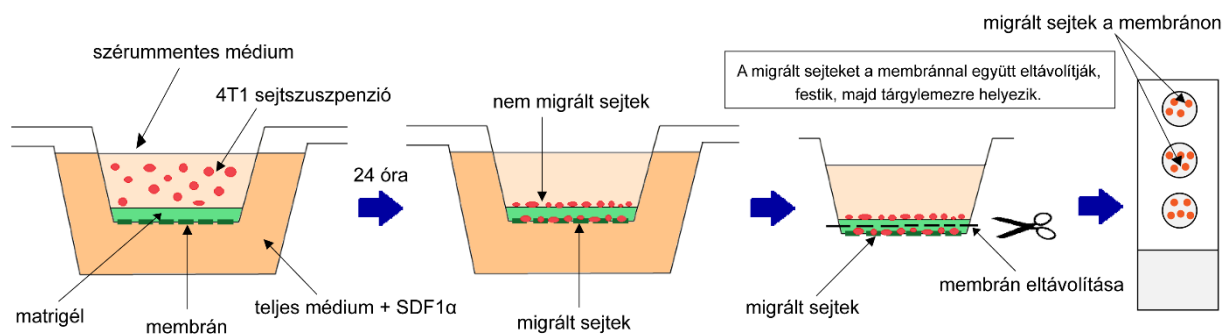
Impedancia alapú sejtdhéziós méréseket ECIS Z Θ készüléken (ECIS Z modell, Applied BioPhysics Inc. Troy, NY, USA) végeztük sejt-sejt és sejt-felszín kapcsolatok meghatározásához. A 4T1 sejteket (40000 sejt/lyuk) speciális, aranyelektrodás 8W10E 8-lyukú kamrában növesztettük 20 órán keresztül, majd IPA és IS kezeléseket követően a letapadt sejtek impedancia spektrumát 24 órán át folyamatosan mértük. Váltakozó feszültségű méréseket a következő frekvenciák mellett: 62,5, 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 8000, 16 000, 32 000 és 64 000 Hz végeztük. A referenciaként sejt nélküli tápfolyadékot használtunk [20].

5.7. Immuncitokémia

Az immuncitokémiai vizsgálatokat hasonlóan végeztük el, mint [20]. A konfokális mikroszkóppal végzett mérésekhez a 4T1 sejteket fedőlemezek felszínére növesztettük, majd 24 órán át IPA vagy IS megadott koncentrációival kezeltük. A sejteket PBS mosást követően 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 15 percig, majd 1%-os Triton X-100-PBS oldatban 5 percig permeabilizáltuk szobahőmérsékleten. Ezután 1% BSA-PBS oldatban blokkoltuk az aspecifikus kötőhelyeket 1 órán át, majd TexasRed-X Phalloidin festékkel (1: 150, Invitrogen, Oregon, USA, T7471, 1 óra, 4 °C) jelöltük a citoskeletális aktint a mintákban. A sejtmagokat DAPI (1:10, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA, R37606) festéssel vizualizáltuk. Háromszori PBS mosást követően a fedőlemezeken lévő sejteket Mowiol/Dabco oldatban tárgylemezre fordítottuk. A mikroszkópos felvételeket Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóppal készítettük, és LAS AFv3.1.3 szoftverrel dolgoztuk fel.

5.8. Sejtmigrációs teszt

A 4T1 sejteken Boyden-kamrában (Corning BioCoat Matrigel inváziós kamra; Corning, NY, USA 354480, 354481) migrációs tesztekét végeztünk hasonlóan, mint [19]. A migrációs kamrákban a sejteket Matrigellel előkezelt membránokon (50000 sejt/lyuk) szérumentes tápközegben tenyésztettük, majd 24 órán keresztül 2 μ M IS-sel kezeltük. A migráció kiváltására a kamra alsó része szérummal kiegészített tápfolyadékot és 100 ng/ml SDF-1 α (Sigma-Aldrich, SRP4388) kemoattraktánst tartalmazott. A nem migráló 4T1 sejteket PBS oldatban történt mosással eltávolítottuk a membrán felszínéről, ezután a migrációt mutató, az alsó membránhoz kötődött sejteket a gyártó utasításainak megfelelően fixáltuk, hematoxilin-eozin (VWR, PA, USA, 95057-844) festékkel festettük, majd tárgylemezre helyeztük a membránt (13. ábra). A mintákról Opera Phoenix nagy áteresztőképességű konfokális képalkotó berendezéssel készített felvételeket Harmony 4.6 szoftver segítségével analizáltuk. A migráció meghatározásához a Matrigél kontroll membránon keresztül migrált sejtek százalékos arányát használtuk.



13. ábra A sejtmigrációs teszt sematikus összefoglalása

A 4T1 sejteket szérumentes közegben a Boyden-kamra felső részében tenyésztettük és 24 órán át 2 μ M indoxil szulfáttal kezeltük, míg a kamra alsó felében lévő szérummal és kemoattraktánsal kiegészített médium elősegítette a sejtek vándorlását. 24 óra elteltével, a nem átvándorolt sejteket eltávolítottuk, majd az alsó membránhoz kötött átvándorolt sejteket hematoxilin-eozin festékekkel jelöltük és tárgylemezre helyeztük.

5.9. Az emlődaganat őssejtek vizsgálata

5.9.1. Oxigénfogyasztás és az extracelluláris savasodás mérés

A 4T1 sejtek oxigénfogyasztását (oxygen consumption rate (OCR, a mitokondriális oxidációra jellemző érték) és a pH változásokat, az úgynevezett extracelluláris savasodási mértékét (extracellular acidification rate (ECAR), a glikolízis mérése) XF96 oximéterrel (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA, USA) határoztuk meg. A 4T1 sejteket 96-lyukú XF96 lemezekben tenyésztettük (2000 sejt/lyuk) és kezeltük 2 μ M és 4 μ M koncentrációjú IS-sel 24 órán át. Az OCR és ECAR értékeket 30 percenként rögzítettük, majd az adatokat SRB teszt segítségével a fehérjetartalomra normalizálva ábrázoltuk.

5.9.2. Aldehyd-dehidrogenáz (ALDH) pozitívitás mérés

Az emlőtumor őssejtek azonosításához az ALDH1 pozitív sejtek arányát a populációban Aldefluor festés (StemCell Technologies, Vancouver, Kanada, 01700) segítségével határoztuk meg. A 4T1 sejteket 6-lyukú lemezekben növesztettük (100000 sejt/lyuk), és 24 órán át kezeltük IPA (0.8 μ M) és IS (4 μ M) adott koncentrációval. Pozitív kontrollként SKBR-3 sejtvonalat

használtunk. A gyártói utasítás alapján előkészített és festett minták ALDH1 sejtarány változását áramlási citométerrel detektáltuk, az eredményeket a Flowing Software 2.5.1 használatával értékeltük. A méréseket a hasonlóan végeztük, mint [19].

5.10. A lipidperoxidáció vizsgálata

Az oxidatív-nitrozatív stressz során keletkező ROS és RNI, elsősorban a többszörösen telítetlen lipidek peroxidációját előidézve, reaktív elektrofil aldehidek (4-hidroxinonenál (4HNE) és malondialdehid (MDA)) keletkezését indukálja [264]. Ezen bioaktív markerek a fehérjék lizin, cisztein és hisztidin oldalláncjaihoz kovalensen kötődve stabil protein adduktot képeznek [265], meghatározásuk kulcsfontosságú az oxidatív folyamatok intenzitásának monitorozásához. A lipidperoxidációt a tiobarbitursav-reaktív termékek (TBARS) meghatározásával [266], valamint a 4HNE-módosított fehérjék Western blot technikával történt kimutatásával jellemeztük [138]. A 4T1 sejteket 75 cm²-es sejtenyésző flaskákban növesztettük, majd 24 órán keresztül kezeltük IPA (0.4 μM vagy 0.8 μM) vagy IS (2 μM vagy 4 μM) metabolitokkal. További kísérletekben 0.8 μM IPA és GSH/NAC antioxidáns (5 mM) kombinációkkal, valamint IS (2 μM vagy 4 μM) és AHR (10 μM) vagy PXR (25 μM) receptor inhibitorokkal kezeltük a sejteket. A PBS oldatban mosott és centrifugálással ülepített sejtpellethez hozzáadtunk 8,1% SDS-t, 20% ecetsavat, 0,8% tiobarbitursavat (TBA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, T5500) és desztillált vizet, majd 96 °C-on 1 órán át melegítettük. A minták hűtését és centrifugálását követően a sejtfelülűző abszorbanciáját 540 nm hullámhosszon mértük.

5.11. mRNS izolálás, reverz transzkripció és RT-qPCR

A reverz transzkripciót követő PCR reakciót (RT-qPCR) hasonlóan végeztük [267]. A sejtekből totál RNS-t TRIzol reagens (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA, 15596026) alkalmazásával izoláltuk, a gyártói utasításnak megfelelően. A minták tisztaságát és koncentrációját NanoDrop1000 készülékkel (Thermo Labsystems Multiskan MS, Waltham, MA, USA) ellenőriztük.

A reverz transzkriptáz (RT) reakció során a gyártó leírását követtük (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA, 4368814) és 2 μg RNS-t használtunk fel. Az RT reakciót

követően nyert cDNS mintákat tízszeresére hígítottuk és valós idejű kvantitatív PCR (qPCR) reakciót végeztünk, az amplifikációhoz qPCR BIO syGreen Lo-ROX Supermixet (PCR Biosystems Ltd., London, Egyesült Királyság, PB20.11-01), valamint a vizsgálandó gének primerpárjait használtuk.

A kvantitatív PCR során használt primereket Primer3 v0.4.0 szoftverrel (<https://primer3.ut.ee/>) terveztük és az ellenőrzésüket Oligo Analyser v1.0.2 programmal végeztük. A primerpárok specificitását blastn programmal (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ellenőriztük. A génexpressziós vizsgálatokat Light-Cycler 480 II készülékkel (Roche Applied Science, Bázél, Svájc) végeztük. Minden minta esetében három technikai párhuzamossal dolgoztunk, valamint nukleázmentes víz kontrollt alkalmaztunk. Az adatokat háztartási gének (36B4, ciklofillin) geometriai átlagához normalizáltuk. A vizsgált gének relatív expresszióját a mintákban $\Delta\Delta CP$ módszerrel állapítottuk meg. A felhasznált primerek szekvenciái az 5. táblázatban olvashatóak.

5. táblázat RT-qPCR reakciókban alkalmazott egér és humán primerpárok

Gén név	Egér forward primer (5'-3')	Egér reverz primer (5'-3')
36B4	AGATTCGGGATATGCTGTTGG	AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC
CAT	CCTTCAAGTTGGTTAATGCAGA	CAAGTTTTTGATGCCCTGGT
Ciklofillin	TGGAGAGACCAAGACAGACA	TGCCGGAGTCGACAATGAT
Fgfbp1	CAAGGTCCAAGAAGCTGTCTCCA	AGCTCCAAGATTCCCCACAGAAC
GPX2	GTTCTCGGCTTCCCTTGC	TTCAGGATCTCCTCGTTCTGA
GPX3	GGCTTCCCTTCCAACCAA	CCCACCTGGTCGAACATACT
MMP9	CATTCGCGTGGATAAGGAGT	ACCTGGTTCACCTCATGGTC
SOD3	CTCTTGGGAGAGCCTGACA	GCCAGTAGCAAGCCGTAGAA
Tgfb3	GGCGTCTCAAGAAGCAAAGGAT	CCTTAGGTTTCGTGGACCCATTTC
Vim	CTCCAGAGAGAGGAAGCCGAAAG	CCTGGATCTCTTCATCGTGCAGT

Gén név	Humán forward primer (5'-3')	Humán reverz primer (5'-3')
36B4	CCATTGAAATCCTGAGTGATGTG	GTCGAACACCTGCTGGATGAC
AHR	TTGAACCATCCCCATACCCAC	GAGGTTCTGGCTGGCACTGATA
Ciklofillin	GTCTCCTTTGAGCTGTTTGCAGAC	CTTGCCACCAGTGCCATTATG
PXR	AGTGAAGGTTCCCGAGGACATG	TTGTACAGAGCATACCCAGCA

5.12. Fehérje extrakció és Western blot

A fehérje minták tisztítását, elválasztását és analízisét [20] alapján végeztük. A 4T1 sejteket RIPA pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% TritonX 100, 0,5% nátrium-deoxikolát, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PSMF, 1 mM NaF, proteáz inhibitor koktél) lizáltuk. A minták fehérjetartalmát Pierce BCA reagenssel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 23225) mértük. A fehérje lizátumok (20-50 µg) molekulatömeg szerinti elválasztását 10%-os SDS poliakrilamid gélen végeztük molekulasúly marker mellett (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA, 26619), majd nitrocellulóz membránokra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, 1620097) blottoltuk a fehérjesávokat. Ezután a membrán szabad kötőhelyeit 5%-os BSA-t tartalmazó 1xTBS-Tween pufferben blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten, majd a vizsgált fehérjék ellen termeltetett elsődleges antitestekkel jelöltük egy éjszakán át 4 °C-on (6. táblázat). A membránokat 1x TBS-Tween oldattal történő ismételt mosása után 1 órán keresztül szobahőmérsékleten, az elsődleges antitestnek megfelelő peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel (1: 2000, Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA, 7074) jelöltük. Végül a membránokat kétszer 10 percig TBS-Tween pufferben, és egyszer 10 percig TBS-ben mostuk. Az antitestekkel jelölt sávokat kemilumineszcens reakcióval (SuperSignal West Pico Solutions, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA, 35060), ChemiDoc Touch Imaging géldokumentációs rendszerrel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) detektáltuk. A sávok intenzitását Image J szoftverrel határoztuk meg [268].

6. táblázat A Western blot vizsgálatokhoz használt antitestek és azok hígításai

Antitest	Alkalmazott hígítás	Forgalmazó
4HNE	1:1000	Abcam (ab46545)
ACC	1:1000	Cell Signaling (#3676)
AMPK α	1:1000	Cell Signaling (#5832)
Anti-egér IgG, Peroxidáz antitest	1:2000	Sigma-Aldrich (A9044)
Anti-nyúl IgG, HRP-konjugált antitest	1:2000	Cell Signaling (#7074)
E-cadherin	1:1000	Cell signaling (#3195)
FOXO1	1:1000	Cell Signaling (#9454)
iNOS	1:1000	Novus (NB300-605)
Nitrotirozin	1:1000	Millipore (06-284)
NRF2	1:1000	Abcam (ab31163)
PGC1 β	1:1000	Abcam (ab176328)
Foszfó-ACC (Ser79)	1:1000	Cell Signaling (#3661)
Foszfó-AMPK α (Thr172)	1:1000	Cell Signaling (#2535)
Snail	1:1000	Cell signaling (#3879)
Vimentin	1:1000	Cell signaling (#5741)
ZO-1	1:1000	Cell signaling (#8193)
β -Aktin	1:20000	Sigma-Aldrich (A3854)
β -Catenin	1:1000	Sigma-Aldrich (C7082)

5.13. Humán székletfehérje lizátumok előállítása

A székletfehérjéket a leírtak szerint izoláltuk [19, 269]. A 3-as betegcsoportba tartozó (I. később) székletmintákat RIPA lízis pufferben (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 0,5% nátrium-deoxikolát, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, proteáz inhibitor koktél) homogenizáltuk, majd (Qsonica Q125 Sonicator, Newtown, Connecticut, USA) 3-szor 30 másodperc 50% -os amplitúdójú ultrahanggal feltártuk. Centrifugálást követően 100 μ l sejtfelülészóhoz 8 μ l β -merkaptotetanolt és 25 μ l 5x SDS mintapuffert (50% glicerin, 10% SDS, 310 mM Tris HCl, pH 6,8, 100 mM ditiotreitolt (DTT),

0,01% brómfenolkék) adtunk. Végül a széketfehérje mintákat 10 percig 96 °C-on melegítettük, és későbbi feldolgozásig -70 °C-on tároltuk.

5.14. E. coli TnaA meghatározása

Az *E. coli* DH5a sejteket folyékony LB táptalajban tenyésztettük, és egy éjszakán át 37 °C-on inkubáltuk óvatos rázatás mellett. A centrifugálással ülepített sejteket RIPA puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 1% TritonX 100, 0,5% nátrium-dezoxikolat, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 1 mM NaF, proteáz inhibitor koktél) felhasználásával lizáltuk. Ezután a mintákat háromszor 30 másodpercig, 50%-os amplitúdó mellett ultrahanggal szonikáltuk (Branson Ultrasonic Sonifier S-250A, Thermo Fisher Scientific Inc. Rockford, IL, USA). Centrifugálás után 8 µl β-merkaptóetanolt és 25 µl 5x SDS mintapuffert (50% glicerin, 10% SDS, 310 mM Tris HCl, pH 6,8, 100 mM DTT, 0,01% brómfenolkék) adtunk hozzá 100 µl sejtfelülúszóhoz. Ezt követően a mintákat 10 percen keresztül 96 °C-on melegítettük, majd -70 °C-on tároltuk felhasználásig. A fehérje extraktumokat (40 µl) 8%-os SDS-PAGE gélen szeparáltuk és nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Hercules, CA, USA, 1620097) transzferáltuk. A membránon elválasztott fehérjéket Ponceau-vörös festékkel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, P7170) jelöltük, majd PBS-ben történt mosásokat követően az aspecifikus kötőhelyeket 1 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk 5%-os BSA tartalmú 1x TBS-Tween pufferben. Ezután a membránokat TnaA ellenes elsődleges antitesttel (1:2000, Assaypro, St. Charles, USA, 35517-05111) inkubáltuk egy éjszakán át 4 °C hőmérsékleten. Háromszor 10 perc TBS-Tween oldatban történt mosás után 1 órán át peroxidázzal jelölt másodlagos antitesttel (1: 2000, Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA, 7074) inkubáltuk a membránokat, majd kétszer 10 perc TBS-Tween és 1-szer 10 perc TBS oldattal mostuk. A kemilumineszcens jelet ChemiDoc Touch Imaging készülékkel (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) tettük láthatóvá. A blottok értékeléséhez Image J szoftvert használtunk, majd Ponceau-vörös festékkel jelölt teljes fehérjetartalomra normalizáltuk. A kísérletben használt elsődleges és a másodlagos antitesteket az 7. táblázat tartalmazza.

7. táblázat Az *E. coli* TnaA meghatározásához használt elsődleges antitestek és hígításai

Antitest	Alkalmazott hígítás	Forgalmazó
Anti-egér IgG, Peroxidáz antitest	1:2000	Sigma-Aldrich (A9044)
<i>E. coli</i> TnaA	1:2000	Assaypro (33517-05111)

5.15. Állatkísérletek

5.15.1. Kísérleti állatok

Az állatkísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága (DEMÁB) által jóváhagyott és regisztrált engedély alapján (engedély száma: 1/2015/DEMÁB) végeztük, összhangban a hatályos 1998. évi XXVIII. „Az állatok védelméről és kíméletéről” szóló törvény, a 40/2013. „Kormányrendelet az állatkísérletekről” és az Európai Unió (2010/63/EU Direktíva) „Irányelv a tudományos célokra felhasznált állatok védelméről” előírásaival. Állatkísérleteket az ARRIVE irányelveknek megfelelően írjuk le.

Munkánkhoz 14-16 hetes (20-25 gramm), immunkompetens BALB/c nőstény egereket véletlenszerűen kiválasztva kettő, 10-10 fős kísérleti csoportba soroltuk. Összesen 20-20 egeret, kísérletenként 10 kontroll és 10 IPA vagy IS kezelt egeret használtunk fel. Az állatokat a Debreceni Egyetem Élettudományi Központ Kísérleti Állatház „MD” (minimal disease) területén tartottuk, a kísérletek során a kezeléseket SPF (specifikus kórokozómentes) minőségű részlegén végeztük. Az előírásoknak megfelelően naponta almozott, papírcsővel környezetgazdagított, standard méretű (65 × 207 × 140 mm, felülete 530 cm²) ketrecekbe legfeljebb öt egeret helyeztünk el. Az állatokat kontrollált körülmények között 12-12 óra sötétvilágos ciklusokat váltva, egyenletes hőmérsékleten, az ivóvízhez és rágcsálótáphoz szabad hozzáférést biztosítva tartottuk. Minden állat az irányelvek szerint humánus bánásmódban részesült, gondozásukat megfelelő szakképesítésű személyzet, állatorvosi felügyelet mellett látta el.

5.15.2. 4T1 emlőtumor xenograft létrehozása BALB/c egerekben

Kísérleteink során PBS-ben oldott 2×10^6 /ml számú 4T1 sejteket megegyező térfogatú jéghideg Matrigélben (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, E1270) szuszpendáltuk, majd 50-50 μ l térfogatú injekció formájában nőstény BALB/c egerek második inguinális emlőbimbója alá oltottuk mindkét oldalon (10^5 sejt/injekció). A tumor növekedését és az állatok egészségi állapotát naponta ellenőriztük (14. ábra).

5.15.3. IPA kezelés

A kísérlethez 10 kontroll és 10 IPA kezelt egeret használtunk fel. A kezeléseket orális szondázással („gavage”) 1 nmol/g (0.18921 mg/ttkg) dózisban, naponta 9 és 11 óra között ugyanabban az időben végeztük el 2 héten keresztül. A dózis korrelált az IPA szérum referencia koncentrációjával [236, 247]. A kezeléshez használt IPA törzsoldatot sterilizált csapvízben oldva készítettük (15 mM) és -20 °C-on tároltuk, melyből mindennap frissen hígítottunk 150 μ M koncentrációjú munkaoldatot. Az IPA kísérleti csoportba osztott állatok naponta 100 μ l/30 ttg terápiás dózisban részesültek, míg a kontroll egerek sterilizált csapvizet kaptak „*per os*”. Az oltást követő 14. napon nyaki diszlokációval történt az állatok terminálása, mely során az elsődleges daganatokat és áttéteket eltávolítottuk későbbi szövettani elemzés céljából. A kísérlet típusa randomizált, placebo-kontrollált kettős-vak vizsgálat volt (14. ábra).

5.15.4. IS kezelés

A kísérlet során az IS kezelt csoportba véletlenszerűen sorolt 10 egér orális szondán keresztül IS kezelésben részesült naponta egyszer, 9 és 11 óra között (2 nmol/g dózis), míg a kontroll csoporthoz tartozó 10 egér sterilizált csapvizet kapott. Az alkalmazott dózis az IS szérum referencia koncentrációjához hasonló volt [249, 250, 263]. Az IS törzsoldatot (60 mM) sterilizált csapvízben készítettük, s felhasználásig -20 °C-on tároltuk. Ezt a törzsoldatot hígítottuk a továbbiakban mindennap a kezelések előtt sterilizált csapvízben, melyből 100 μ l/30 ttg dózist kaptak. Az állatokat nyaki diszlokációval termináltuk az oltástól számított 14. napon, majd szövettani vizsgálatokhoz a primer tumorokat és metasztázisokat eltávolítottuk (14. ábra).

Boncolás során a primer és metasztatikus tumorokat egyaránt eltávolítottuk, tömegüket analitikai mérlegen határoztuk meg (14. ábra).

A TIL arányát formalinban fixált, paraffinba ágyazott, majd hematoxin-eozinnal festett (VWR, PA, USA, 95057-844) szövettani mintákban határozta meg Dr. Csonka Tamás (TIL száma/100 tumorsejt).

A mitózis értékelését a következők alapján végezte:

- 1 pont: kevesebb, mint 6 mitotikus sejt
- 2 pont: 7-13 mitotikus sejt
- 3 pont: több mint 14 mitotikus sejt

5.16. Humán mintákon végzett epidemiológiai vizsgálatok

Az indol származékok bakteriális bioszintézis változását, valamint az IPA és IS hatásait közvetítő receptorok kifejeződését három eltérő betegcsoport mintáin vizsgáltuk.

5.16.1 Humán széklet DNS minták vizsgálata (Betegcsoport 1.)

Vizsgálataink során 48 kontroll és 46 emlőtumoros beteg széklet DNS mintáit használtuk fel, melyekből meghatároztuk a TnaA-t kódoló DNS mennyiségét.

A humán székletmintákat 50 és 74 év közötti egészséges önkéntesektől és emlőrákos betegektől kollaborációs partnereink az amerikai Nemzeti Rákkutató Intézetben (National Cancer Institute - NCI), a Coloradói Kaiser Permanente Egészségkutató Intézetben (Kaiser Permanente Colorado Institute for Health Research - KPCO IHR), a Marylandi Orvostudományi Egyetem Genomikai és Bioinformatikai Kutatóközpontjában (University of Maryland School of Medicine Institute for Genome Sciences – UMSOM IGS), és a Research Triangle Instituteban gyűjtötték. A tanulmány részletei az alábbi táblázatban láthatóak.

8. táblázat Betegcsoport 1.

Betegcsoport 1.	Egészséges önkéntes	Emlőtumoros beteg			
Létszám	48	46			
		0. stádium	I. stádium	II. stádium	III. stádium
		11	23	10	2
Életkor	50-74 év				

A Betegcsoport 1. mintáit Goedert és munkatársai adták rendelkezésünkre [14]. A betegek stádiumba osztása Howlader és munkatársai által leírtaknak megfelelően történt [270].

A vizsgálati protokollt és mintaanyagot mind a NCI, KPCO és RTI intézetek Intézményi Felülvizsgálati Testületei (Institutional Review Board – IRB) jóváhagyták (IRB szám: 11CN235). A tanulmány eredményeit Goedert és munkatársai publikálták [14]. A vizsgálatok elvégzése előtt beleegyező nyilatkozatot írtak alá a résztvevők.

A tanulmány során használt módszereket a vonatkozó irányelveknek és előírásoknak megfelelően hajtottuk végre. A bakteriális TnaA-t kódoló DNS mennyiségét a Betegcsoport 1. mintáiban qPCR reakcióval határoztuk meg, melyhez 10 ng széklet DNS-t használtunk. A primereket az 9. táblázat tartalmazza.

9. táblázat Bakteriális TnaA kifejeződésének vizsgálata során az RT-qPCR reakciókhoz használt oligonukleotidok szekvenciái

Gén név	Forward primer (5'-3')	Reverz primer (5'-3')
<i>Alistipes shahii</i>	GCCTCGAAGACGATCAAGGAGAT	TCGAACATGATGCTGAACGACAT
<i>Bacteriodes xyloxydans</i>	AACTGGAAATCCCGTTCAAAGGA	GTACGGGTTTGCCGTATTTGTCA
<i>Clostridium sp.</i>	GATGGAACGTCCAAACACTTTTCG	ATATTTTCCGCCTTCCGGAACCTT
<i>Providencia rettgeri</i>	CGTTTACGTGAGGGAGGGATTTC	ACCGCACGAACACCAGATTCTAA

5.16.2. Az IPA és IS hatásait közvetítő receptorok kifejeződése emlőtumoros betegek szövetmintáiban (Betegcsoport 2.)

Az IPA és IS receptorok intratumorális expressziójának azonosításához szöveti mikroarray segítségével (tissue microarray - TMA) Dr. Csonka Tamás immunhisztokémiai vizsgálatokat végzett 88 emlőrákos beteg archivált szövetblokkjainak felhasználásával.

Az emlőrákos szövetek sebészi kimetszését követően, formalinban fixált és paraffinba ágyazott szöveti mikroblokkok (TMA) készültek [271]. A vizsgálat a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottságának engedélyével valósult meg.

A blokkok immunhisztokémiai festését követően a minták értékelése a festődés intenzitását és százalékos arányát egyaránt figyelembe vevő „H-score” pontrendszer alapján történt [272]. Szöveti blokkonként három technikai párhuzamos készült.

A vizsgálatban résztvevő betegek szövettani mintái különböző szempontok szerint osztályozhatóak. A primer daganat mérete, a regionális nyirokcsomó érintettsége és távoli áttétek jelenléte alapján (TNM stádium) került meghatározásra a műtéti preparátum patológiai stádiuma [87]. A tumorsejtek differenciáltsági fokát a prognosztikai jelentőségű szövettani grádus (Nottingham-grade) értékeli, figyelembe véve a nukleáris pleomorfizmust, a mitotikus aktivitást, valamint a tubulusképző hajlamot. A szövettani blokkok patológiai leletezését Dr. Csonka Tamás és Dr. Török Miklós végezte.

Az immunhisztokémiai festés elemzése Leica Bond Max™ protokoll alapján történt. A TMA vizsgálatokhoz használt antitesteket az 10. táblázat foglalja össze.

10. táblázat A szöveti mikroarray vizsgálatok során alkalmazott antitestek és hígításai

Antitest	Alkalmazott hígítás	Forgalmazó
AHR	1:200	Sigma-Aldrich (HPA029722)
PXR	1:1000	Thermo Fisher Scientific (PA5-72551)

5.16.3. E. coli TnaA expresszió meghatározása humán széklet fehérje mintákban (Betegcsoport 3.)

Az *E. coli* TnaA fehérje szintű génexpressziós változásait 35 emlőrákos nő széklet fehérje mintáiban vizsgáltuk. A tanulmányba I. – III. patológiai stádiumú (TNM), valamint 1–3. Nottingham szövettani grádus besorolású, 57 év átlagéletkorú beteget válogattak be kollaborációs partnereink.

A tanulmányhoz invazív dukális karcinómák nem speciális típusaként (NST) azonosított, valamint invazív lobuláris karcinóma (ILC) szövettani besorolású betegek székletmintáit gyűjtöttük. Az egyéb szövettani típusú tumorokat kizárták.

A székletminták gyűjtése és biobank létrehozása az Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT) jóváhagyásával történt. A széklet transzplantációs eljárásokra vonatkozó hazai irányelv szerint a következő kritériumoknak eleget tevő betegeket kizárták a vizsgálatból: (1) kórtörténetében emlőrák szerepel, vagy neoplázia miatt műtötték, (2) ismeretlen eredetű betegségben szenved, (3) krónikus fertőző betegségben szenved, (4) 6 hónappal korábban fertőző hasmenése volt, (5) antibiotikumot szedett a jelentkezést megelőző 6 hónapon belül, (6) kemoterápiát, biológiai terápiát vagy immunszuppresszív terápiát kapott 6 hónappal a jelentkezés előtt, (7) intravénás gyógyszereket használt a beálogatás előtt 12 hónappal, (8) piercing, tetoválás, akupunktúra vagy egyéb veszélyeztető magatartás vagy cselekvés a jelentkezést megelőző 12 hónapban, (9) allergén okozta túlérzékenységi reakció, (10) 12 hónappal a jelentkezés előtt kolonoszkópián való részvétel. A tanulmányhoz az első reggeli székletből vett mintákat gyűjtöttük, majd a lefagyasztottuk és biobankba helyeztük a székletürítést követő két órán belül. A mintákat későbbi feldolgozásig -70 °C-on tároltuk. A

vizsgálatban résztvevők betegtájékoztatót követően beleegyezésüket adták. A vizsgálat során értékeltük a betegek kóros adatait és összehasonlítottuk az *E. coli* TnaA expresszióját a székletmintákban.

5.17. *In silico* analízis

Emlődaganatos betegek túlélése és a vizsgált gének (AHR, PXR, Cyp2E1, SULT1A1 és SULT1A2) kifejeződése közötti összefüggést Kaplan-Meier plotter adatbázis (<https://kmplot.com/analysis/>) alkalmazásával elemeztük [271]. A TnaA szekvenciáját a KEGG (www.genome.jp/kegg/), PATRIC (<https://www.patricbrc.org/>) és az Uniprot (www.uniprot.org) adatbázisok segítségével határoztuk meg.

5.18. Statisztikai analízis

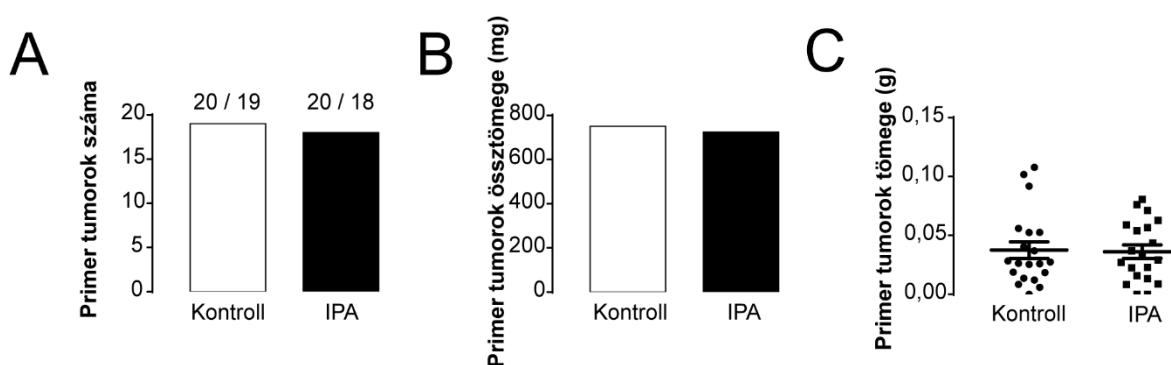
A statisztikai elemzéseket GraphPad Prism 7 programmal végeztük. A normál eloszlás elérése érdekében a normalizált nyers adatokból \log_2 FC (fold change) értéket számoltunk. A statisztikai szignifikanciát két csoport között - kezelt és kontroll csoport - párosítatlan kétszélű Student t-teszttel határoztuk meg. Több csoport összehasonlításához egyutas ANOVA tesztet vagy Khi-négyzet próbát végeztünk. A variancia-analízis során Tukey vagy Dunnett post-hoc teszteket alkalmaztunk. Az eredményeket átlag \pm SEM (mintaközép hibája) formában adtuk meg. Az áramlási citométerrel mért adatokat a Flowing Software 2.5.1 használatával értékeltük.

6. Eredmények

6.1. Antitumor hatású indolpropánsav jellemzése emlőkarcinómákban

6.1.1. Az indolpropánsav szupplementáció csökkenti az emlőrák progresszióját *in vivo*

Munkánk első lépéseként az IPA kezelés emlődaganatok növekedésére kifejtett hatásait tanulmányoztuk 4T1 emlőtumor sejtekkel (200000 sejt/egér) oltott BALB/c egérmodellen. A kísérletben 10 egér sterilizált csapvizet „*per os*” kapott kontrollként, míg a kezelt csoportba véletlenszerűen osztott másik 10 állat IPA kezelést kapott (1 nmol/ttg, *p.o.*). Az IPA kezelés nem volt hatással a primer tumorok kialakulására, mivel a xenograftok számában, s azok össztömegében és egyéni méretében sem tapasztaltunk különbséget a kontroll csoporthoz képest (15A – C ábra).



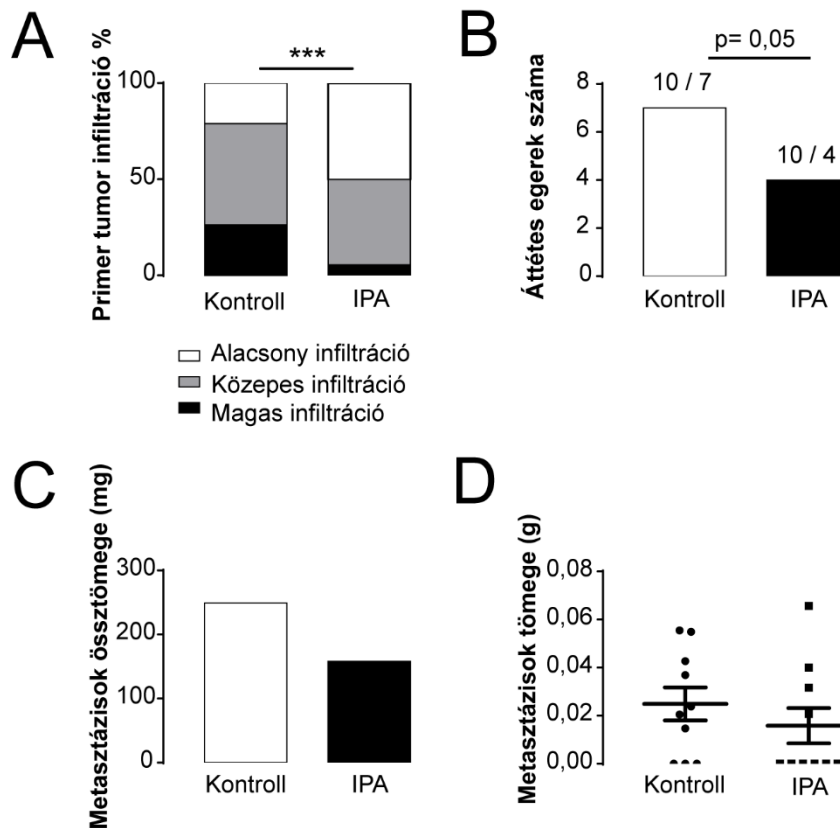
15. ábra 4T1 emlőtumor sejtekkel oltott BALB/c nőstény egerek indolpropánsav kezelése nem befolyásolta a primer tumorok kialakulását és azok tömegét

A xenograft oltás az egerek 14-16 hetes korában (n=10/10) történt, majd 2 héten keresztül, naponta „*per os*” IPA (1 nmol/g) vagy sterilizált csapvíz kezelést kaptak a fentebb ismertetett módon. Az állatok terminálását követően mind az IPA kezelt és kontroll csoportban meghatároztuk (A) a primer tumorok számát, (B) össztömegét és (C) egyedi tömegét. A statisztikai szignifikanciát a kontroll és a kezelt csoport között párosítatlan kétszélű Student t-tesztel határoztuk meg. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg.

Rövidítések: IPA (indolpropánsav)

Ugyanakkor az IPA kezelés szignifikánsan csökkentette a primer tumorok invazivitását és a környező szövetekbe való beszűrődését (16A ábra). Mindemellert az IPA adása egerekben

csökkentette a kialakuló áttétek számát (16B ábra), valamint a metasztázisok teljes tömegét (16C ábra), ugyanakkor az áttétek egyedi tömege nem változott (16D ábra).

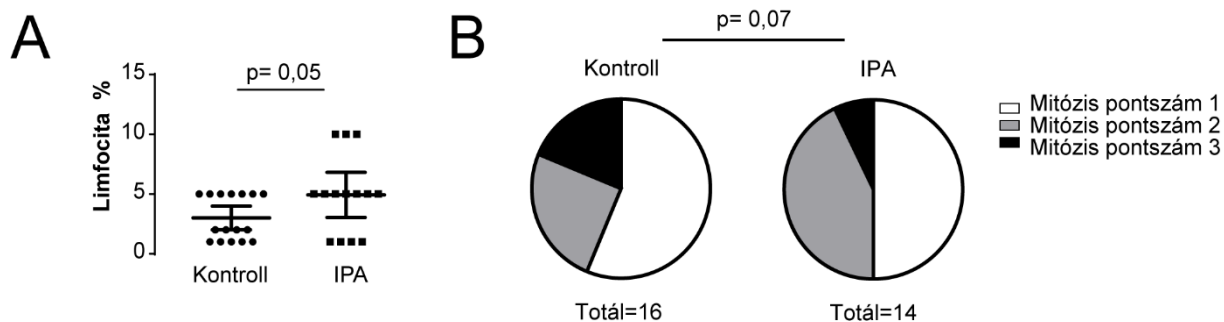


16. ábra Indolpropánsav kezelés csökkentette az emlőtumor környező szövetekbe történő infiltrációját és metasztázisok képződését *in vivo* egérmodellben

4T1 emlőtumor sejteket oltottunk nőstény BALB/c egerekbe (n=10/10), majd naponta szájon át IPA (1 nmol/g) vagy sterilizált csapvíz kezelést kaptak a fentebb leírt módon. A kísérletet az oltástól számított 14. napon az állatok terminálásával zártuk, majd értékeltük az IPA kezelt és kontroll csoportban (A) a primer tumorok infiltrációs kapacitását, (B) a kialakult áttétek számát, (C) az áttétek teljes tömegét és (D) egyedi tömegét. A statisztikai szignifikanciát A és B panelek esetében Khi-négyzet próbával, míg C és D paneleken párosítatlan kétszélű Student t-tesztel határoztuk meg. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. ***= p <0,001

Rövidítések: IPA (indolpropánsav)

A primer daganatok szövettani elemzése során emelkedett limfocita arányt figyeltünk meg (17A ábra), továbbá csökkent az osztódó tumorsejtek aránya az IPA kezelt egerekben (17B ábra).



17. ábra Indolpropánsav kezelés daganatellenes immunválaszt indukált 4T1 emlőtumor sejtekkel oltott BALB/c nőstény egerekben

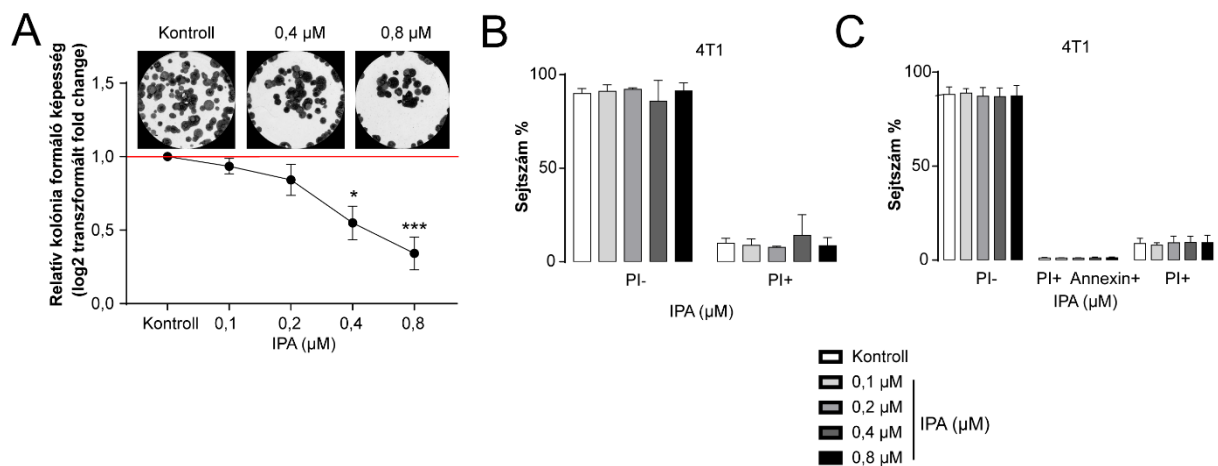
4T1 emlőtumor sejteket oltottunk nőstény BALB/c egerekbe (n=10/10), majd 2 héten keresztül, naponta szájon át IPA (1 nmol/g) vagy sterilizált csapvíz kezelést kaptak a fentebb említett módon. Az állatok terminálását követően formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövettani metszeteken értékelte Dr. Csonka Tamás (A) a tumort infiltráló limfociták arányát és (B) a mitotic score-t, az IPA kezelt és kontroll csoportban. A statisztikai szignifikanciát párosítatlan kétszélű Student t-tesztel (A), valamint Khi-négyszet próbával (B) számoltuk. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg.

Rövidítések: IPA (indolpropánsav)

6.1.2. Az indolpropánsav antineoplasztikus hatásai

6.1.2.1. Az indolpropánsav kezelés gátolja az emlőtumor sejtvonalak proliferációját

Munkacsoportunk által korábban azonosított bakteriális metabolitok, mint például a litokólsav vagy a kadaverin citosztatikus hatásúak emlőtumor sejtvonalakon, ellenben nem toxikusak [19, 20]. *In vitro* kísérleteinkben egér emlőtumor (4T1) és humán emlő adenokarcinóma (SKBR-3) sejtvonalakon vizsgáltuk az IPA sejtproliferációra gyakorolt hatásait. Az alkalmazott IPA koncentrációk megegyeztek a referencia szérum koncentrációjával (0,1-0,8 μ M) [236, 247]. Az IPA kezelés szignifikánsan csökkentette a 4T1 tumorsejtek kolónia képző kapacitását (18A ábra), ugyanakkor sem a propidium-jodid pozitív nekrotikus sejtek aránya (18B ábra), sem az AnnexinV-FITC-propidium-jodid kettős pozitív apoptotikus sejtek hányada nem változott a kezelése során (18C ábra).

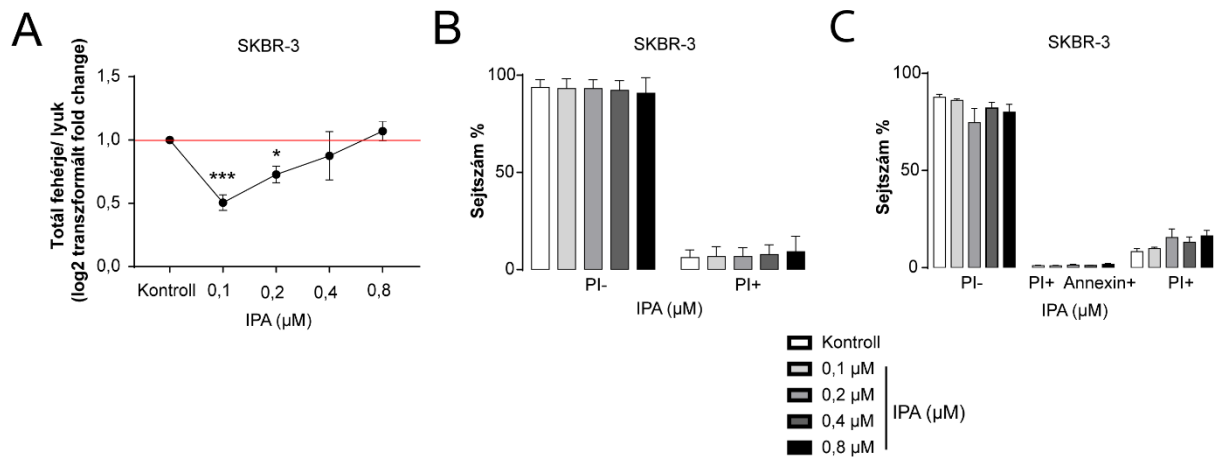


18. ábra Az indolpropánsav kezelés gátolta a 4T1 emlőtumor sejtek kolonizációs képességét

(A) A 4T1 sejteket 7 napon keresztül, a referencia szérum koncentrációnak megfelelő indolpropánsavval kezeltük, majd May-Grünwald-Giemsa oldattal festettük és ImageJ szoftver segítségével megszámoltuk a sejt kolóniákat (n = 3). (B) 4T1 sejteket IPA-val kezeltük a jelölt koncentrációkban 24 órán át, majd propidium-jodid festékekkel jelöltük és áramlási citométerrel detektáltuk a nekrotikus sejteket (n = 3). (C) 4T1 sejtek 24 órás IPA kezelését követően AnnexinV-FITC-propidium-jodid kettős jelöléssel értékeltük a nekrotikus és az apoptotikus sejtek arányát, áramlási citométerrel végzett mérésekben (n = 3). Több csoport összehasonlításához egyutas ANOVA tesztet végeztünk. A variancia-analízis során Dunnett (A) vagy Tukey (B) post-hoc teszteket alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. * = p < 0,05 és *** = p < 0,001

Rövidítések: IPA (indolpropánsav)

Ezen eredményeket megerősítettük humán SKBR-3 emlőtumor sejteken végzett vizsgálatokkal is. Az IPA szérum referencia koncentrációtartományban alkalmazva jelentősen csökkentette az SKBR-3 sejtek proliferációs képességét SRB vizsgálatokban (19A ábra), azonban nem befolyásolta a nekrotikus (19B ábra) vagy apoptotikus sejtpusztulást (19C ábra).

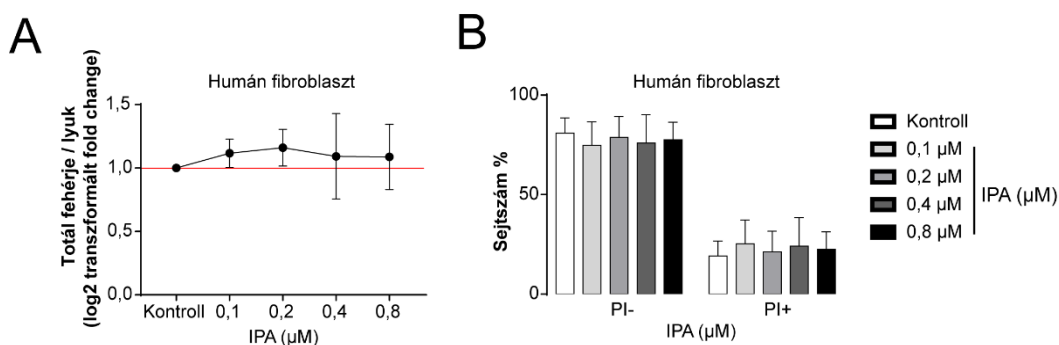


19. ábra SKBR-3 emlő adenokarcinóma sejtek proliferációját csökkentette az indolpropánsav kezelés

(A) Az SKBR-3 sejteket 24 órán keresztül, a referencia szérum koncentrációval megegyező indolpropánsavval kezeltük, majd a teljes fehérjetartalmat SRB teszt segítségével állapítottuk meg (n= 3). (B) SKBR-3 sejteket 24 órás IPA kezelés után propidium-jodiddal festettük, majd áramlási citometriával elemeztük az elpusztult sejtek arányát. (C) SKBR-3 sejteket IPA-val kezeltük a jelölt koncentrációkban 24 órán át, majd AnnexinV-FITC-propidium-jodid kettős festéssel határoztuk meg a nekrotikus és az apoptotikus sejtek arányát áramlási citométerrel (n = 3). Több csoport összehasonlításához egyutas ANOVA tesztet végeztünk. A variancia-analízis során Dunnett (A) vagy Tukey (B-C) post-hoc teszteket alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. *= p <0,05 és ***= p <0,001

Rövidítések: IPA (indolpropánsav)

Végül fontos megemlíteni, hogy a nem-transzformált, humán fibroblaszt sejtek proliferációjára nem volt hatással az IPA kezelés (20A ábra), valamint citotoxicitást sem figyeltünk meg (20B ábra) hasonlóan más citosztatikus metabolitokhoz [19, 20, 273].



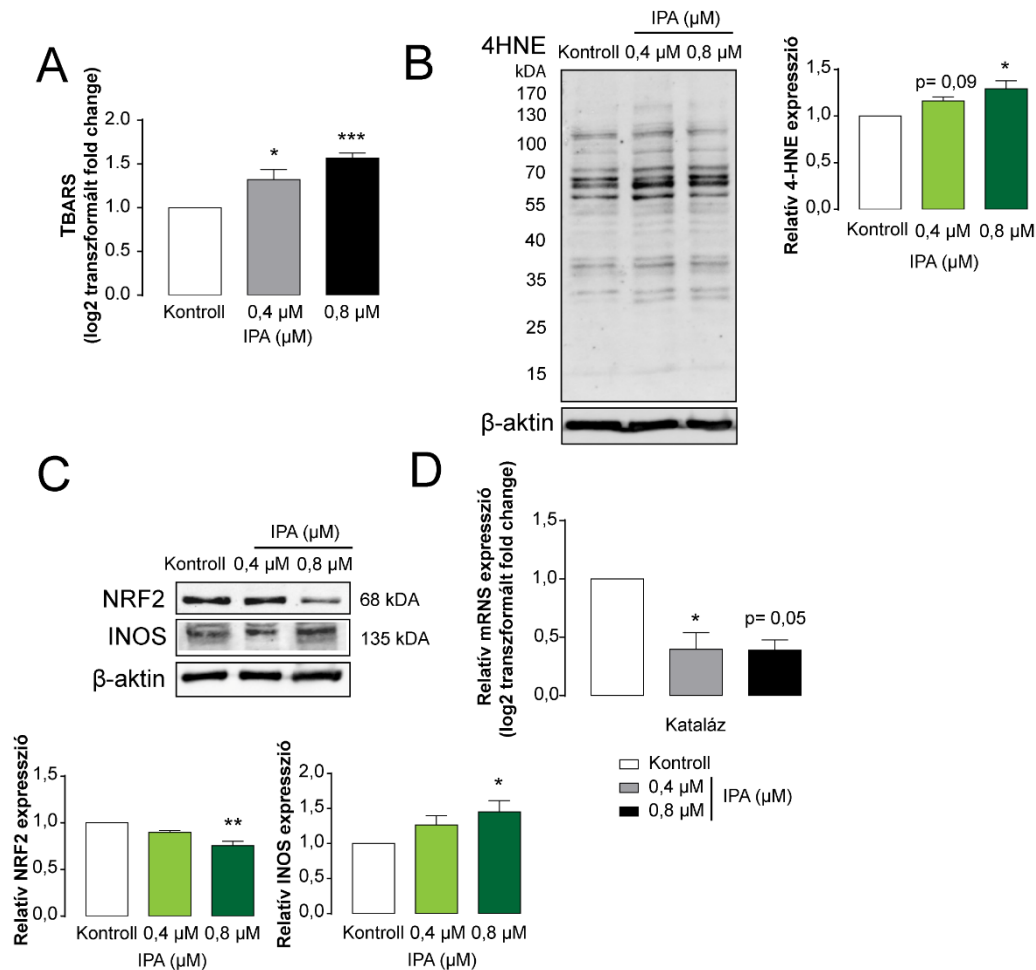
20. ábra Indolpropánsav kezelés nem befolyásolta a nem-transzformált humán fibroblaszt sejtek proliferációját

(A) Humán fibroblaszt sejteket 24 órán keresztül IPA-val kezeltük a jelölt koncentrációkban, majd a teljes fehérjetartalmat SRB vizsgálatokkal határoztuk meg (n= 3). (B) Humán fibroblaszt sejtek 24 órás IPA kezelése után a nekrotikus sejtek hányadát propidium-jodid jelölést követően áramlási citometriával detektáltuk. Több csoport összehasonlításához egyutas ANOVA tesztet végeztünk. A variancia-analízis során Dunnett (A) vagy Tukey (B) post-hoc teszteket alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg.

Rövidítések: IPA (indolpropánsav)

6.1.2.2. Az indolpropánsav kezelés az NRF2 expresszió csökkentésén keresztül oxidatív stresszt indukál

A következőkben arra kerestük a választ, hogy az IPA képes-e modulálni a bakteriális metabolitok által szabályozott, neoplastikus sejtekre jellemző folyamatokat [26]. Bár az oxidatív stressz emlődagyanatos megbetegedésekben betöltött szerepe vitatott, több kutatócsoport rámutatott, hogy az oxidatív stressz fokozódása felelős a citosztázis vagy sejtpusztulás kiváltásáért [138, 274-276]. Különböző oxidatív stressz markereket vizsgáltunk az IPA-val kezelt emlőrákos sejtek redox-állapotának jellemzése céljából. Az IPA kezelés lipidperoxidációt indukált, melyre TBARS (21A ábra) és emelkedett 4HNE képződés utalt (21B ábra). Ezen eredmények alapján az oxidatív stressz válasz fokozódására következtethetünk. Ezzel párhuzamosan csökkent az NRF2 kifejeződése (21C ábra), amely az antioxidáns enzimek, például a CAT (21D ábra) szabályozásában kulcsfontosságú transzkripciós faktor. Mindemellett a nitrozatív stressz kialakításában résztvevő indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) enzim fokozott expresszióját figyeltük meg (21C ábra).

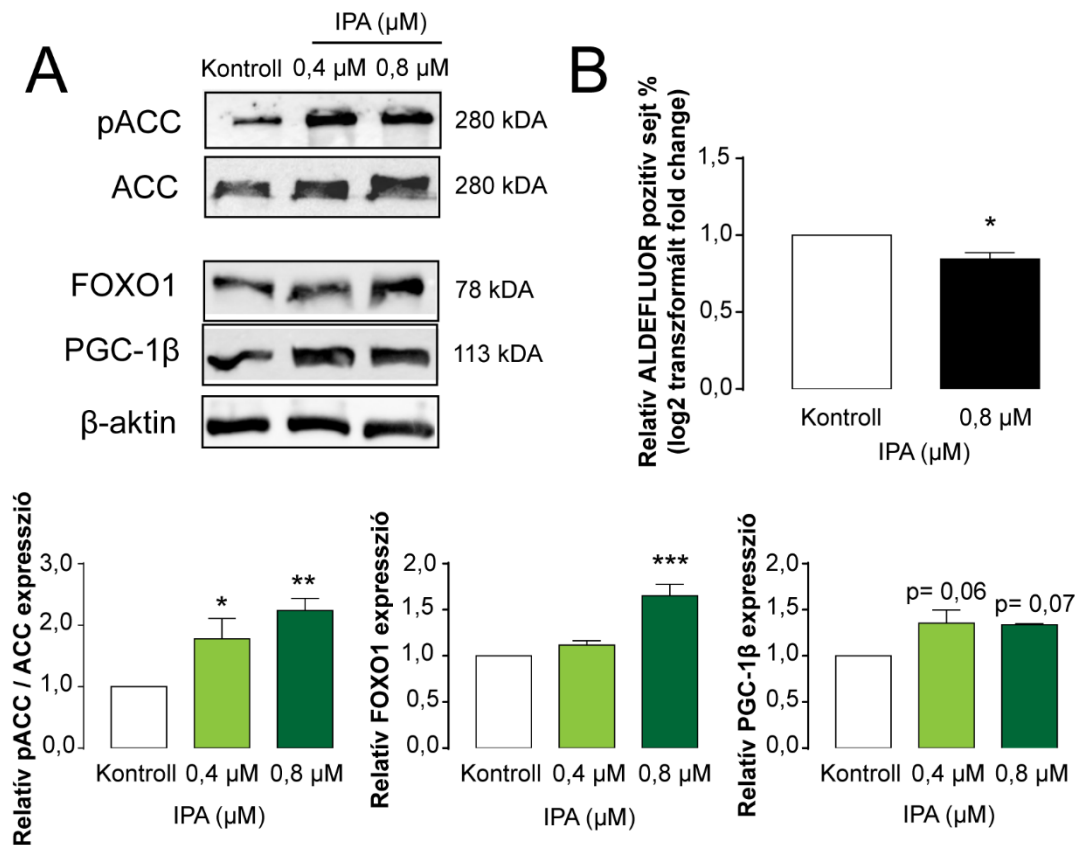


21. ábra Indolpropánsav kezelés oxidatív és nitrozatív stresszt indukált

A 4T1 sejteket IPA-val kezeltük, a jelölt koncentrációkban 24 órán keresztül, majd jellemeztük a lipidperoxidációt (A) TBARS teszt segítségével (n=3), (B) valamint a 4HNE-módosított fehérjék kimutatását Western blot technikával végeztük (reprezentatív ábra, n=3). (C) Ugyanezen sejtekben meghatároztuk az NRF2 és az iNOS fehérjék expresszióját Western blot segítségével (reprezentatív ábra, n=3), (D) míg a kataláz enzim mRNS szintű kifejeződését RT-qPCR reakcióval állapítottuk meg (n=3). A blottok értékelése során a sávok intenzitását Image J szoftverrel határoztuk meg. Több csoport összehasonlításához egyutas ANOVA tesztet végeztünk. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. *= p < 0,05 és ***= p < 0,001

Rövidítések: IPA (indolpropánsav), 4HNE (4-hidroxinonenál), NRF2 (eritroid nukleáris faktor 2), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz)

Végül karakterizáltuk a 4T1 emlőtumor sejteken a fontosabb energetikai stressz markereket (pACC, ACC, FOXO1 és PGC-1β), valamint az ALDH1 pozitivitással jellemezhető tumor-iniciáló őssejtek arányát [277]. Az IPA kezelés hatására emelkedett a tumorsejtek energetikai stressz markereinek kifejeződése (22A ábra), miközben csökkentette az emlőrák őssejtek arányát a kontroll csoporthoz képest (22B ábra).



22. ábra Indolpropánsav kezelés energetikai stresszt indukált, miközben csökkentette az emlőrákos őssejtek arányát

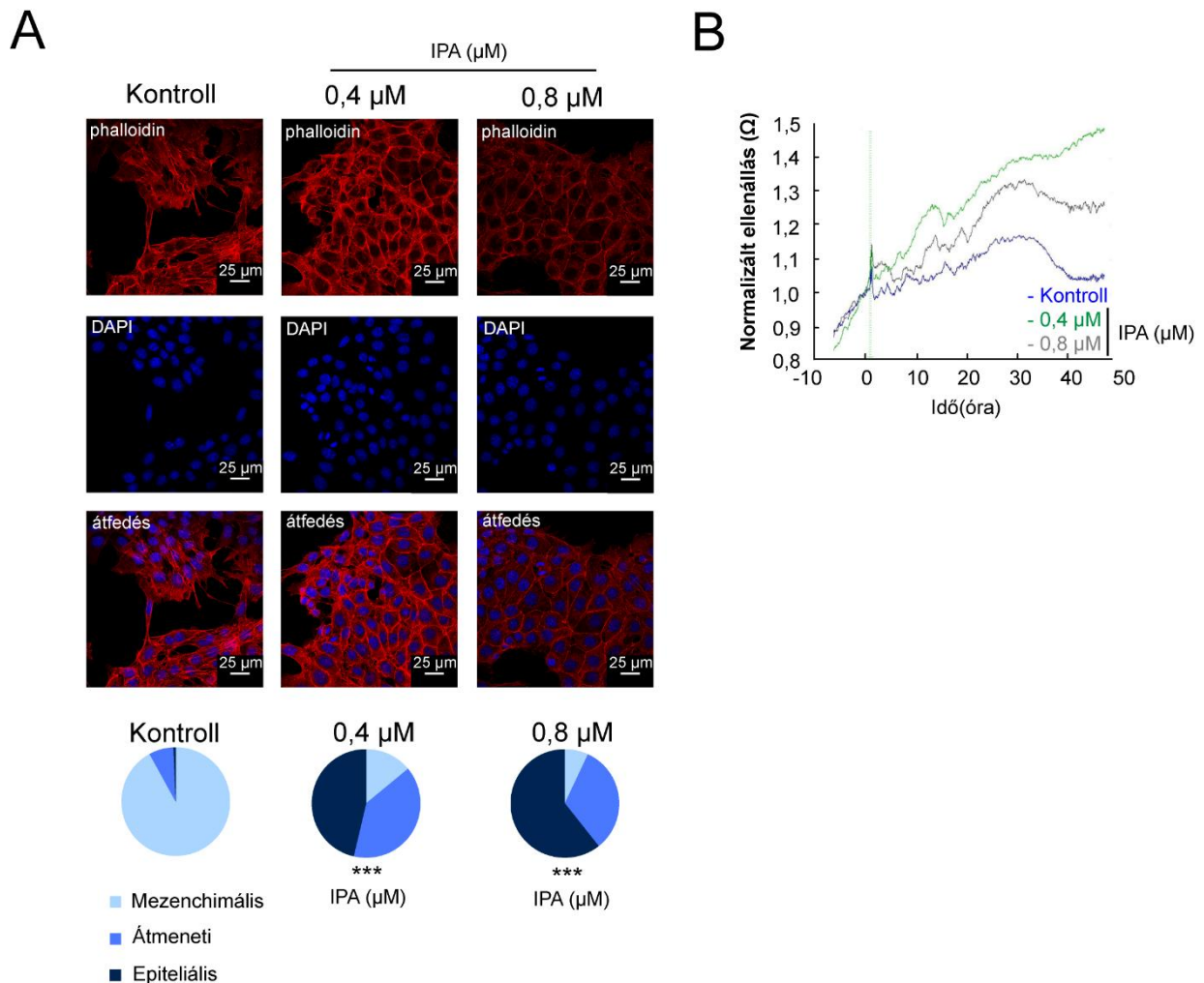
(A) A 4T1 sejtek 24 órás, jelölt koncentrációkban történt IPA kezelését követően, Western blot segítségével karakterizáltuk az energiaszenzor útvonal egyes tagjainak (pACC, ACC, FOXO1 és PGC-1β) kifejeződését (reprezentatív ábra, n=3), (B) továbbá mértük az ALDH1 pozitív sejtek arányát áramlási citométerrel (n=3). A blottok értékelése során a sávok intenzitását Image J szoftverrel határoztuk meg. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel (A), valamint párosítatlan kétszélű Student t-próbával (B) határoztuk meg. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. *= p < 0,05

Rövidítések: IPA (indolpropánsav), ALDH1 (aldehid-dehidrogenáz), ACC (acetyl-Coa-karboxiláz), FOXO1 (forkhead box O1 fehérje), PGC1β (peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma koaktivátor-1β)

6.1.2.3. Indolpropánsav visszafordítja az epitheliális-mezenchimális tranzíció (EMT) folyamatát

További kísérleteinkben 4T1 emlőtumor sejtekben megfigyeltük az IPA kezelés által előidézett morfológiai változásokat, valamint tanulmányoztuk az EMT-ben kulcsfontosságú markerek génexpressziós szintjét.

Az IPA kezelés hatására megváltozott a citoszketalális aktin rendeződése, dózisfüggő módon stimulálta a mezenchimális jellegű sejtek epiteliális jellegűvé alakulását (23A ábra). Az epiteliális morfológiai jegyek megjelenése fokozott MET-re enged következtetést. Impedancia alapú sejtanalizátor rendszerrel végzett vizsgálatokban (ECIS Z Θ) jellemeztük az IPA kezelés sejt-sejt és sejt-felszín kapcsolatokra gyakorolt hatását. A mérések során fokozott ellenállást tapasztunk, ami erősebb sejtkecsolatokra utal a kontroll csoporthoz képest (23B ábra).

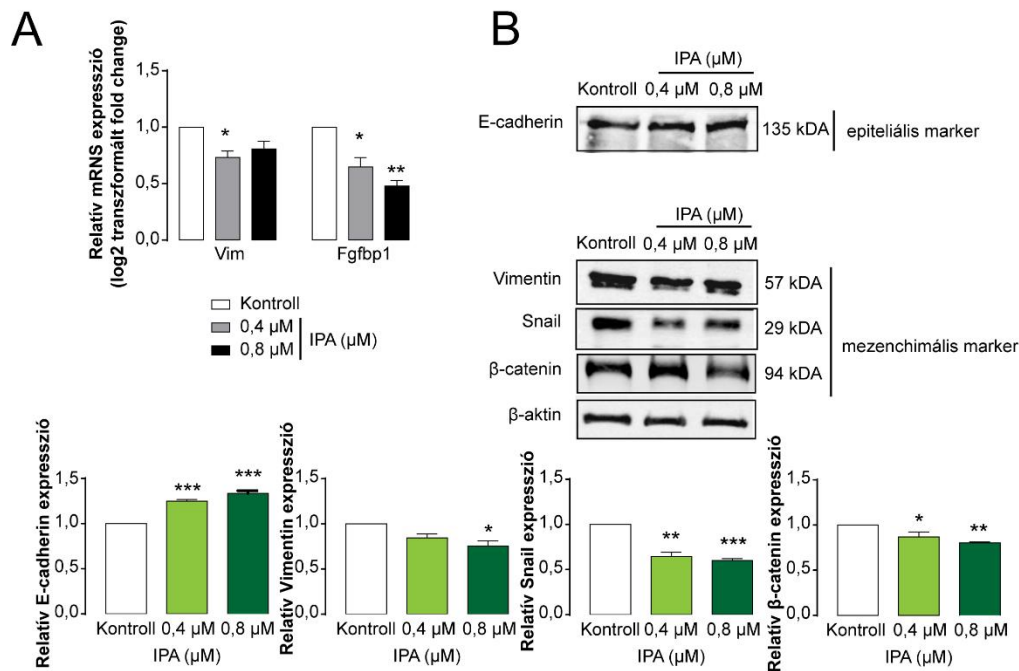


23. ábra. Az indolpropánsav indukálta a mezenchimális-epiteliális tranzíciót (MET)

(A) A 4T1 sejtek 24 órán keresztül, a jelölt koncentrációkban történt IPA kezelése után, TexasRed-X Phalloidin és DAPI festéssel vizsgáltuk az citoszketalális aktin morfológiáját. A méretarány 25 μm -nek felel meg. A mezenchimális morfológiát jellemző hálózatos aktin stressz filamentumok eltűntek az epiteliális jellegű sejtekben (representatív ábra, n = 3). (B) A 4T1 sejtek közötti ellenállást impedancia alapú kísérletekben mértük ECIS Z Θ készülékkel (representatív ábra, átlag \pm SD, n=1). A statisztikai szignifikanciát Khi-négyzet próbával (A) számoltuk. ***= p <0,001

Rövidítések: IPA (indolpropánsav)

Eredményeink megerősítése céljából fehérje- és mRNS szinten is karakterizáltuk a fontosabb epiteliális és mezenchimális markereket. Az IPA kezelés hatására a mezenchimális markerek (vimentin (Vim), fibroblaszt növekedési faktor kötő protein-1 (Fgfbp1), snail család transzkripciós represszor-1 (Snai1) és β -catenin) expressziója jelentősen csökkent (24A ábra), míg az epitél sejtekre specifikus E-cadherin emelkedett expresszióját detektáltuk Western blot kísérletekben (24B ábra).



24. ábra. Az indolpropánsav mezenchimális-epiteliális tranzíciót (MET) indukált mRNS- és fehérje szinten

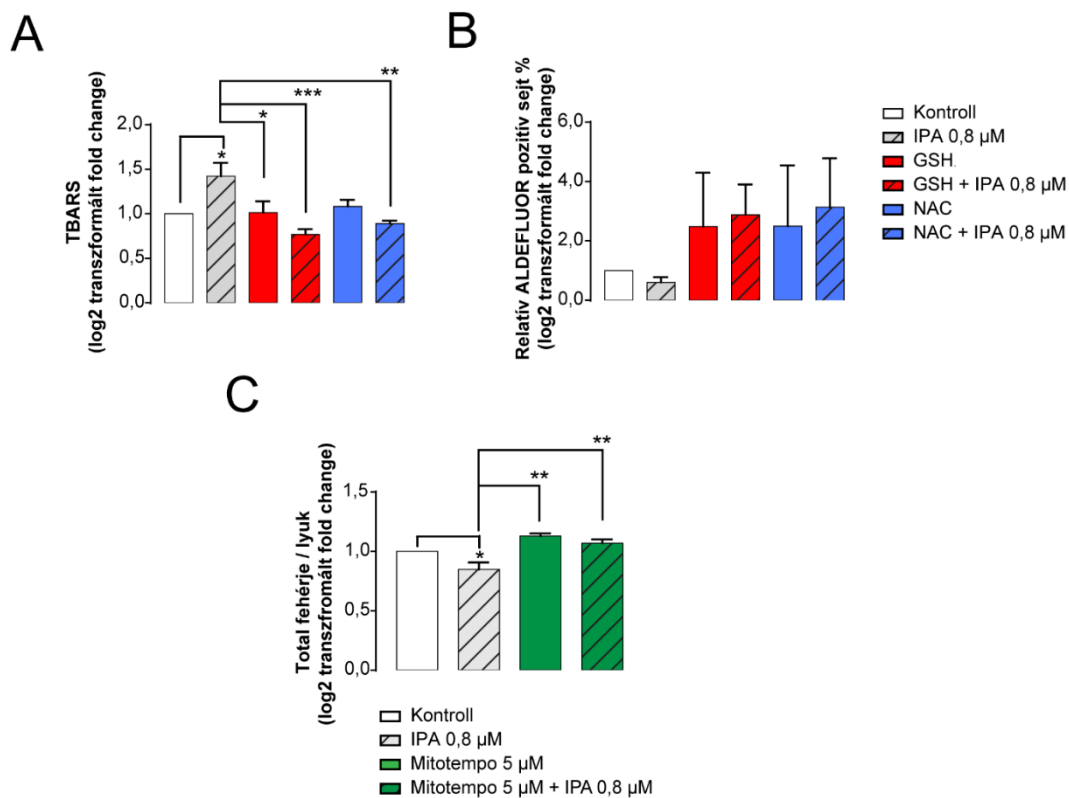
(A) Az IPA kezelt 4T1 sejtekben, RT-qPCR reakcióval meghatároztuk a mezenchimális sejtekre specifikus, jelölt gének mRNS expresszióját (n=3), (B) illetve Western blot technikával vizsgáltuk az epiteliális és mezenchimális sejt morfológiára jellemző markerek fehérje szintű kifejeződését (reprezentatív ábra, n=3). A blottok értékelése során a sávok intenzitását Image J szoftverrel határoztuk meg. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. *= p < 0,05 és **= p < 0,01

Rövidítések: IPA (indolpropánsav), Vim (vimentin), Fgfbp1 (fibroblaszt növekedési faktor kötő protein 1)

6.1.3. Az indolpropánsav-mediálta citosztikus és antineoplasztikus hatásokat reaktív intermedierek termelése okozza

Az EMT-t, valamint a rákos őssejtek jellegzetességeit reaktív intermedierek modulálják [278, 279]. Az IPA kezelés indukálta oxidatív stressz hozzájárulhat egyes daganatellenes hatások kiváltásához, mely oxidatív stressz-vezérelt szabályozásra utal. Annak

megértése érdekében, hogy az emlőrák sejtekre kifejtett IPA-vezérelt citosztatikus hatások oxidatív stressz kontroll alatt állnak-e, vizsgáltuk tiol-reduktáns GSH és NAC, valamint a mitokondriumokban halmozódó antioxidáns, MitoTEMPO jelenlétében az IPA-mediálta antitumor hatásokat. Hipotézisünknek megfelelően az általános tiol-reduktánsok (GSH és NAC) alkalmazása csökkentette a TBARS képződését (25A ábra), mely az IPA-indukált oxidatív hatás gátlására utal. Továbbá az IPA által kiváltott ALDH1-pozitív rákos őssejt arány csökkenést sem tapasztaltuk GSH és NAC antioxidáns kezelések mellett (25B ábra). Mindemellett a MitoTEMPO blokkolta az IPA-vezérelt citosztázist (25C ábra). Az eredmények alapján arra következtethetünk, hogy az IPA kezelés által kiváltott reaktív intermedierek termelése kulcsfontosságú az IPA-közvetített daganatellenes hatások kialakításában.



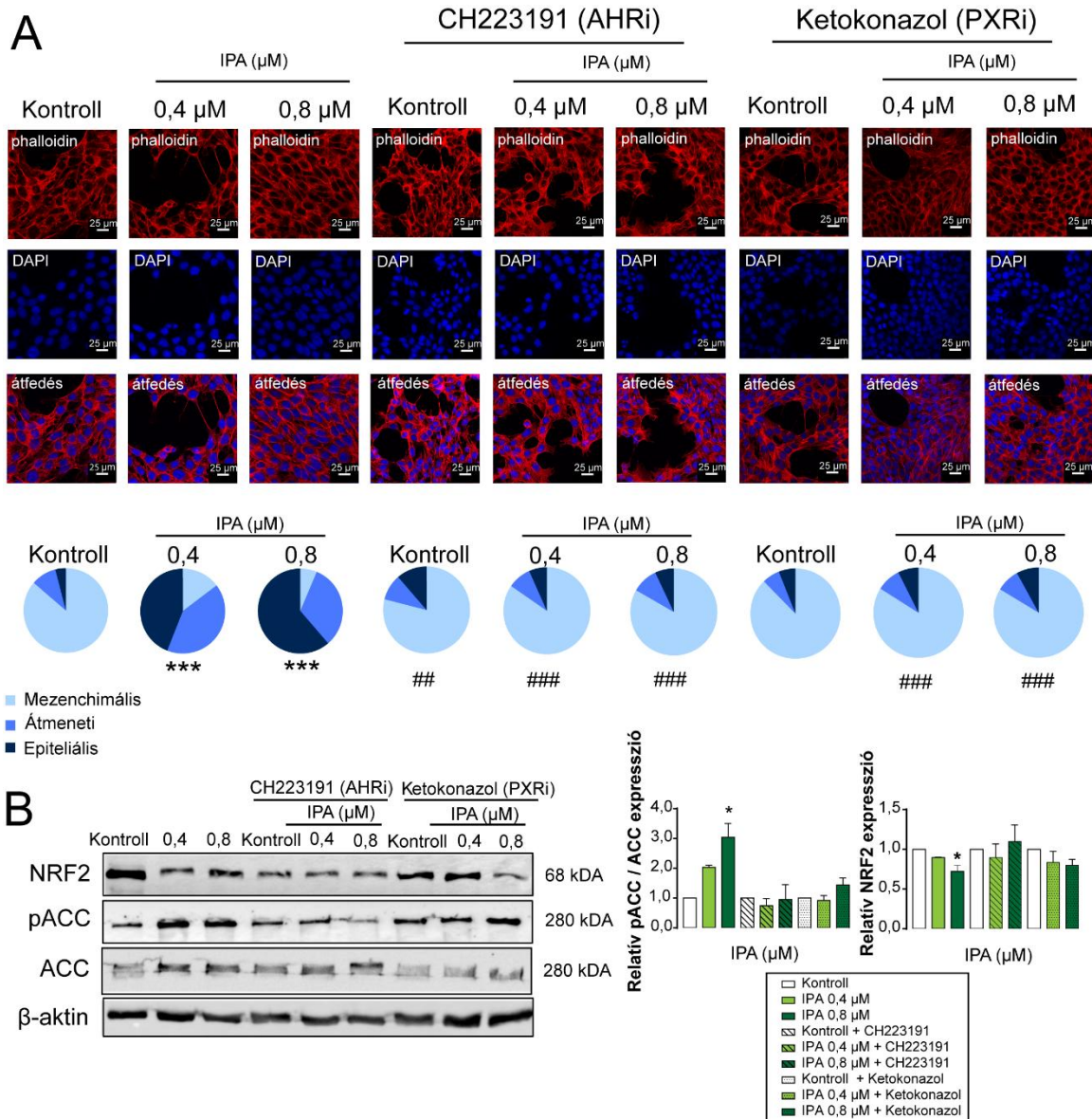
25. ábra. Az indolpropánsav által kiváltott oxidatív stressz központi szerepet játszik az IPA-vezérelt daganatellenes hatások kialakításában

A 4T1 sejteket 24 órán keresztül, a feltüntetett koncentrációkban IPA-val és/vagy antioxidánsokkal kezeltük a jelöléseknek megfelelően. Ezt követően meghatároztuk a (A) tiobarbitursav-reaktív termékek mennyiségét (n=3), (B) az ALDH1 pozitív sejtek arányát (n=3), valamint (C) a teljes fehérjetartalmat SRB teszt segítségével (n=3). A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. *= p < 0,05, **= p < 0,01 és ***= p < 0,001

Rövidítések: IPA (indolpropánsav), ALDH1 (aldehyd-dehidrogenáz), GSH (redukált glutation), NAC (N-acetil-cisztein)

6.1.4. Az indolpropánsav hatásait Aril-Hidrokarbon Receptor (AHR) és Pregnán X-Receptor (PXR) közvetíti

Az IPA receptorok közül a PXR és az AHR receptorokon keresztül kifejtett hatásokat vizsgáltam részletesen az értekezésben. Kísérleteink során az AHR (CH223191) és a PXR (ketokonazol) farmakológiai inhibitorait használtuk annak megerősítésére [280], hogy az említett receptorok részt vesznek az IPA-indukálta hatások közvetítésében. Az AHR és a PXR blokkolása több IPA által előidézett változást kioltott, többek között gátolta az emlőrák sejtek mezenchimális-epiteliális átalakulását (26A ábra), valamint az ACC foszforilációján keresztül végbemenő AMPK aktivációt és az NRF2 expresszió csökkenését sem figyeltük meg (26B ábra).



26. ábra Az AHR és a PXR közvetíti az IPA által kiváltott daganatellenes hatásokat

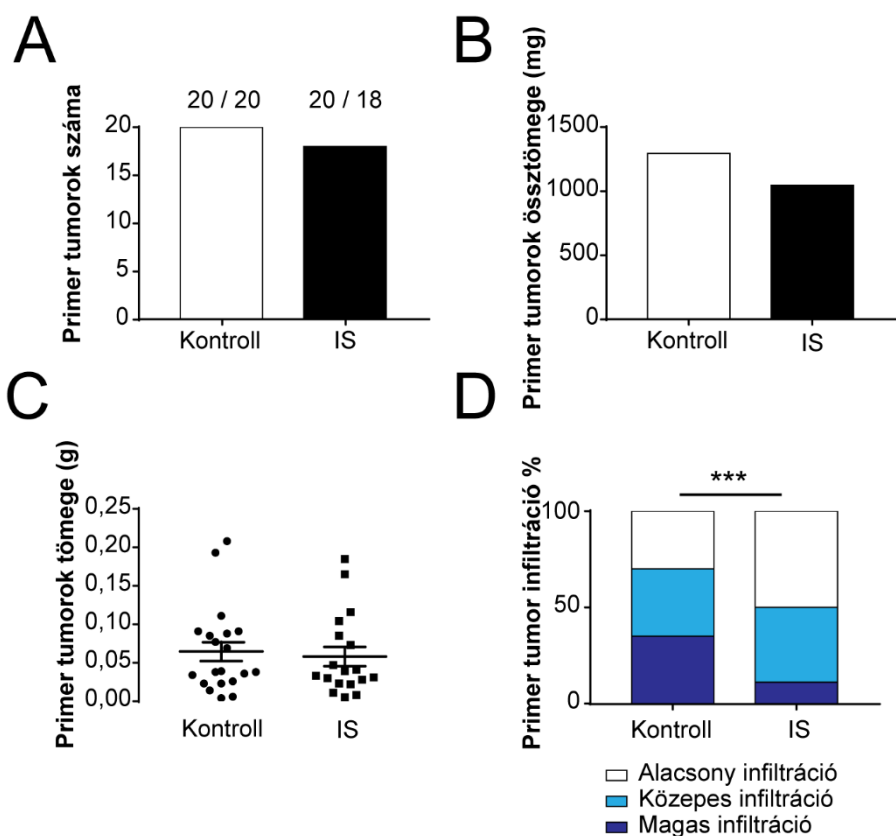
A 4T1 sejteket 24 órán keresztül, a jelölt koncentrációban kezeltük IPA-val és farmakológiai inhibitorokkal vagy anélkül, a jelöléseknek megfelelően. (A) Ezt követően az aktin hálózat morfológiáját TexasRed-X Phalloidin és DAPI festéssel vizualizáltuk és konfokális mikroszkóppal értékeltük (n=3). A méretarány 25 μm-nek felel meg. (B) Ugyanezen sejtekben, a jelzett fehérjék expresszióját Western blot segítségével határoztuk meg (reprezentatív ábra, n=3). A blottok értékelése során a sávok intenzitását Image J szoftverrel állapítottuk meg. A statisztikai szignifikanciát Khi-négyszet próbával (A), valamint egyutas ANOVA-teszt alkalmazásával határoztuk meg, melyet Dunnett post-hoc teszt (B) követett. Az ábrán *** (p < 0,001) jelöli a statisztikailag szignifikáns eltéréseket a kontroll és az IPA kezelt csoportok között. Míg a ## (p < 0,01) és a ### (p < 0,001) szignifikáns különbséget mutat a kontroll és a CH223191 vagy ketokonazzal kezelt csoportok között.

Rövidítések: IPA (indolpropánsav), ACC (acetyl-Coa-karboxiláz), NRF2 (eritroid nukleáris faktor 2), PXRi (Pregnán X-Receptor inhibitor), AHRi (Aril-Hidrokarbon Receptor inhibitor)

6.2. Citosztatikus tulajdonságú indoxil szulfát karakterizálása emlődaganatokban

6.2.1. Az indoxil szulfát kezelés csökkenti az emlőrák agresszivitását egérmodellben

Munkám során az IS *in vivo* citosztatikus hatásait 4T1 emlőrák sejtekkel oltott nőstény BALB/c egérmodellen vizsgáltam. Az egerek fele (10 állat) szájon át IS kezelést kapott 2 nmol/ttg dózisban, míg a kontroll kísérleti állatoknak (10 állat) sterilizált csapvizet adtunk. Az IS dózis 4 μ M szérumkoncentrációnak felel meg, összhangban a humán IS szérum referencia tartománnyal [249, 250, 263]. Az IS kezelés nem befolyásolta a primer tumorok számát és méretét (27A – C ábra), ellenben jelentősen csökkentette környező szövetekbe való infiltrációját a kontroll egerekhez képest (27D ábra).

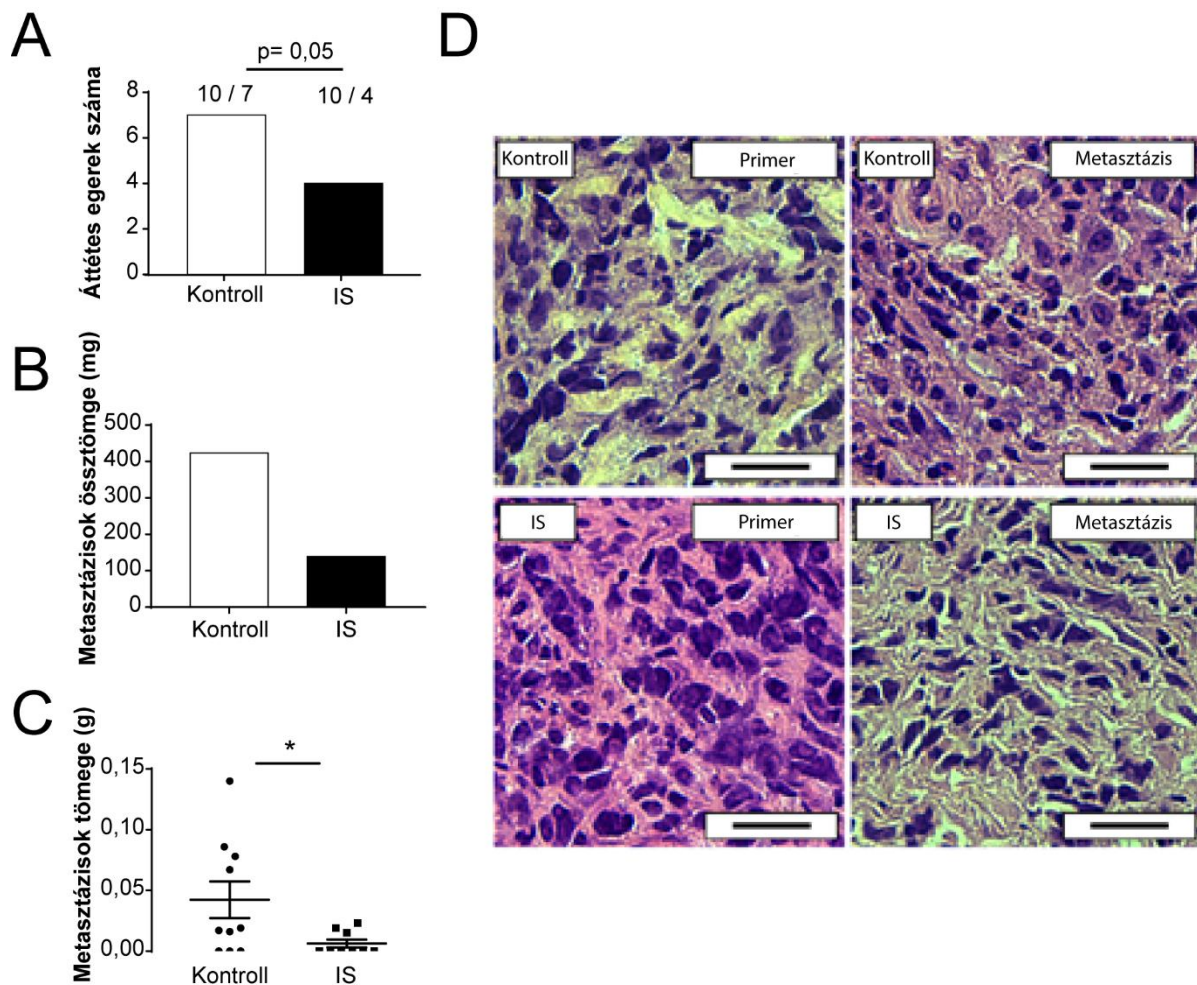


27. ábra Az indoxil szulfát kezelés nem befolyásolta a primer tumorok kialakulását és méretét *in vivo* egérmodellben

4T1 emlőtumor sejteket oltottunk nőstény BALB/c egerekbe (n=10/10), majd 2 hétig, naponta szájon át IS kezelést (2 nmol/ttg) vagy sterilizált csapvizet kaptak a fentebb leírtaknak megfelelően. A kísérletet az oltástól számított 14. napon az állatok terminálásával zártuk, majd mind az IS kezelt és kontroll csoportban meghatároztuk (A) a primer tumorok számát, (B) össztömegét és (C) egyedi tömegét. (D) Továbbá értékeltük a primer tumor környező szövetekbe való beszűrődését. A statisztikai szignifikanciát a kontroll és a kezelt csoport között a párosítatlan kétszélű Student t-tesztel (A-C), illetve Khi-négyzet próbával (D) számoltuk ki. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. *** = $p < 0,001$

Rövidítések: IS (indoxil szulfát)

Mind az áttétek számában (28A ábra), össztömegében (28B ábra) mind pedig a metasztázisok egyedi tömegében (28C ábra) szignifikáns csökkenést figyeltünk meg az IS kezelés során. Ugyanakkor a primer daganatok és metasztázisok szövettani megjelenésében nem tapasztaltunk különbséget (28D ábra).



28. ábra Az indoxil szulfát kezelés csökkentette a metastázisok kialakulását 4T1 emlőtumor sejtekkel graftolt BALB/c egerekben

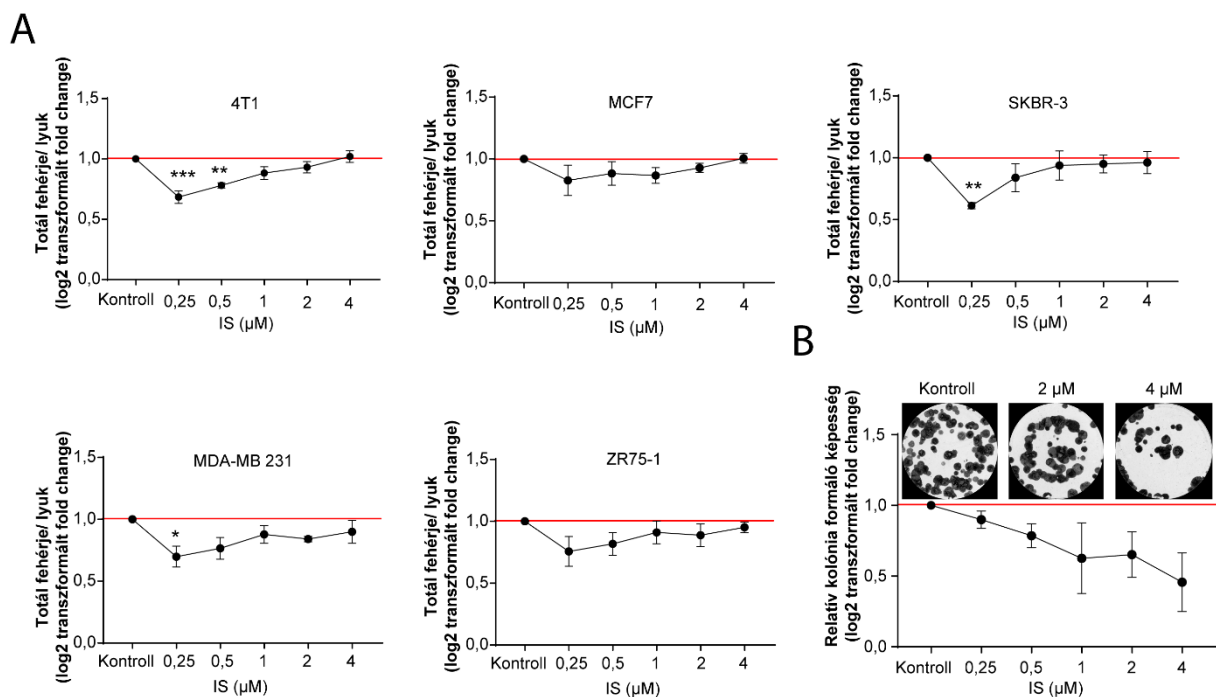
A xenograft oltást az állatok 14-16 hetes korában (n=10/10) végeztük, majd 2 héten keresztül naponta orális IS (2 nmol/ttg) vagy sterilizált csapvíz kezelést kaptak a fentebb említett módon. Az állatok terminálását követően, meghatároztuk (A) az áttétek számát, (B) azok teljes és (C) egyedi tömegét. (D) Formalinban fixált, paraffinba ágyazott metszeteket hematoxilin-eozinnal festette kollaborációs partnerünk, majd az ábrán a jellegzetes szövettani megjelenést reprezentáló mikroszkópos felvételeket mutatjuk. A méretarány 40 μm -nek felel meg. A statisztikai szignifikanciát a kontroll és a kezelt csoport között a párosítatlan kétszélű Student t-tesztel határoztuk meg. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. * = $p < 0,05$

Rövidítések: IS (indoxil szulfát)

6.2.2. Az indoxil szulfát antineoplasztikus hatásai

6.2.2.1. Az indoxil szulfát kezelés csökkenti az emlődaganat sejtek proliferációját

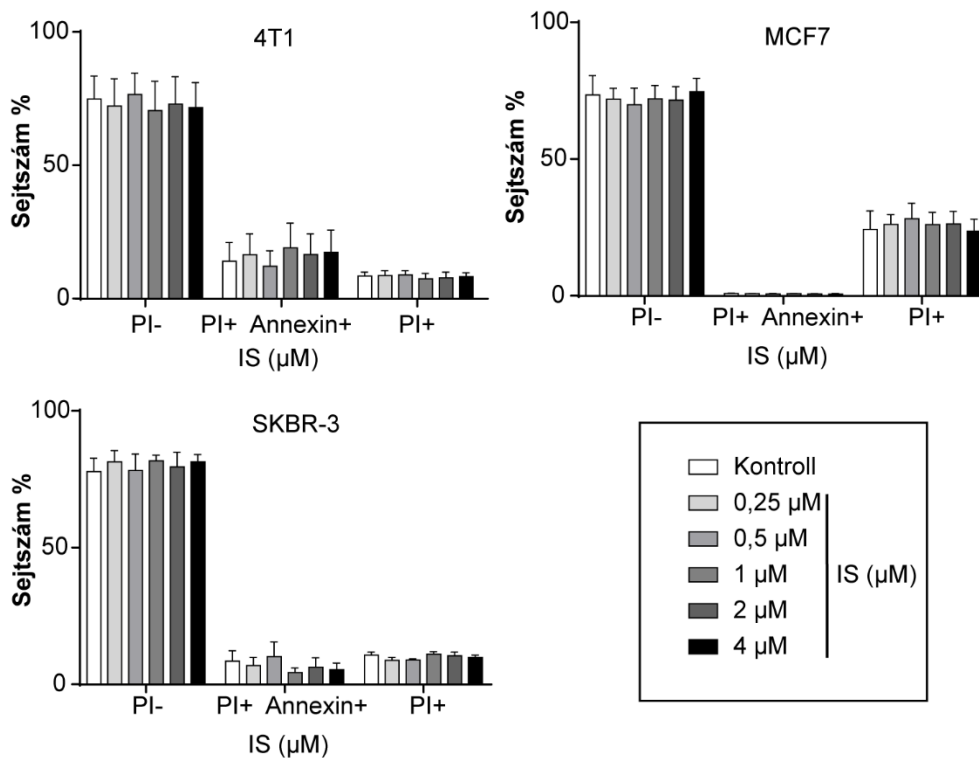
Az IS, hasonlóan más citosztatikus metabolitokhoz több emlőkarcinóma sejtvonal proliferációs képességét (4T1, MCF7, SKBR-3, MDA-MB-231, ZR75-1) gátolta SRB vizsgálatokban [19, 20, 138], a humán referencia szérumkoncentrációnak megfelelő (0,25-4 μM) koncentrációtartományban (29A ábra). Az antiproliferatív hatásokat a 4T1 sejtek kolónia formáló kapacitásának mérésével is megerősítettük (29B ábra).



29. ábra Az indoxil szulfát kezelés gátolta az emlőtumor sejtek proliferációs és kolónia formáló képességét (A) Emlődaganatos sejtvonalakat (4T1, MCF7, SKBR-3, MDA-MB-231, ZR75-1) 24 órán keresztül, a referencia szérum koncentrációval megegyező IS-sel kezeltük, majd meghatároztuk a teljes fehérjetartalmat szulforodamin B teszt alkalmazásával (n= 3). (B) 4T1 sejteket 7 napig, a jelölt koncentrációkban IS-sel kezeltük, majd May-Grünwald-Giemsa oldattal jelöltük és ImageJ programmal meghatároztuk a kolóniák számát (n = 3). A statisztikai szignifikancia meghatározásához egyutas ANOVA tesztet végeztünk. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. *= p <0,05, **= p <0,01 és ***= p <0,001

Rövidítések: IS (indoxil szulfát)

Ugyanakkor az apoptotikus és nekrotikus sejtek aránya nem változott egér emlőtumor (4T1) és humán adenokarcinóma (MCF7 és SKBR-3) sejtek AnnexinV-FITC-propidium-jodid kettős festését követően, a kezelések során (30. ábra).

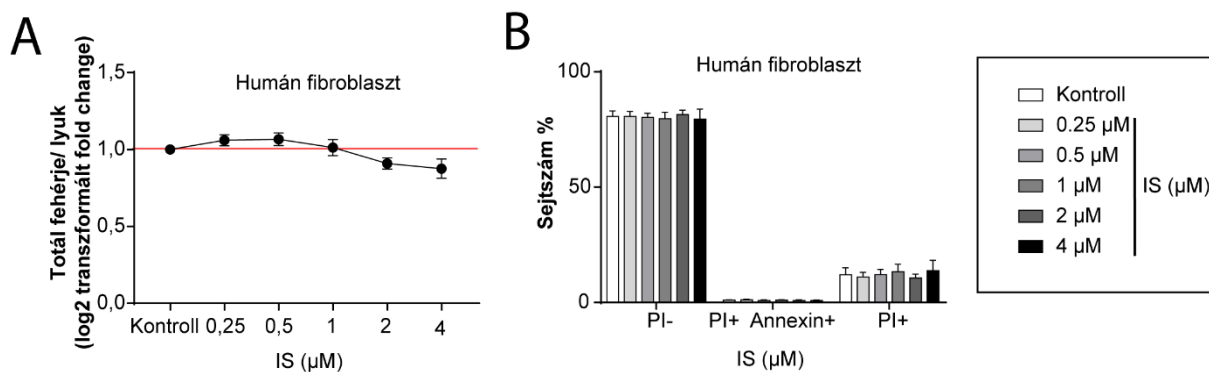


30. ábra Az indoxil szulfát mediálta proliferációs változások háttérében nem apoptotikus sejtpusztulás áll

Az emlőtumor sejteket (4T1, MCF7 és SKBR-3) 24 órás, jelölt koncentrációkban történt IS kezelését követően, AnnexinV-FITC-propidium-jodid kettős festéssel jelöltük, majd áramlási citométerrel mértük az apoptotikus és nekrotikus sejtek arányát (n = 3). A statisztikai szignifikancia meghatározásához egyutas ANOVA tesztet végeztünk, melyet Tukey post-hoc teszt követett. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg.

Rövidítések: IS (indoxil szulfát)

Továbbá az IS kezelés nem befolyásolta a nem-transzformált, humán bőr eredetű primer fibroblasztok proliferációját (31A ábra) és az apoptotikus sejthalált sem (31B ábra).

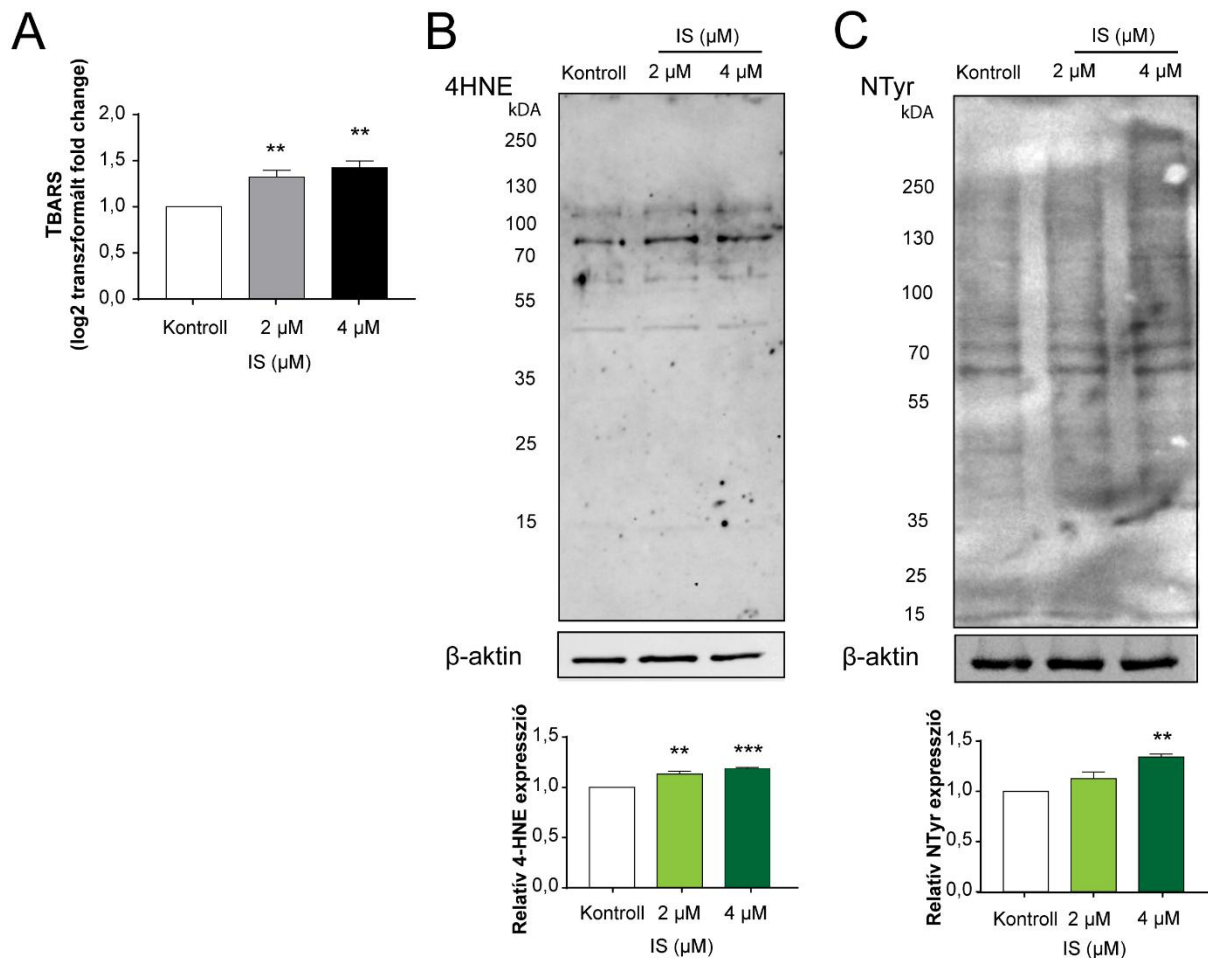


31. ábra Az indoxil szulfát kezelés nem volt hatással a nem-transzformált humán fibroblaszt sejtekre (A) Humán primer fibroblaszt sejteket 24 órán át IS-sel kezeltük a megadott koncentrációkban, majd SRB teszttel megállapítottuk a teljes fehérjetartalmat ($n = 3$). (B) Ugyanezen sejteken, az apoptotikus és nekrotikus sejtek hányadát AnnexinV-FITC-propidium-jodid kettős jelölést követően áramlási citometriával detektáltuk ($n = 3$). A statisztikai szignifikancia meghatározásához egyutas ANOVA tesztet végeztünk. A variancia-analízis során Dunnett (A) vagy Tukey (B) post-hoc teszteket alkalmaztunk. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg.

Rövidítések: IS (indoxil szulfát)

6.2.3.2. Az indoxil szulfát-mediált oxidatív és nitrozatív stressz

Korábbi tanulmányokban már számos bakteriális metabolit citosztatikus hatásáról beszámoltak daganatos megbetegedésekben [19, 20, 25, 281]. Munkánk során célunk volt, hogy az IS kezelések daganatellenes funkciójáról minél teljesebb képet kapjunk. Kísérleteinkben elsőként a tumor progresszió szabályozásában kulcsfontosságú oxidatív-nitrozatív stressz markereket karakterizáltuk [136, 274]. Mind a TBARS mennyisége (32A ábra), mind a 4HNE kifejeződése (32B ábra) szignifikáns emelkedést mutatott a 4T1 tumorsejtek IS kezelését követően, melyek a lipid oxidatív károsodás fontos markerei. Ezután a fehérje károsodást és a nitrozatív stresszt jellemző nitrotirozin (NTyr) expressziós profilját vizsgáltuk [276], amely során a NTyr kifejeződése IS kezelés mellett indukálódott (32C ábra). Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy az IPA-hoz hasonlóan az IS kezelés is serkenti a reaktív intermedierek termelését, mely lipid- és fehérje peroxidációt előidézve erős károsodást okozhat a rákos sejtekben.

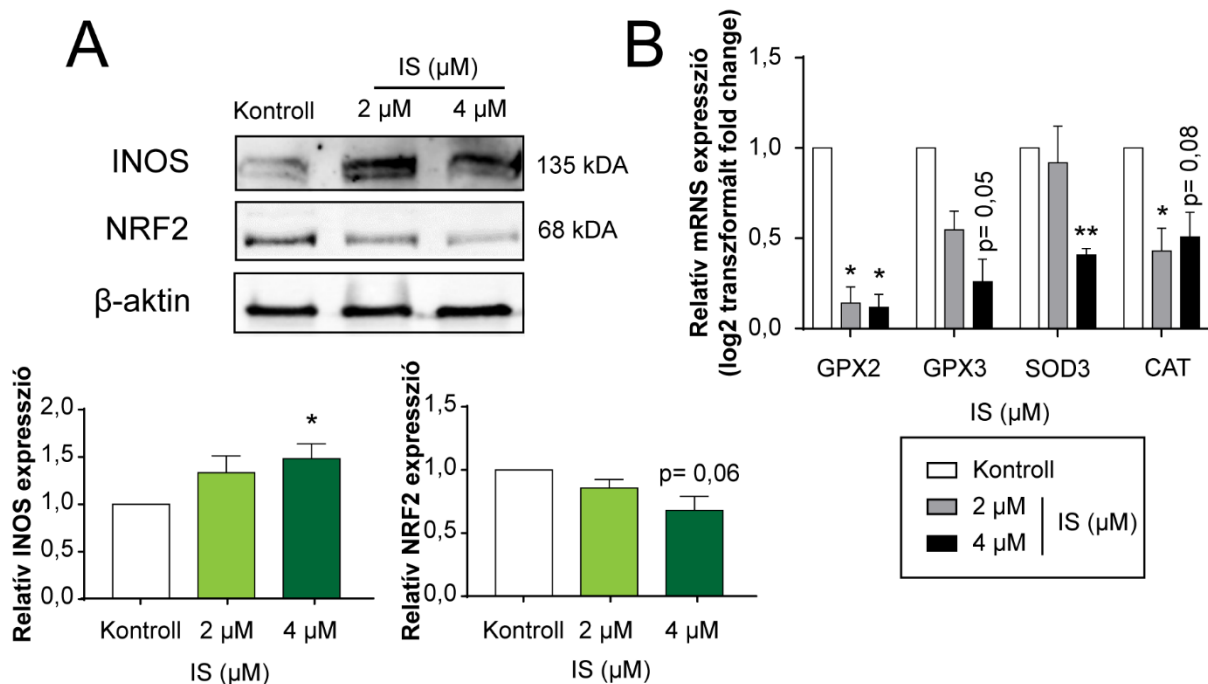


32. ábra Az indoxil szulfát kezelés oxidatív és nitrozatív stresszt idézett elő

A 4T1 sejteket IS-sel a megadott koncentrációkban 24 órán keresztül kezeltük, majd (A) TBARS teszt alkalmazásával vizsgáltuk a lipidperoxidációt (n=3), illetve (B) meghatároztuk a 4HNE és (C) NTyr kifejeződését Western blot segítségével (reprezentatív ábra, n=3). A blottok értékelése során a sávok intenzitását Image J szoftverrel határoztuk meg. A statisztikai szignifikancia meghatározásához egyutas ANOVA tesztet végeztünk, melyet Dunnett post-hoc teszt követett. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. **= p <0,01 és ***= p <0,001

Rövidítések: IS (indoxil szulfát), 4HNE (4-hidroxinonenál), NTyr (nitrotirozin)

Ezek a változások korreláltak az iNOS megnövekedett és az NRF2 csökkent expressziójával (33A ábra). Az NRF2 alulszabályozásából adódóan az antioxidáns rendszer kulcsfontosságú enzimeit, többek között a GPX2 és GPX3, a szuperoxid-diszmutáz 3 (SOD3) és a CAT expressziója csökken (33B ábra).



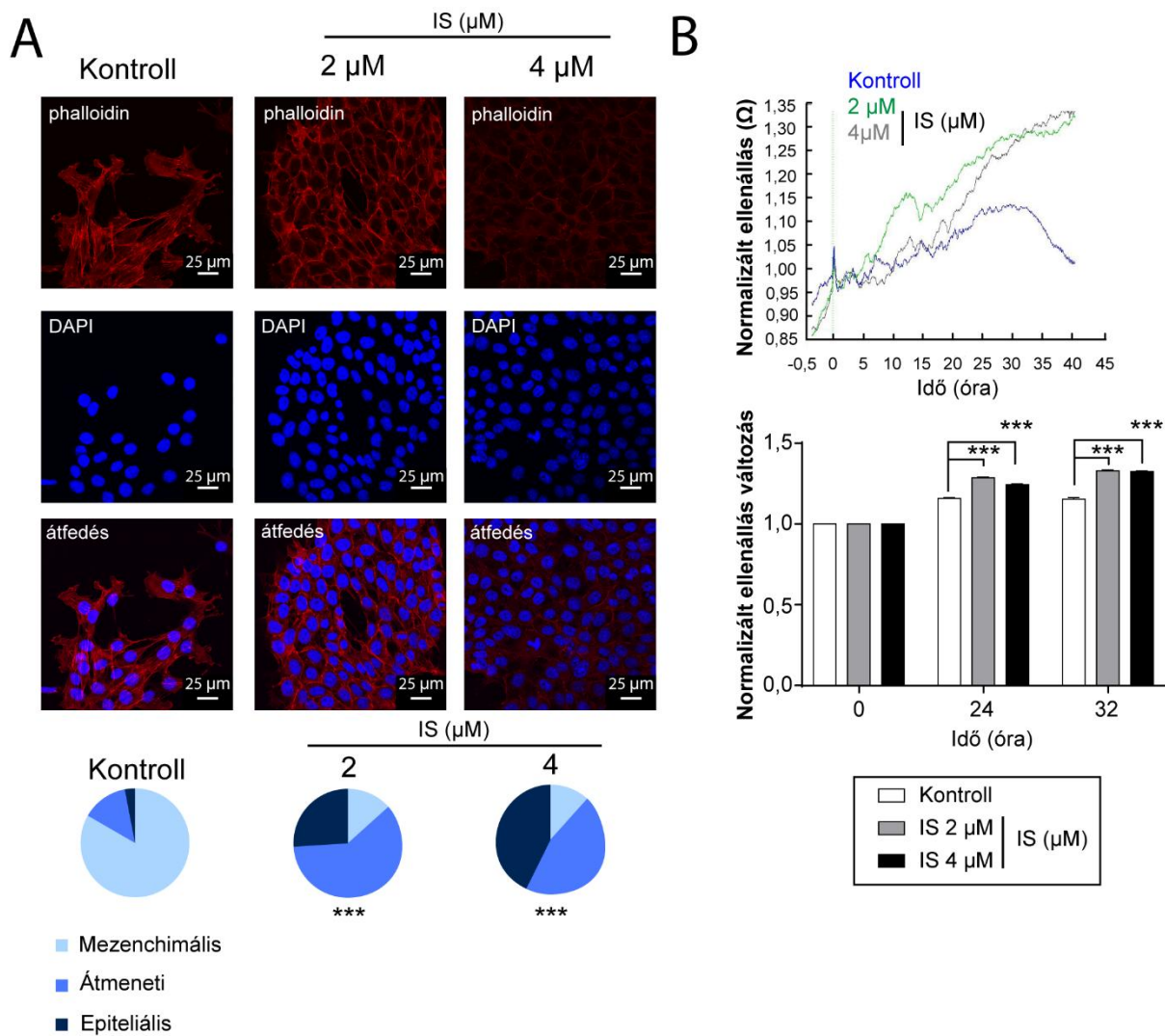
33. ábra Az indoxil szulfát kezelés oxidatív és nitrozatív stresszt indukál

A 4T1 sejteket 24 órán át IS-sel kezeltük a jelölt koncentrációkban, majd (A) jellemeztük az NRF2 és az iNOS fehérje szintű expresszióját Western blot technikával (reprezentatív ábra, n=3), (B) míg az alábbi antioxidáns enzimek (GPX2, GPX3, SOD3, CAT) expressziós profilját RT-qPCR reakcióval értékeltük (n=3). A Western blottok értékelése során a sávok intenzitását Image J szoftverrel határoztuk meg. A statisztikai szignifikancia meghatározásához egyutas ANOVA tesztet végeztünk, melyet Dunnett post-hoc teszt követett. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. *= p < 0,05 és **= p < 0,01

Rövidítések: IS (indoxil szulfát), NRF2 (eritroid nukleáris faktor 2), iNOS (indukálható nitrogén-monoxid szintáz), GPX2 és GPX3 (glutation-peroxidáz 2 és 3), SOD3 (szuperoxid-diszmutáz 3), CAT (kataláz)

6.2.2.2. Az indoxil szulfát hatása az epiteliális-mezenchimális tranzíció (EMT) folyamatára

Kísérleteink következő lépéseként tanulmányoztuk a neoplasztikus folyamatokra jellemző, tumorsejtek vándorlását és invázióját elősegítő EMT-t. Az IS kezelés dóziszfüggően visszafordította az EMT folyamatát, mely során eltűntek a mezenchimális fenotípusú 4T1 sejteket jellemző hálózatos aktin stressz filamentumok (34A ábra). Ezzel összhangban impedancia alapú sejtadhéziós vizsgálatokban megnövekedett rezisztenciát mértünk ECIS Z θ készülékkel, mely szorosabban kapcsolódó sejtek jelenlétére utal (34B ábra).



34. ábra Az indoxil szulfát visszafordította az epitheliális-mezenchimális tranzíciót (EMT)

(A) A 4T1 sejteket IS-sel kezeltük 24 órán keresztül, a megadott koncentrációkban, majd a citoszkeletális aktin morfológiáját TexasRed-X Phalloidin és DAPI festéssel vizualizáltuk. A méretarány 25 μm -nek felel meg. A mezenchimális morfológiájú 4T1 sejteket jellemző hálózatos aktin filamentumok eltűntek, s epitheliális fenotípust mutató sejtekké alakultak (reprezentatív ábra, $n = 3$). (B) Ugyanezen sejteken vizsgáltuk, a sejt-sejt és sejt-felszín közötti ellenállást sejtadhéziós kísérletekben, ECIS Z Θ készülék segítségével (reprezentatív ábra, átlag \pm SD, $n=1$). A statisztikai szignifikanciát Khi-négyzet próbával (A), illetve egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg, melyet Dunnett post-hoc variancia-analízis (B) követett. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. ***= $p < 0,001$

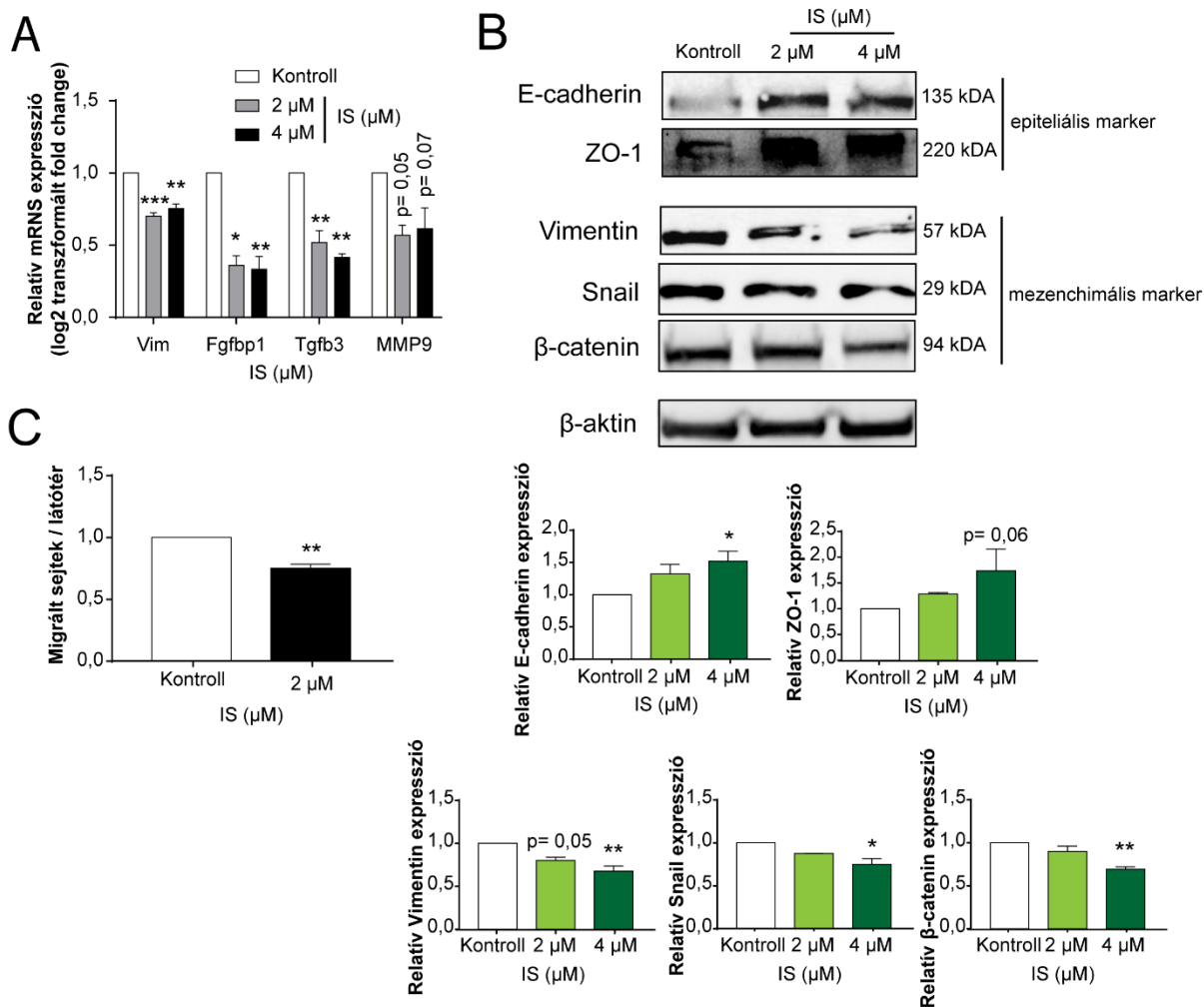
Rövidítések: IS (indoxil szulfát)

Annak érdekében, hogy megértsük az IS-indukált MET molekuláris mechanizmusát, karakterizáltuk az EMT marker géneinek mRNS és fehérje szintű expressziós profilját. Fentebbi megállapításainknak megfelelően az IS kezelés jelentősen csökkentette a mezenchimális markerek kifejeződését (35A ábra), miközben az epitheliális sejtekre specifikus

gének fokozott expressziót mutattak a kontroll csoporthoz képest (11. táblázat) (35B ábra). Mindemellett IS jelenlétben szignifikánsan csökkent az emlőtumor sejtek migrációja Boyden-kamra kísérletben (35C ábra).

11. táblázat Indoxil szulfát kezelés során vizsgált gének listája

Rövidítés	Gén név	Marker
Vim	Vimentin	mezenchimális
MMP9	Mátrix metalloproteináz 9	
Fgfbp1	Fibroblaszt növekedési faktor kötő protein 1	
TGFβ3	Transzformáló növekedési faktor β-3	
Snail1	Snail család transzkripció represszor-1	
β-catenin	Catenin beta-1	
E-cadherin	Epiteliális cadherin	epiteliális
ZO-1	Zonula occludens-1	



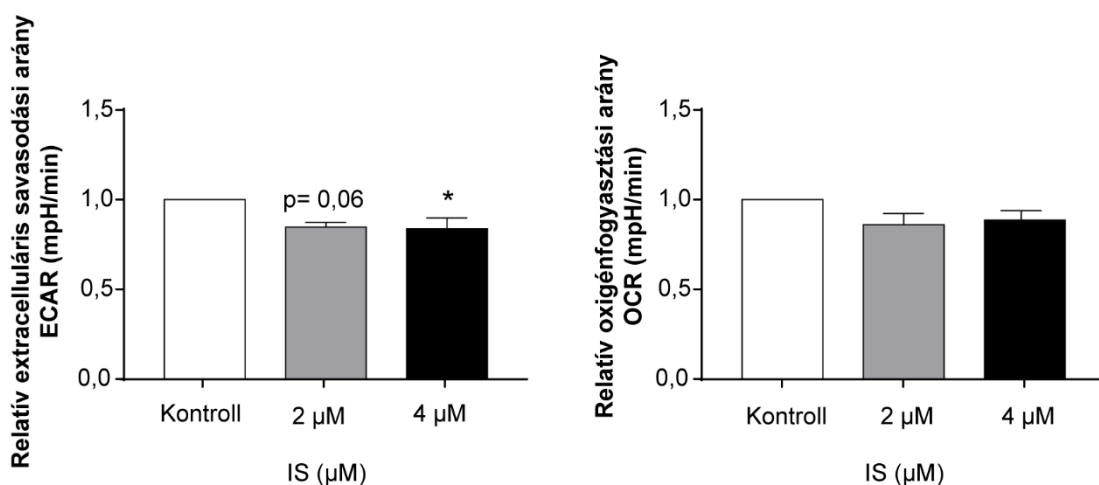
35. ábra Az indoxil szulfát megváltoztatta az EMT markerek expresszióját és gátolta a tumorsejtek migrációját

(A) A 4T1 sejtek 24 órás, jelölt koncentrációkban történt IS kezelése után, RT-qPCR reakcióval vizsgáltuk a mezenchimális sejtekre jellemző markerek mRNS szintű expresszióját (n=3), (B) valamint vizsgáltuk az epiteliális és mezenchimális sejt morfológiára specifikus gének fehérje szintű kifejeződését Western blot kísérletekben (reprezentatív ábra, n=3). A blottok értékelése során a sávok intenzitását Image J szoftverrel határoztuk meg. (C) Továbbá meghatároztuk a Boyden-kamrában migrált sejtek százalékos arányát, majd Opera Phoenix konfokális képalkotó berendezéssel készített felvételeket Harmony 4.6 szoftver segítségével elemeztük (n = 3). A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel (A-B), valamint párosítatlan kétszélű Student t-próbával (C) határoztuk meg. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. *= p < 0,05, **= p < 0,01 és ***= p < 0,001

Rövidítések: IS (indoxil szulfát), ZO-1 (zonula occludens-1), Vim (vimentin), Fgfbp1 (fibroblaszt növekedési faktor kötő protein 1), Tgfb3 (transzformáló növekedési faktor β-3), MMP9 (mátrix metalloproteináz 9)

6.2.2.3. Az indoxil szulfát indukálta metabolikus változások

Az IS kezelés által előidézett metabolikus változások alaposabb feltárásához Seahorse XF96 oximéterrel mértük a glikolízist és a mitokondriális oxidációt jellemző paramétereket, továbbá karakterizáltuk a mitokondriális biogenezist szabályozó gének expresszióját. IS hatására szignifikánsan csökkent az extracelluláris savasodási arány (ECAR), míg az oxigénfogyasztási ráta (OCR) nem változott, a sejtek metabolizmusa glikolitikusabbá vált (36. ábra).



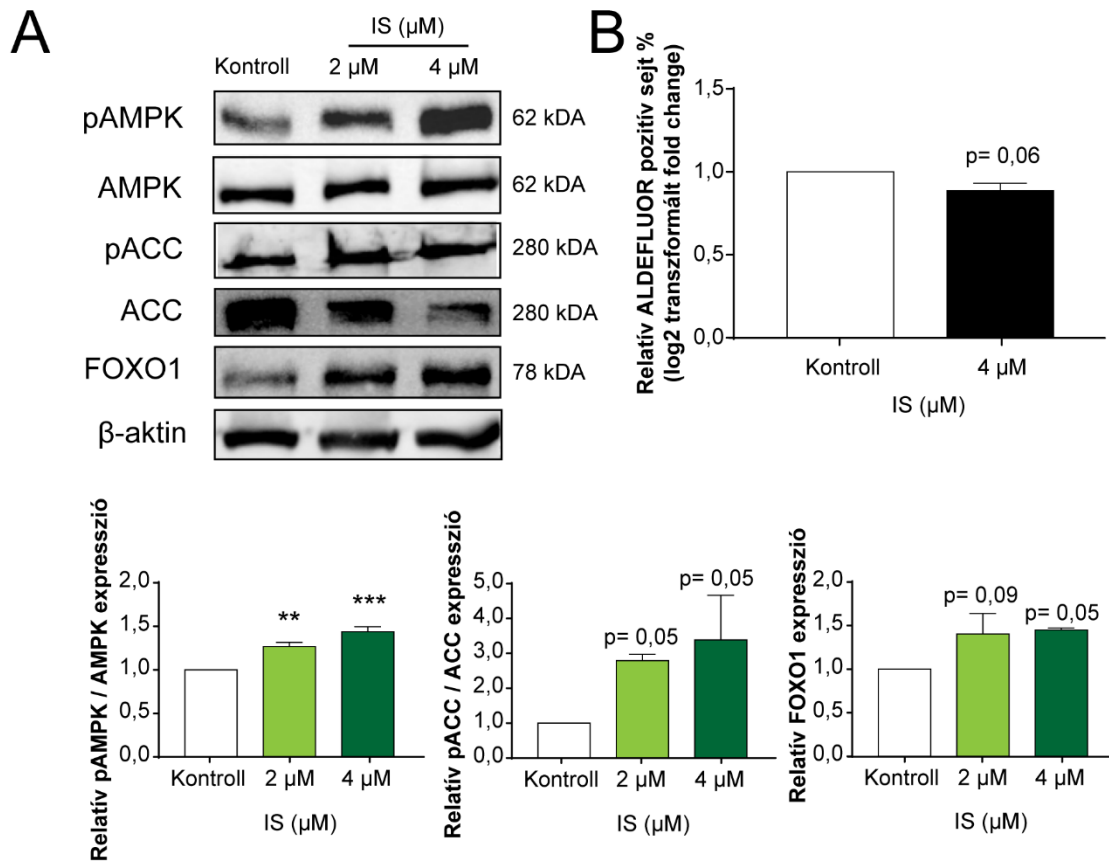
36. ábra Az indoxil szulfát kezelés hipometabolikussá tette a 4T1 emlőrák sejteket

A 4T1 sejtekben 24 óráig, a jelölt koncentrációban történt IS kezelés után Seahorse XF96 oximéterrel mértük a mitokondriális oxigénfogyasztást (OCR) és az extracelluláris savasodási arányt (ECAR) (n = 3). A statisztikai szignifikancia meghatározásához egyutas ANOVA tesztet végeztünk. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag ± SEM formában adtuk meg. *= p <0,05

Rövidítések: IS (indoxil szulfát)

Az enyhén csökkent metabolikus aktivitású sejtekben az energiaszenzor útvonal kulcsfontosságú szabályozói indukálódtak, többek között az AMPK fokozott foszforilációját, valamint emelkedett FOXO1 expressziót tapasztaltunk (37A ábra). Továbbá az AMPK alfa alegységének Thr172-es aminosav foszforilációjának, illetve az AMPK célgén ACC Ser79 aminosav foszforilációjának a megemelkedése az AMPK aktivációjára utal IS kezelést követően (37A ábra). Végül IS kezelés hatására az ALDH1 pozitív emlőrák őssejtek arányának

csökkenését figyeltük meg a kontroll csoporthoz képest (37B ábra), melyet feltételezhetően a sejttanyagcserében bekövetkezett változások idéztek elő [282, 283].



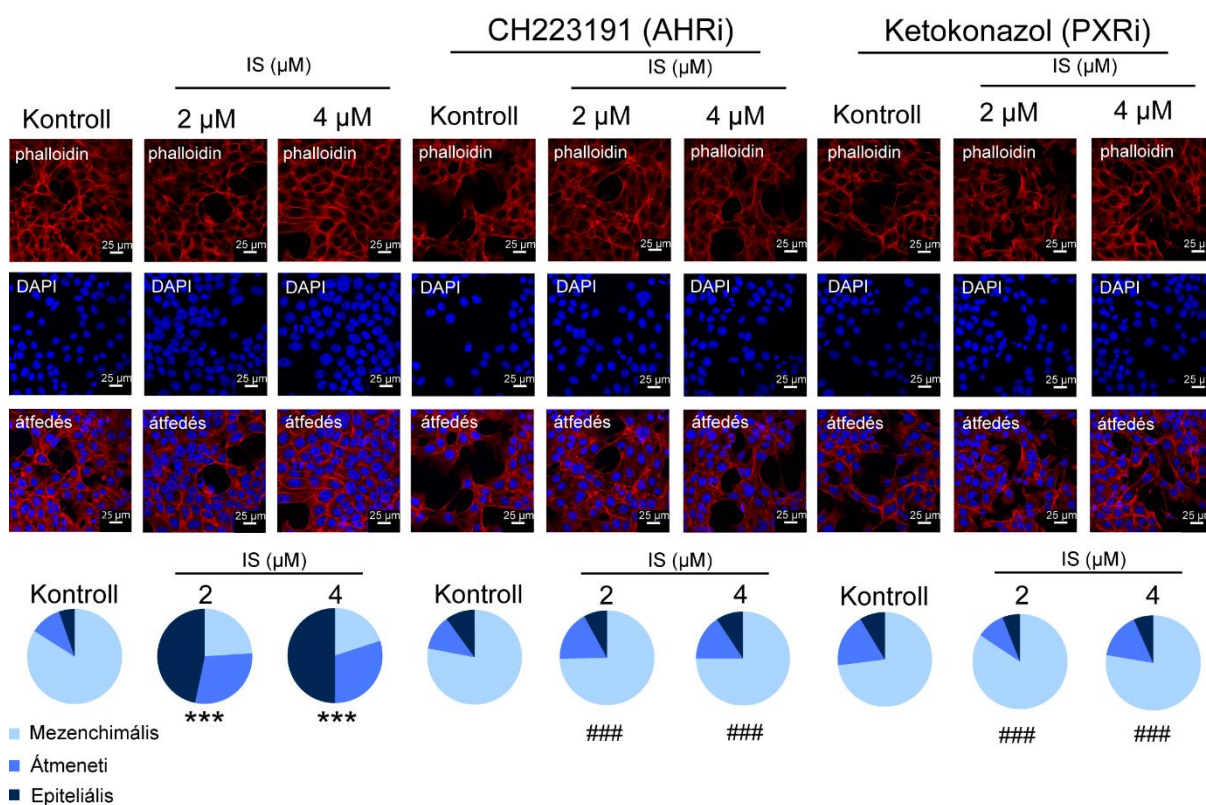
37. ábra Az indoxil szulfát kezelés fokozta a mitokondriális biogenezist, miközben csökkentette az emlőrákos őssejtek arányát

(A) A 4T1 sejteket 24 órán keresztül IS-sel kezeltük a jelölt koncentrációkban, majd Western blot technikával meghatároztuk az energiaszenzor útvonal szabályozók (pACC, ACC, FOXO1 és PGC-1 β) kifejeződését (representatív ábra, n=3). A Western blottok értékelése során a sávok intenzitását Image J szoftverrel határoztuk meg. (B) Továbbá az ALDH1 pozitív őssejtek arányát áramlási citometriával detektáltuk és Flowing Software 2.5.1. segítségével értékeltük (n=3). A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel (A), valamint párosítatlan kétszélű Student t-próbával (B) határoztuk meg. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. **= p < 0,01 és ***= p < 0,001

Rövidítések: IS (indoxil szulfát), ALDH1 (aldehid-dehidrogenáz), ACC (acetyl-Coa-karboxiláz), FOXO1 (forkhead box O1 fehérje), AMPK (AMP-aktivált protein kináz)

6.2.2.4. Az indoxil szulfát az Aril-Hidrokarbon Receptoron (AHR) és Pregnán X-Receptoron (PXR) keresztül fejt ki hatásait

Következő lépésként az IS által kiváltott hatásokat közvetítő receptorok azonosítását tűztük ki célul. Az indol származékok hatásait az AHR és a PXR jelátviteli útvonalak szabályozzák [218]. Ennek igazolásához farmakológiai inhibitorokat, AHR gátlót (CH223191) és a PXR inhibitor (ketokonazol) alkalmaztunk kísérleteinkben [280]. A CH223191 és a ketokonazol egyaránt blokkolta az IS kezelés indukálta morfológiai változásokat (MET) (38. ábra).

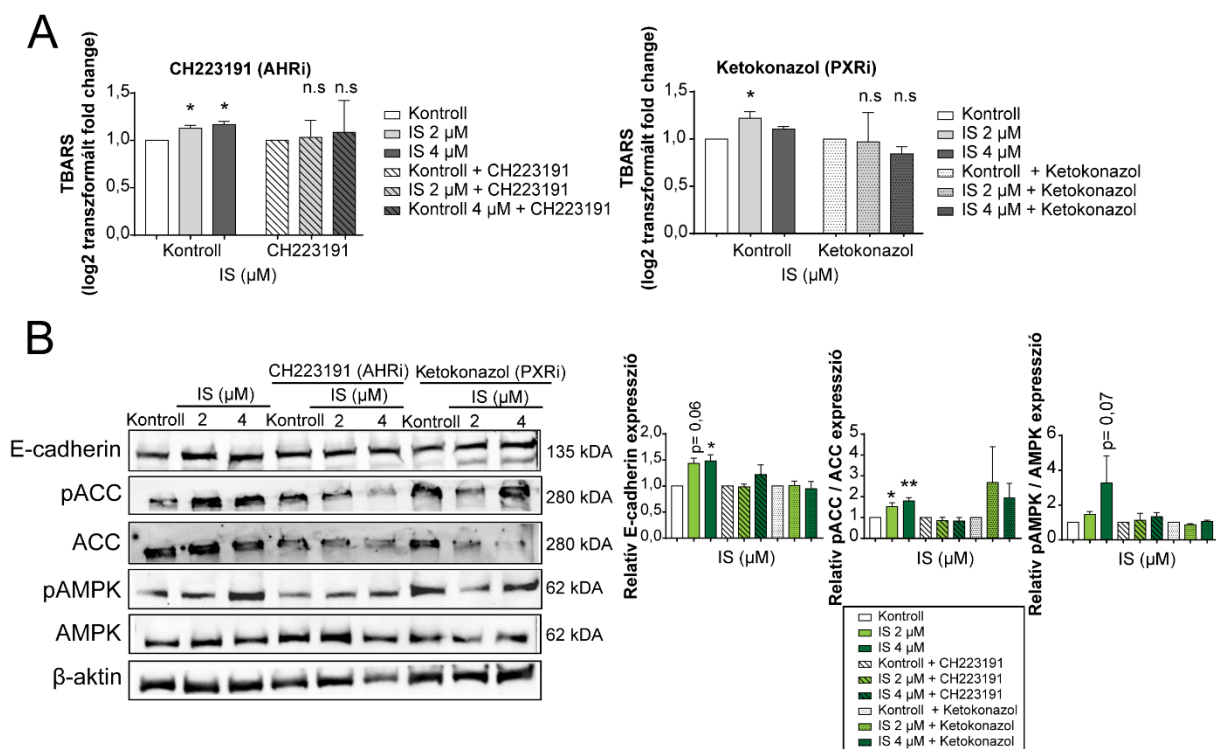


38. ábra Az indoxil szulfát indukált mezenchimális-epiteliális átalakulást (MET) az AHR és a PXR közvetíti

A 4T1 sejteket 24 órán át, a megadott koncentrációban kezeltük IS-sel és farmakológiai inhibitorokkal vagy anélkül, a jelölésekkel megegyezően. Ezt követően az aktin hálózat morfológiáját TexasRed-X Phalloidin és DAPI festéssel jelöltük, majd konfokális mikroszkóppal értékeltük (n=3). A méretarány 25 μm-nek felel meg. A statisztikai szignifikanciát Khi-négyszet próbával számoltuk. Az ábrán *** (p <0,001) jelöli a statisztikailag szignifikáns eltéréseket a kontroll és a kezelt csoportok között, míg a #### (p <0,001) mutatja a kontroll és a CH223191 vagy ketokonazzal kezelt csoportok közötti különbséget.

Rövidítések: IS (indoxil szulfát), PXRi (Pregnán X-Receptor inhibitor), AHR (Aril-Hidrokarbon Receptor inhibitor)

Az AHR és a PXR antagonisták gátolták az IS-mediálta lipidperoxidációt (39A ábra), valamint az E-cadherin fehérje szintű kifejeződését a CH223191 inhibitor blokkolta, míg a ketokonazol nem volt rá hatással (39B ábra). Ezzel szemben az ACC és az AMPK foszforilációját mindkét gátlószer megakadályozta (39B ábra).



39. ábra Az indoxil szulfát által előidézett antitumor hatások AHR-on és a PXR-on keresztül szabályozottak

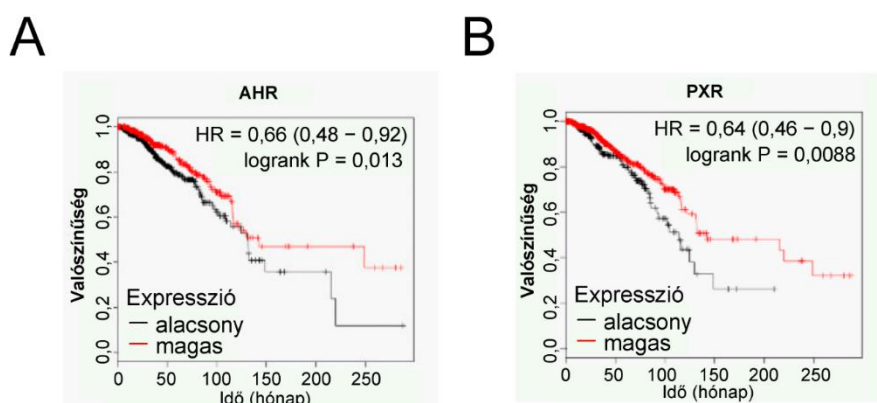
(A) A 4T1 sejteket IS-sel 24 órán keresztül, a megadott koncentrációban kezeltük, majd TBARS teszttel meghatároztuk a tiobarbitursav-reaktív termékek mennyiségét ($n=3$), valamint (B) a jelzett fehérjék kifejeződését Western blot segítségével vizsgáltuk (reprezentatív ábra, $n=3$). A blottok értékelése során a sávok intenzitását Image J szoftverrel határoztuk meg. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel határoztuk meg. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet alkalmaztunk. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, n.s.= nem szignifikáns

Rövidítések: IS (indoxil szulfát), PXRi (Pregnán X-Receptor inhibitor), AHR (Ari-Hidrokarbon Receptor inhibitor), ACC (acetyl-Coa-karboxiláz), AMPK (AMP-aktivált protein kináz)

6.3. Humán emlőtumoros betegek mintáin végzett tanulmányok

6.3.1. Az AHR és a PXR expressziója pozitív korrelációt mutat az emlőtumoros betegek túlélésével

Mind az IPA és mind az IS hatásait az AHR és a PXR jelátviteli útvonalon keresztül fejtí ki [218]. Ezért a Kaplan-Meier plotter adatbázis (<https://kmplot.com/analysis/>) segítségével arra kerestük a választ, hogy ezen receptorok expressziója összefüggést mutat-e az emlőrákos betegek túlélésével [284]. Az RNAseq adatok elemzése során a honlap szoftvere a legalacsonyabb és legmagasabb expressziójú kvartilist hasonlítja össze. Megállapítottuk, hogy az AHR (40A ábra) és a PXR (40B ábra) magasabb expressziója szignifikánsan hosszabb túléléssel társul.



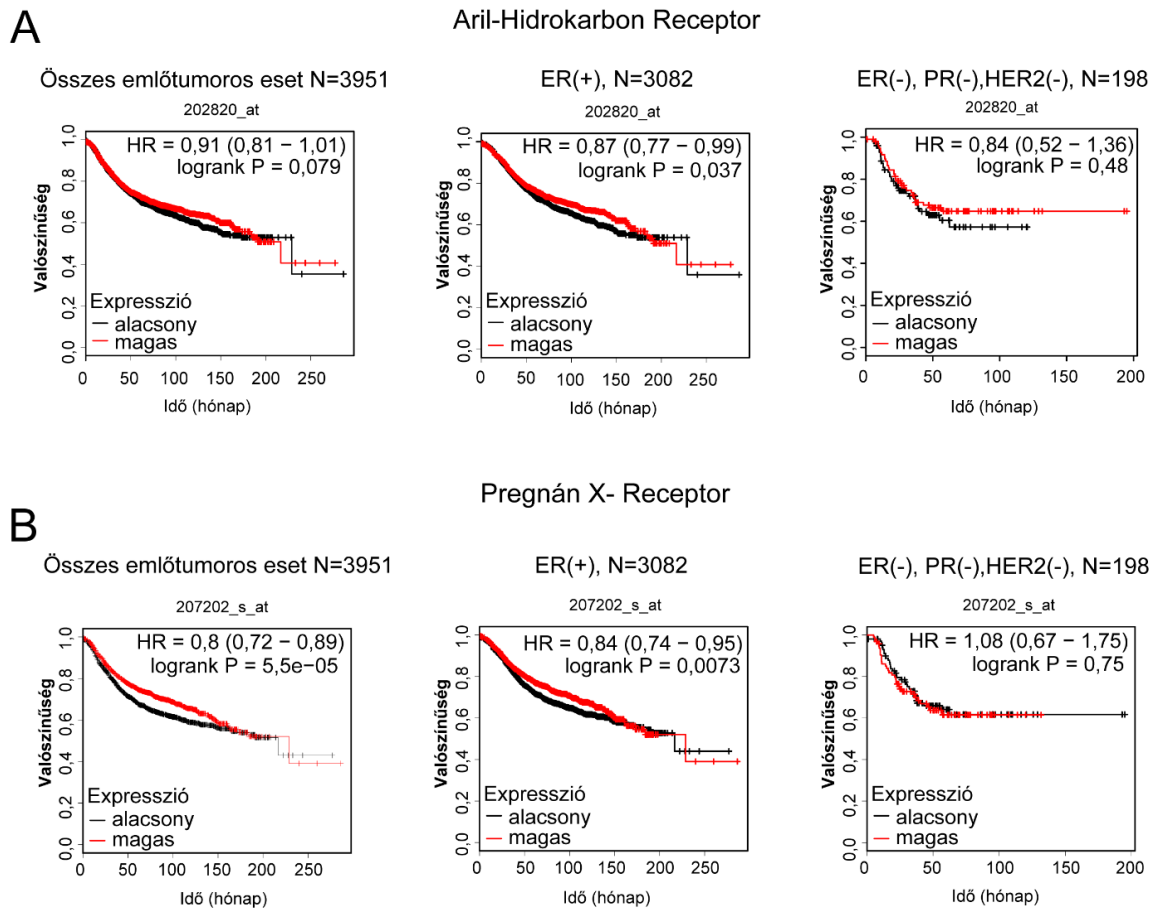
40. ábra Az Aril-Hidrokarbon Receptor és a Pregnán X-Receptor magasabb expressziója hosszabb túlélést eredményez

Az AHR és a PXR kifejeződésének hatását az emlőrákos betegek túlélési arányára egy szabadon hozzáférhető adatbázis (<https://kmplot.com/analysis/>) segítségével elemeztük. (A) Meghatároztuk az AHR és a (B) PXR expresszió túlélésre gyakorolt hatását RNAseq kísérletekből nyert adatok alapján. A teljes túlélési arányt elemeztük, és a grafikonok az összes esetet reprezentálják. Az adatokat 2020. március 30-án jegyeztük le.

Rövidítések: PXR (Pregnán X-Receptor), AHR (Aril-Hidrokarbon Receptor), HR (veszélyességi arány)

Ezt követően mikroarray adatokat is elemeztük, melynél a receptor expresszió függvényében sztratifikáltuk az emlőtumoros betegeket (41. ábra). Trendszerű hatásokat tapasztaltunk ($p=0,079$), az AHR magasabb expressziója elősegítette a hosszabb túlélést emlődaganatos betegekben, hasonlóan az RNAseq adatok elemzésekor látottakhoz (41A ábra). Ezzel összhangban, a magasabb PXR kifejeződés is jobb túlélést biztosított emlőrákos betegek esetén (41B ábra, 12. táblázat). Fontos megfigyelésünk, hogy a magasabb AHR és PXR

expresszió által nyújtott védő hatás eltűnik a tripla negatív tumorok esetében (41B ábra, 12. táblázat).



41. ábra Az Aril-Hidrokarbon Receptor és a Pregnán X-Receptor magasabb kifejeződése hosszabb túléléssel hozható kapcsolatba

Az AHR és a PXR kifejeződése valamint az emlőrákos betegek túlélési arányának összefüggéseit egy szabadon hozzáférhető adatbázis (<https://kmplot.com/analysis/>) alkalmazásával értékeltük. Az emlőtumoros betegeket a receptor expresszió függvényében sztratifikáltuk, majd vizsgáltuk (A) az AHR és (B) a PXR kifejeződés, valamint az emlőrákos esetek túlélési rátája közötti kapcsolatot mikroarray kísérletek eredményeit használva. A teljes túlélési arányt elemeztük, és a grafikonok az összes esetet reprezentálják. Az adatokat 2020. március 30-án jegyeztük le.

Rövidítések: PXR (Pregnán X-Receptor), AHR (Aril-Hidrokarbon Receptor), HR (veszélyességi arány), ER (ösztrogén receptor), PR (progeszteron receptor), HER2 (humán epidermális növekedési faktor receptor)

12. táblázat Az AHR vagy PXR expresszió és az emlőrákos betegek túlélése közötti összefüggés

Az AHR és a PXR kifejeződésének emlőrákos betegek túlélési arányára gyakorolt hatását egy szabadon hozzáférhető adatbázis (<https://kmplot.com/analysis/>) segítségével elemeztük. A

teljes túlélési rátát értékeltük, illetve a táblázatban jelölt adatok a különböző emlőrák szubpopulációkba sorolt összes esetet reprezentálják. A félkövér betűkkel szedett számok statisztikailag szignifikáns eredményeket jelentenek.

	AHR (202820_at)		PXR (207202_s_at)	
	HR	p-érték	HR	p-érték
Összes emlőrákos eset N=3951	0,91	0,079	0,8	0,00055
ER (+), N=3082	0,87	0,037	0,84	0,0073
ER (-), N=869	0,96	0,68	0,74	0,0056
PR (+), N=589	0,72	0,068	1,02	0,91
PR (-), N=549	0,87	0,35	0,9	0,49
HER2 (+), N=252	0,97	0,87	0,93	0,73
HER2 (-), N=800	0,71	0,012	1,01	0,93
ER (+), PR (+), HER2 (+), N=76	1,15	0,78	1,31	0,61
ER (-), PR (-), HER2 (-), N=198	0,84	0,48	1,08	0,75
ER (+), PR (+), N=577	0,67	0,029	0,97	0,89
ER (-), PR (-), N=298	0,84	0,39	0,93	0,73
ER (-), PR (-), HER2 (-) N=198	0,84	0,48	1,048	0,75
ER (+), Luminális A, N=1933	0,87	0,11	0,77	0,0031
ER (+), Luminális A, Grádus 1, N=267	0,65	0,17	1,04	0,9
ER (+), Luminális B, N=1149	1,16	0,12	0,81	0,031
ER (+), Luminális B, Grádus 1 N=56	1,45	0,55	0,77	0,66
Grádus 1, N=345	0,67	0,13	0,97	0,92
Grádus 2, N=901	0,67	0,001	1,07	0,56
Grádus 3, N=903	0,97	0,78	0,98	0,83
Bazális altípus, N= 618	0,95	0,67	0,78	0,053
Luminális A, N= 1933	0,87	0,11	0,77	0,0031
Luminális B, N= 1149	1,16	0,12	0,81	0,031
ER (+), HER2 (+), N=156	1,33	0,36	1,41	0,28
ER (-), HER2 (+), N=96	0,67	0,21	0,63	0,15
ER (+), PR (+), Nyirok (+) N=344	0,61	0,026	0,96	0,85
ER (+), PR (+), Nyirok (-) N=228	0,86	0,64	0,84	0,6
ER (-), PR (-), Nyirok (+) N=127	0,85	0,54	0,95	0,86
ER (-), PR (-), Nyirok (-) N=167	0,68	0,21	1,02	0,95
ER (+), Luminális A, Grádus 2, N=567	0,69	0,027	1,06	0,73
ER (+), Luminális B, Grádus 2 N=253	0,76	0,21	1,23	0,34

HR - veszélyességi arány. A p értékeket Log Rank teszt segítségével számoltuk. A táblázatban a *, ** és *** a szignifikáns változásokat jelölik a kontroll és kezelt csoportok között, ahol a p <0,05, p <0,01 vagy p <0,001, a jelzéseknek megfelelően.

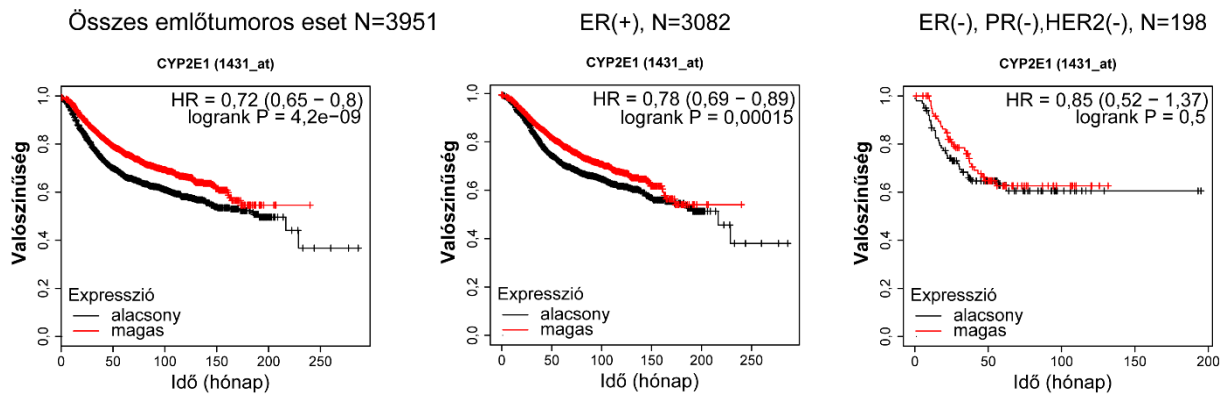
6.3.2. A SULT és a Cyp2E1 magasabb expressziója korrelál az emlődaganatos betegek hosszabb túlélésével

A fentebb ismertetett adatbázis elemzések során kimutattuk, hogy az IPA és az IS hatásait közvetítő AHR és PXR magasabb expressziója hosszabb a túlélést eredményez az emlőrákos betegeknél. Ennek okán a következőkben azt tanulmányoztuk, hogy az IS bioszintézist szabályozó humán enzimek (13. táblázat) expressziója hogyan befolyásolja az emlőrákos betegek túlélését.

13. táblázat Az indoxil szulfát bioszintézist katalizáló enzimek

Rövidítés	Enzim név
Cyp2E1	Citokróm P 450 2. család E alcsalád-1
SULT1A1	Szulfotranszferáz 1A család -1
SULT1A2	Szulfotranszferáz 1A család -2

Így hasonlóan az előbbiekhöz, a KMPLOT online adatbázist használva végeztünk elemzéseket [284], mely során a Cyp2E1 enzim izoformák magasabb expressziója emlőrákos betegeknél jelentősen hosszabb túléléssel társult (42. ábra, 14. táblázat).



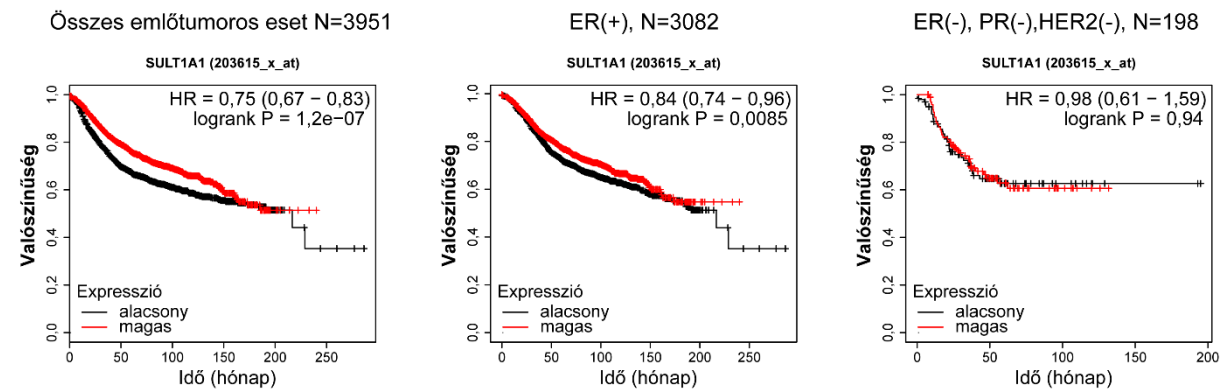
42. ábra A Cyp2E1 magasabb expressziója meghosszabbítja az emlőrákos betegek túlélését

A Cyp2E1 expressziójának hatását az emlőrák túlélési arányára egy adatbázis (<https://kmplot.com/analysis/>) segítségével elemeztük. A betegeket az enzim kifejeződésétől függően csoportosítottuk, majd vizsgáltuk a Cyp2E1 enzim különböző izoformáinak kifejeződése és az emlőrákos esetek túlélése közötti összefüggést, mikroarray kísérletek eredményeit felhasználva. A teljes túlélési arányt elemeztük, és a grafikonok az összes esetet reprezentálják. Az adatokat 2020. március 30-án jegyeztük le.

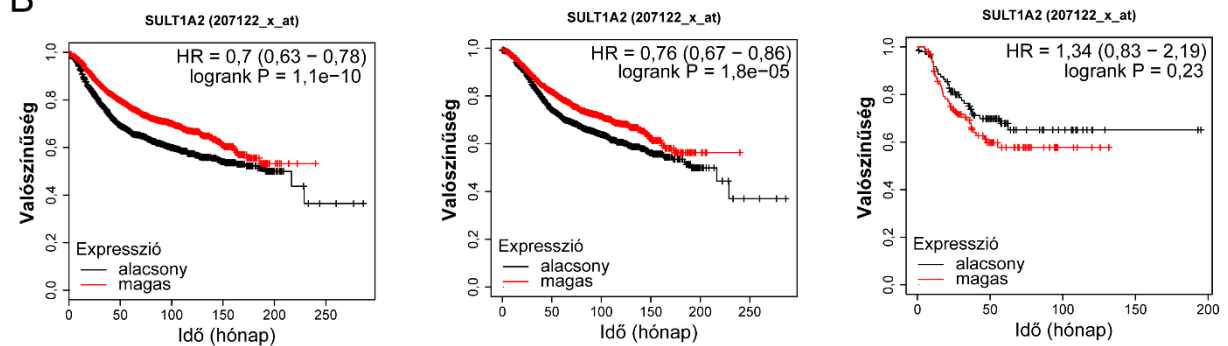
Rövidítések: Cyp2E1 (citokróm P450 2E1), HR (veszélyességi arány), ER (ösztrogén receptor), PR (progeszteron receptor), HER2 (humán epidermális növekedési faktor receptor)

Továbbá mind a SULT1A1 (43A ábra) és mind a SULT1A2 (43B ábra) izoformák magasabb kifejeződése kedvezőbb túlélést biztosított a betegeknek (14. táblázat). Ugyanakkor tripla negatív emlődaganatokban (TNBC) (ösztrogén, progeszteron és HER2 hormonreceptor negatív) nem volt hatással a túlélésre, hasonlóan más bakteriális citosztatikus metabolitokhoz [19, 20, 138].

A



B



43. ábra A SUL1A1 vagy a SUL1A2 magasabb expressziója hosszabb túlélést eredményez emlőrákos betegeknél

Az SUL1A1 és a SUL1A2 enzim izoformák kifejeződése, valamint az emlőrákos betegek túlélése közötti kapcsolatot egy szabadon hozzáférhető adatbázis (<https://kmpplot.com/analysis/>) alkalmazásával elemeztük. Az enzim kifejeződésétől függően csoportosított betegekben, meghatároztuk a (A) SUL1A1 és a (B) SUL1A2 expresszió túlélésre gyakorolt hatását, RNAseq kísérletekből nyert adatok alapján. A teljes túlélési arányt elemeztük, és a grafikonok az összes (nem sztratifikált) esetet reprezentálják. Az adatokat 2020. március 30-án jegyeztük le.

Rövidítések: SULT1 és SULT2 (szulfotranszferáz 1 és 2), HR (veszélyességi arány), ER (ösztrogén receptor), PR (progeszteron receptor), HER2 (humán epidermális növekedési faktor receptor)

14. táblázat A veszélyeztetett betegek száma a 42. és a 43. ábra alapján

	Gén		Idő (hónap)						HR	
			0	50	100	150	200	250		
Összes emlőrákos eset	Veszélyeztetett esetek száma	CYP2E1	alacsony	2012	1176	505	139	23	3	0,72
		1431_at	magas	1939	1343	570	102	4	0	(0,65-0,8)
		CYP2E1	alacsony	1980	1177	482	133	16	2	0,68
		209975_at	magas	1971	1342	593	108	11	1	(0,61-0,76)
		CYP2E1	alacsony	2091	1360	633	160	23	2	0,96
		209976_s_at	magas	1860	1159	442	81	4	1	(0,86-1,07)
		CYP2E1	alacsony	1984	1171	487	113	12	0	0,78
		222100_at	magas	1967	1348	588	128	15	3	(0,7-0,87)
		SULT1A1	alacsony	1979	1160	472	141	20	3	0,75
		203615_x_at	magas	1972	1359	603	100	7	0	(0,67-0,83)
		SULT1A1	alacsony	1976	1150	463	139	22	3	0,77
		215299_x_at	magas	1975	1369	612	102	5	0	(0,69-0,86)
		SULT1A2	alacsony	1979	1133	427	130	18	3	0,7
		207122_x_at	magas	1972	1386	648	111	9	0	(0,63-0,78)
SULT1A2	alacsony	1976	1149	440	133	18	3	0,73		
211385_x_at	magas	1975	1370	635	108	9	0	(0,66-0,82)		
ER+ esetek	Veszélyeztetett esetek száma	CYP2E1	alacsony	1542	1004	436	125	19	3	0,78
		1431_at	magas	1540	1112	483	76	3	0	(0,69-0,89)
		CYP2E1	alacsony	1542	1019	430	119	15	2	0,74
		209975_at	magas	1540	1097	489	82	7	1	(0,65-0,85)
		CYP2E1	alacsony	1622	1125	531	130	19	2	0,94
		209976_s_at	magas	1460	991	388	71	3	1	(0,83-1,07)
		CYP2E1	alacsony	1606	1052	451	106	13	1	0,82
		222100_at	magas	1476	1064	468	95	9	2	(0,72-0,93)
		SULT1A1	alacsony	1542	1021	428	123	15	3	0,84
		203615_x_at	magas	1540	1095	491	78	7	0	(0,74-0,96)
		SULT1A1	alacsony	1542	1009	421	123	17	3	0,87
		215299_x_at	magas	1540	1107	498	78	5	0	(0,76-0,98)
		SULT1A2	alacsony	1542	999	392	117	17	3	0,76
		207122_x_at	magas	1540	1117	527	84	5	0	(0,67-0,86)
SULT1A2	alacsony	1541	1004	390	111	16	3	0,81		
211385_x_at	magas	1541	1112	529	90	6	0	(0,71-0,92)		
Tripla negatív esetek	Veszélyeztetett esetek száma	CYP2E1	alacsony	99	41	10	2	0	0	0,85
		1431_at	magas	99	42	9	0	0	0	(0,52-1,37)
		CYP2E1	alacsony	100	46	6	2	0	0	0,96
		209975_at	magas	98	37	13	0	0	0	(0,59-1,55)
		CYP2E1	alacsony	99	33	5	0	0	0	0,8
		209976_s_at	magas	99	50	14	2	0	0	(0,49-1,3)
		CYP2E1	alacsony	99	42	12	2	0	0	1,17
		222100_at	magas	99	41	7	0	0	0	(0,72-1,9)
		SULT1A1	alacsony	100	41	10	2	0	0	0,98
		203615_x_at	magas	98	42	9	0	0	0	(0,61-1,59)
		SULT1A1	alacsony	99	40	5	2	0	0	1,18
		215299_x_at	magas	99	43	14	0	0	0	(0,72-1,91)
		SULT1A2	alacsony	99	46	14	2	0	0	1,34
		207122_x_at	magas	99	37	5	0	0	0	(0,83-2,19)
SULT1A2	alacsony	99	42	12	2	0	0	1,06		
211385_x_at	magas	99	41	7	0	0	0	(0,66-1,72)		

HR - veszélyességi arány. A táblázatban található értékeket a kmpplot.com adatbázisból mentettük, 2020. március 30-án.

15. táblázat A Cyp2E1 expresszió és az emlőrákos betegek túlélése közötti kapcsolat

A Cyp2E1 expresszió és az emlődaganatos betegek túlélése közötti összefüggést kmplot.com adatbázissal vizsgáltuk. A teljes túlélési rátát értékeltük, valamint az adatok az egyes emlőrák alpopulációkba sorolt összes esetet reprezentálják.

	CYP2E1 (1431_at)		CYP2E1 (209975_at)		CYP2E1 (209976_s_at)		CYP2E1 (222100_at)	
	HR	p-érték	HR	p-érték	HR	p-érték	HR	p-érték
Összes emlőrákos eset N=3951	0,72	4,2e-9	0,68	7,8e-12	0,96	0,460	0,78	7,3e-6
ER (+), PR (+), N=577	1,29	0,170	1,02	0,920	0,76	0,140	0,84	0,340
ER (-), PR (-), N=298	1,06	0,770	1,23	0,300	1,05	0,820	1,04	0,830
ER (-), PR (-), HER2 (-) N=198	0,80	0,500	0,96	0,860	0,80	0,370	1,17	0,520
ER (+), Luminális A, N=1933	0,76	0,001	0,68	1,1e-5	0,99	0,920	0,81	0,016
ER (+), Luminális A, Grádus 1, N=267	0,97	0,920	1,38	0,300	0,81	0,520	1,27	0,450
ER (+), Luminális B, N=1149	0,79	0,019	0,81	0,030	0,87	0,160	0,74	0,003
ER (+), Luminális B, Grádus 1 N=56	1,46	0,530	1,04	0,950	0,83	0,770	1,24	0,720
Grádus 1, N=345	1,02	0,940	1,15	0,590	0,76	0,310	1,22	0,450
Grádus 2, N=901	1,13	0,330	1,13	0,310	0,94	0,640	0,74	0,013
Grádus 3, N=903	0,93	0,54	0,94	0,56	1,11	0,330	0,85	0,16
Bazális altípus, N= 618	0,59	4,1e-5	0,62	0,000	0,89	0,360	0,91	0,470
Luminális A, N= 1933	0,76	0,001	0,68	1,1e-5	0,99	0,920	0,81	0,016
Luminális B, N= 1149	0,79	0,019	0,81	0,030	0,87	0,160	0,74	0,003
ER (+), HER2 (+), N=156	1,25	0,470	1,69	0,093	1,14	0,670	1,26	0,460
ER (-), HER2 (+), N=96	1,37	0,320	1,58	0,150	1,78	0,068	0,81	0,510
ER (+), PR (+), Nyirok (+) N=344	1,41	0,120	1,05	0,810	0,80	0,310	1,02	0,930
ER (+), PR (+), Nyirok (-) N=228	0,81	0,560	1,06	0,870	0,76	0,400	0,44	0,025
ER (-), PR (-), Nyirok (+) N=127	1,26	0,390	1,08	0,780	1,16	0,580	1,21	0,470
ER (-), PR (-), Nyirok (-) N=167	1,00	1,000	1,11	0,740	0,96	0,900	1,32	0,370
ER (+), Luminális A, Grádus 2, N=567	0,91	0,580	1,13	0,460	1,01	0,970	0,89	0,480
ER (+), Luminális B, Grádus 2 N=253	0,65	0,051	0,82	0,360	0,46	0,001	0,59	0,020
ER (+) N=3082	0,78	0,0002	0,74	5,9e-6	0,94	0,3382	0,82	0,0023

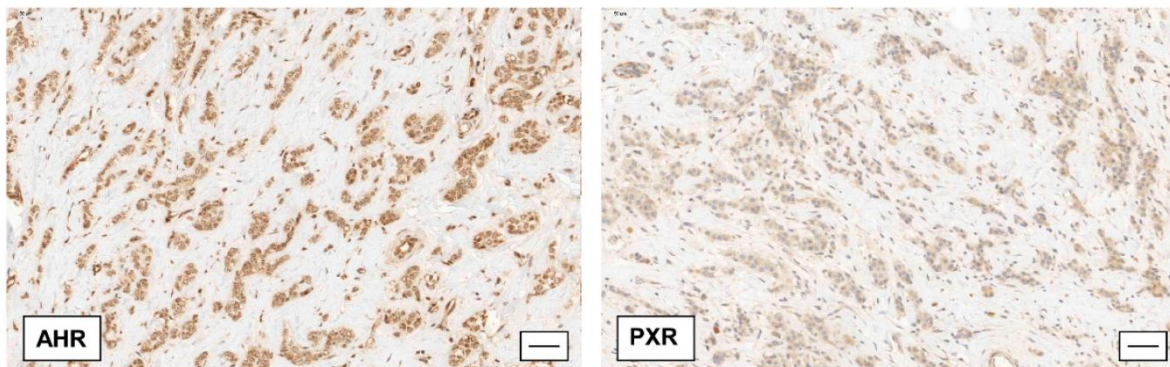
16. táblázat Összefüggés a SULT1A1 és SULT1A2 expresszió és az emlőrák túlélés között

	SULT1A1 (203615_x_at)		SULT1A1 (215299_x_at)		SULT1A2 (207122_x_at)		SULT1A2 (211385_x_at)	
	HR	p-érték	HR	p-érték	HR	p-érték	HR	p-érték
	Összes emlőrákos eset N=3951	0,72	1,2e-7	0,77	3,7e-6	0,70	1,1e-10	0,73
ER (+), PR (+), N=577	1,16	0,430	1,19	0,330	1,18	0,370	1,22	0,270
ER (-), PR (-), N=298	1,37	0,120	1,42	0,085	1,34	0,140	1,24	0,280
ER (-), PR (-), HER2 (-) N=198	0,98	0,940	1,18	0,510	1,34	0,230	1,06	0,810
ER (+), Luminális A, N=1933	0,86	0,092	0,93	0,399	0,78	0,005	0,70	0,002
ER (+), Luminális A, Grádus 1, N=267	0,83	0,560	1,59	0,150	1,01	0,960	1,13	0,700
ER (+), Luminális B, N=1149	0,84	0,075	0,83	0,064	0,68	6,9e-5	0,84	0,078
ER (+), Luminális B, Grádus 1 N=56	0,91	0,870	0,89	0,850	1,31	0,660	1,43	0,550
Grádus 1, N=345	0,94	0,810	1,32	0,300	1,17	0,560	1,14	0,630
Grádus 2, N=901	0,96	0,730	1,09	0,500	0,84	0,170	0,91	0,430
Grádus 3, N=903	1,02	0,860	1,00	1,000	0,94	0,58	1,04	0,74
Bazális altípus, N= 618	0,72	0,012	0,85	0,210	0,73	0,015	0,75	0,024
Luminális A, N= 1933	0,86	0,092	0,93	0,400	0,78	0,005	0,77	0,002
Luminális B, N= 1149	0,84	0,075	0,83	0,064	0,68	6,9e-5	0,84	0,078
ER (+), HER2 (+), N=156	1,24	0,490	1,13	0,690	0,96	0,900	1,18	0,600
ER (-), HER2 (+), N=96	1,47	0,230	1,40	0,300	1,31	0,390	1,05	0,880
ER (+), PR (+), Nyirok (+) N=344	1,29	0,240	1,23	0,340	1,26	0,290	1,21	0,380
ER (+), PR (+), Nyirok (-) N=228	0,89	0,720	0,87	0,680	1,08	0,820	1,33	0,380
ER (-), PR (-), Nyirok (+) N=127	1,54	0,110	1,22	0,470	1,32	0,310	1,25	0,400
ER (-), PR (-), Nyirok (-) N=167	1,41	0,270	1,10	0,760	1,39	0,290	1,12	0,720
ER (+), Luminális A, Grádus 2, N=567	1,12	0,500	1,51	0,014	0,92	0,620	1,06	0,720
ER (+), Luminális B, Grádus 2 N=253	0,68	0,076	0,63	0,036	0,78	0,240	0,76	0,200
ER (+) N=3082	0,84	0,0085	0,87	0,0275	0,76	1,8e-5	0,81	0,0009

HR - veszélyességi arány. A p értéket Log Rank teszt segítségével számoltuk. A táblázatban a *, ** és *** a szignifikáns változásokat jelölik a kontroll és kezelt csoportok között, ahol a $p < 0,05$, $p < 0,01$ vagy $p < 0,001$, a jelzéseknek megfelelően.

6.3.3. Az AHR és a PXR kifejeződése emlőtumoros betegek szövetmintáiban (Betegcsoport 2.)

In silico vizsgálataink eredményeit az AHR és a PXR intratumorális expressziójának karakterizálásával egészítettük ki (44. ábra). Szöveti mikroarray eljárással immunhisztokémiai festést végzett kollaborációs partnerünk 88 emlődaganatos beteg archivált szövetblokkjain. A betegcsoport részleteit már korábban publikálta munkacsoportunk [138].

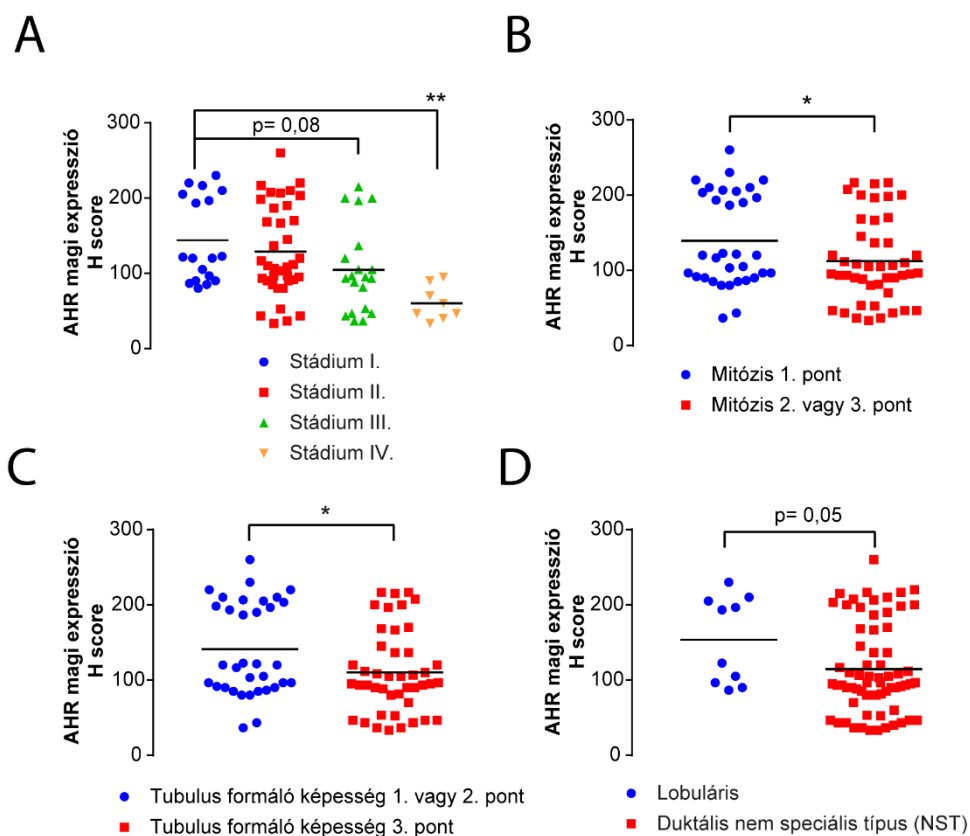


44. ábra Az Aril-Hidrokarbon Receptor és a Pregnán X-Receptor kifejeződése humán emlőtumoros betegek szövetmintáiban

Emlőtumoros betegek szöveti mikroblokk mintáin (TMA), antitest segítségével jelölték kollaborációs partnereink az AHR és a PXR kifejeződését. A mikroszkópos felvételeken tipikus festődési mintázatot szemléltetünk. A méretarány 50 µm-nek felel meg.

Rövidítések: PXR (Pregnán X-Receptor), AHR (Aril-Hidrokarbon Receptor)

TMA kísérletek során, amennyiben a sejtek egészében vettük figyelembe az AHR expressziót, nem tapasztaltunk jelentős változást, így ezeket az adatokat nem mutatjuk be. Azonban, az AHR aktivitást jobban reprezentáló nukleáris AHR kifejeződése csökkent a betegség progressziójával (45A ábra). A nukleáris AHR kifejeződése csökkent az erősen proliferáló (45B ábra) és az alacsonyabb differenciáltságú tumorokban (45C ábra). Ezzel összhangban az invazív duktális karcinómák nem speciális típusaként azonosított tumorokban alacsonyabb AHR aktivitást tapasztaltunk a lobuláris tumorokhoz képest (45D ábra).

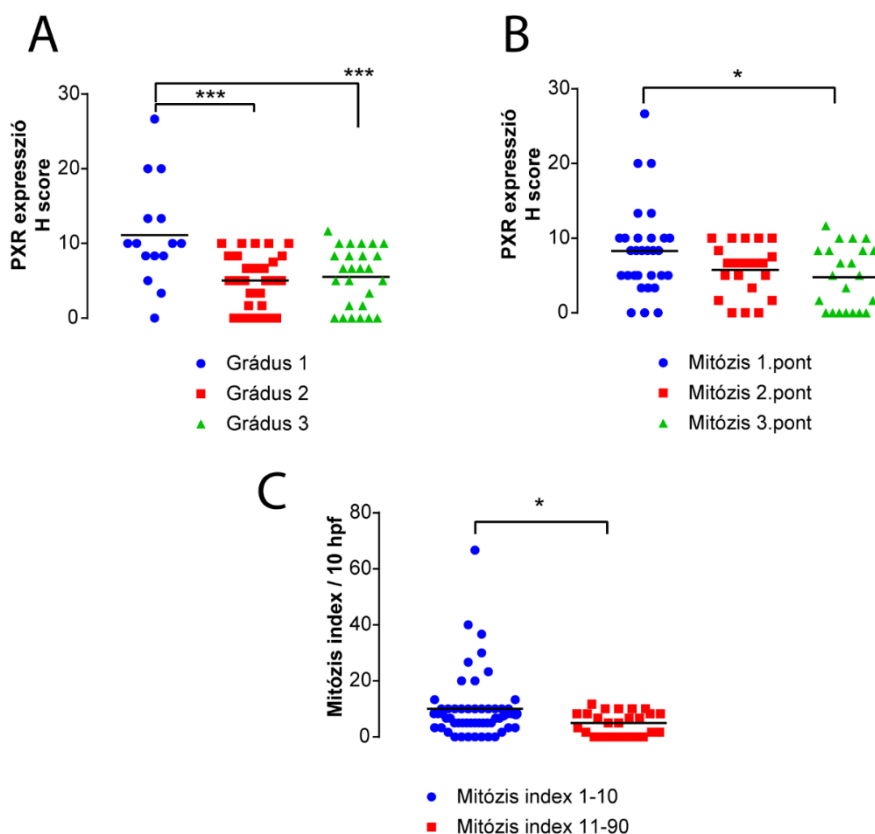


45. ábra A nukleáris Aril-Hidrokarbon Receptor (AHR) alacsonyabb intratumorális expressziója korrelál a tumor progressiójával és a magasabb mitotikus aktivitással, differenciálatlan emlődaganatokban

Emlődaganatos betegek mintáiból készült szöveti mikroarray-t AHR antitesttel jelölte kollaborációs partnerünk. Az eseteket az AHR expresszió függvényében H-pontrendszer (H-score) alapján pontozta. Az AHR receptor nukleáris expressziójának H-pontszáma összefüggést mutatott a betegség (A) stádiumával, (B) mitózis pontszámával, (C) tubulus képződésével és (D) szövettani altípussal is. A 0. stádiumú (*in situ* karcinóma) és az 1. stádiumú betegeket, valamint 1. és 2. pont tubulus képződéssel értékelt eseteket együtt kezelte az alacsony esetszám miatt. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel (A), valamint párosítatlan kétszélű Student t-próbával (B-D) határoztuk meg. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet végeztünk. Az ábrán az adatok átlagát adtuk meg. *= $p < 0,05$ és **= $p < 0,01$

Rövidítések: AHR (Aril-Hidrokarbon Receptor), duktális karcinóma nem speciális típus (NST)

Mindemellett a Nottingham grádus emelkedésével párhuzamosan csökkent a sejt egészében értékelt PXR kifejeződése (46A ábra), továbbá magasabb proliferációs rátával jellemezhető tumorokban alacsonyabb PXR expressziót detektáltunk (46B-C ábra).



46. ábra A Pregnán X-Receptor (PXR) intratumorális expressziója csökkent a tumor grádusával és magasabb mitotikus aktivitással bíró emlődaganatokban

Emlődaganatos betegek szöveti mikroblokkjain (TMA) kollaborációs partnerünk a PXR kifejeződését megfelelő antitest alkalmazásával jelölte. Az eseteket a PXR kifejeződés függvényében H-pontrendszer (H-score) alapján értékelte. A PXR receptor expressziójának H-pontszáma korrelál a betegség (A) grádusával, (B) mitózis pontszámával és (C) mitotikus indexével. Az 1 és 2 mitózis pontszámmal értékelt betegeket az alacsony esetszám miatt együtt kezelte. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel (A-B), valamint párosítatlan kétszélű Student t-próbával (C) számoltuk. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet végeztünk. Az ábrán az adatok átlagát adtuk meg. *= $p < 0,05$ és ***= $p < 0,001$

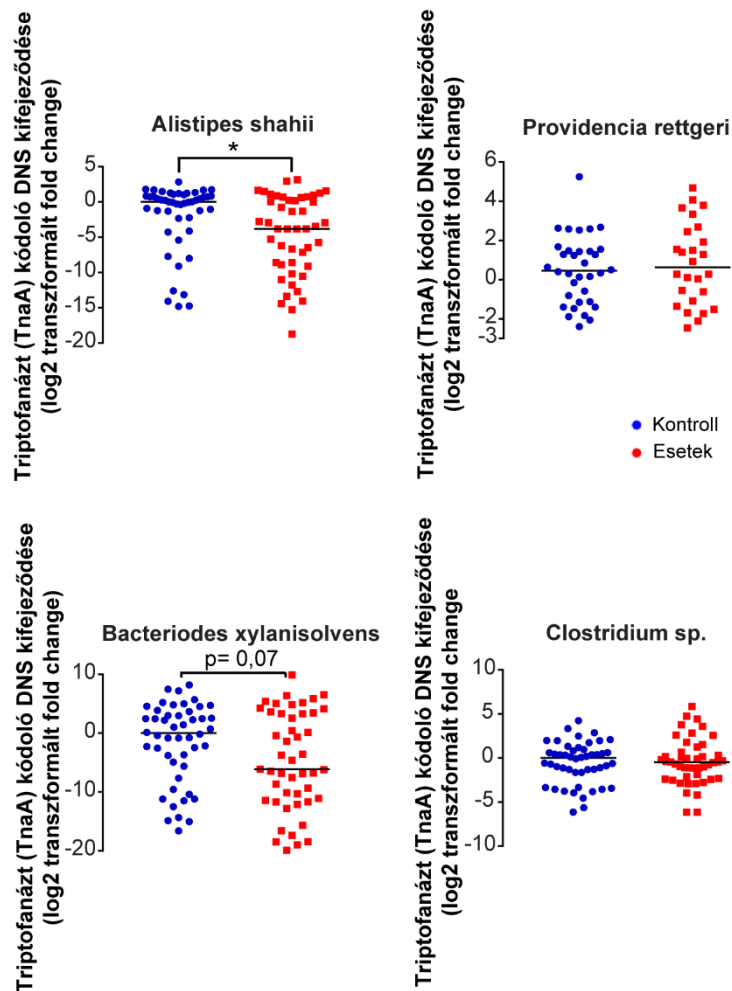
Rövidítések: PXR (Pregnán X-Receptor)

6.3.4. A bakteriális indol bioszintézis csökken a korai stádiumú emlődaganatokban

Az indol metabolitok bakteriális bioszintézise és az emlőtumoros megbetegedések közötti kapcsolat feltáráshoz vizsgáltuk a bél mikrobióta indol származék szintetizáló kapacitását. Ennek érdekében azonosítottuk a bakteriális TnaA operonját kódoló baktériumfajokat szabadon hozzáférhető adatbázisok segítségével. A baktériumok TnaA-t

kódoló régiójára primereket tervezve qPCR reakcióval meghatároztuk az enzimet kódoló DNS arányát humán székletmintákban.

Az emlőtumoros betegek mintáit az egészséges önkéntesekével (Betegcsoport 1.) összevetve, szignifikáns csökkenést figyeltünk meg az *Alistipes shahii* TnaA-t kódoló génjének mennyiségében, valamint hasonló trend volt jellemző a *Bacteroides xylanisolvens* esetében is (47. ábra).

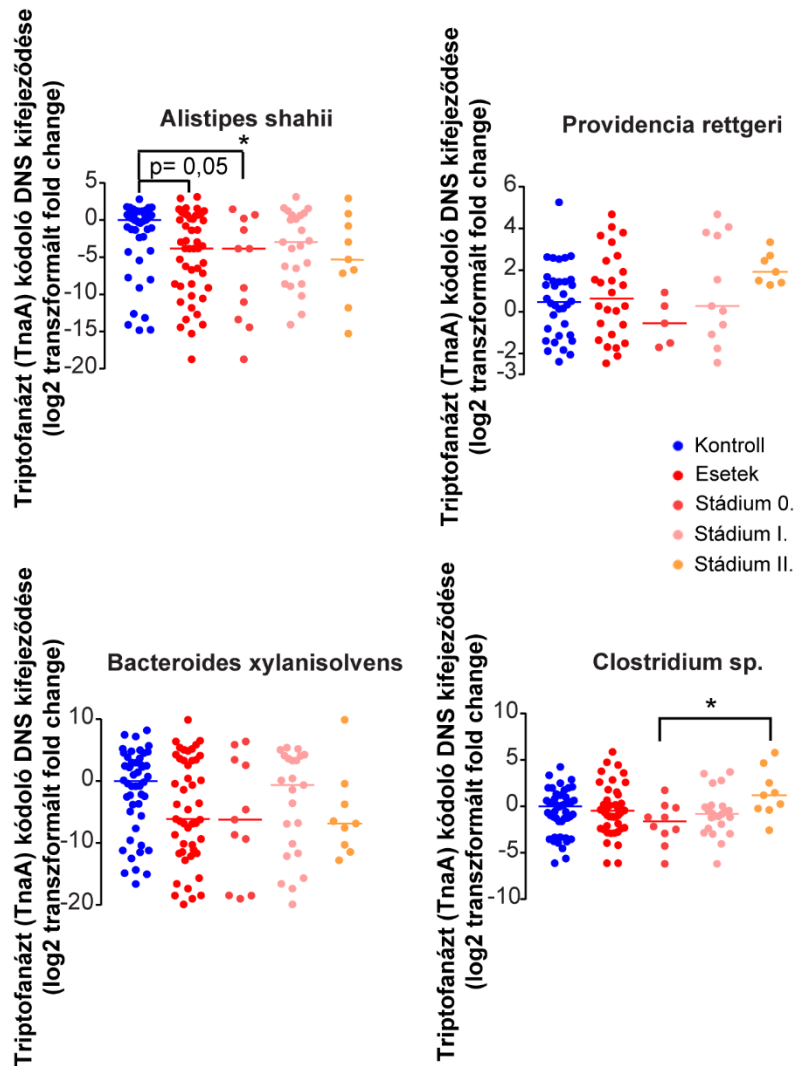


47. ábra A bakteriális TnaA székletminta expressziója összefüggést mutat emlődaganatos megbetegedésekkel

A bakteriális TnaA enzimet kódoló DNS mennyiségét 48 emlőtumoros betegből és 46 egészséges önkéntesből álló populáció (Betegcsoport 1.) széklet DNS mintáiban határoztuk meg. A *Providencia rettgeri* több esetben 45-nél alacsonyabb ct értékeket mutatott. A mediánértékeket vonallal jelöltük. Emlőtumoros betegeknek csökkent az *Alistipes shahii* és a *Bacteroides xylanisolvens* TnaA-t kódoló génjének mennyisége egészséges önkéntesekkel összehasonlítva. A statisztikai analízist párosítatlan kétszélű Student t-próbával végeztük. Az ábrán az adatok mediánértékét adtuk meg. *= p < 0,05

Rövidítések: Tna (triptofanáz)

Ezt követően a betegség stádiumával korreláltattuk a TnaA enzimet kódoló gén mennyiségét, mely során 0. klinikai stádiumú (*in situ* karcinóma) betegeknél tapasztaltuk a legkifejezettebb csökkenést, mind az *Alistipes shahii* és *Clostridium* sp. esetében. Hasonló trendet figyeltünk meg a *Providencia rettgeri* és a *Bacteroides xylanisolvens* baktériumfajok esetében is (48. ábra).



48. ábra *A* bakteriális indol bioszintézis csökkent a korai stádiumú emlődaganatokban

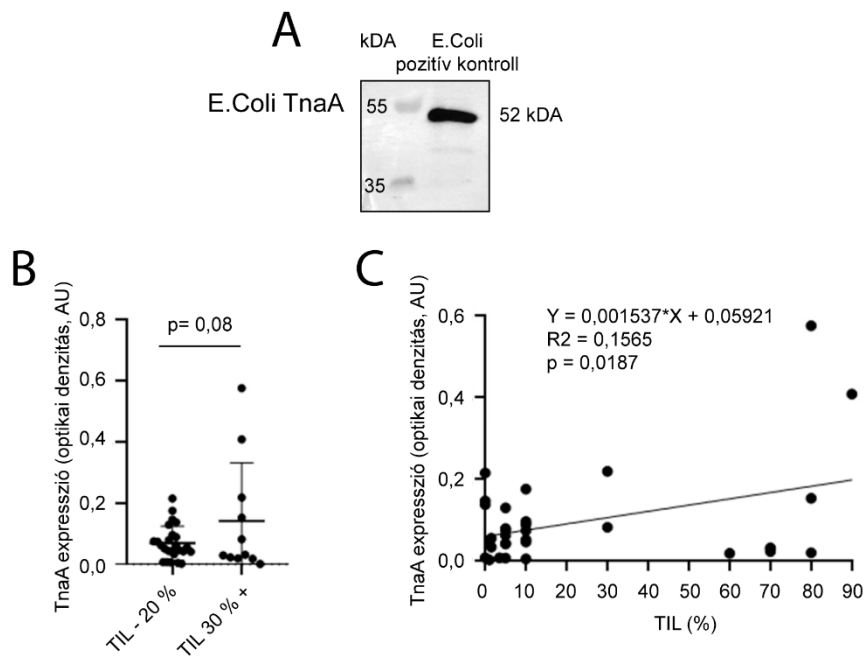
A humán széklet DNS mintákat 48 eltérő klinikai stádiumú emlődaganatos betegtől, valamint 46 egészséges önkéntestől gyűjtötte kollaborátorunk. A jelzett baktériumfajok TnaA-t kódoló DNS mennyiségét a széklet DNS mintákban qPCR reakcióval határoztuk meg. A *Providencia rettgeri* több esetben is 45-nél alacsonyabb ct értékeket mutatott. A mediánértékeket vonallal jelöltük. A TnaA-t kódoló gén mennyiségében trendszerű csökkenést figyeltünk meg, mely az *Alistipes shahii* és a *Clostridium* sp. esetében szignifikánsnak bizonyult, valamint a legkifejezettebb korai klinikai stádiumú betegeknél volt. A statisztikai szignifikanciát egyutas ANOVA teszttel számoltuk. A variancia-analízis során Dunnett post-hoc tesztet végeztünk. Az ábrán az adatok mediánját adtuk meg. *= $p < 0,05$

Rövidítések: Tna (triptofanáz)

6.3.5. Az *E. coli* TnaA székletfehérje expressziója korrelál a tumort infiltráló limfociták számával (Betegcsoport 3.)

Ismereteink bővítése céljából vizsgáltuk a bakteriális indol bioszintézis kulcsenzimének fehérje szintű változásait Western blot kísérletekben. Vizsgálatainkhoz kereskedelmi forgalomban kapható *E. coli* eredetű TnaA fehérjére specifikus antitestet használtuk (49A ábra).

Mellrákos betegpopuláció (Betegcsoport 3.) székletében meghatároztuk az *E. coli* TnaA expresszióját. A primer tumort infiltráló limfociták száma alapján csoportosítva a betegeket megállapítottuk, hogy magasabb TnaA expresszióval arányosan emelkedik a TIL aránya (49B ábra). Az eredményekkel összhangban összefüggést mutattunk ki az emlőtumoros betegek *E. coli* TnaA kifejeződése és a TIL között, lineáris regresszió végzésével (49C ábra).



49. ábra Az *E. coli* TnaA székletfehérje expressziója korrelál a tumort infiltráló limfociták arányával

(A) Az *E. coli* DH5 α sejtlyátumot SDS poliakrilamid gélen futtattuk, majd nitrocellulóz membránra blottoltuk és anti-TnaA antitesttel vizsgáltuk (reprezentatív ábra, n=3). (B-C) Meghatároztuk 36 alacsony tumor infiltráló limfocita aránnyal (TIL) jellemezhető páciens (0–20% TIL) és 11 magas TIL beteg (11% >TIL) székletmintáiban a TnaA székletfehérje mennyiségét Western blot segítségével. A fehérjetartalommal normalizált értékeket ábrázoltunk. A kiszóró értékeket Grubb teszttel állapítottuk meg, mely alapján az alacsony TIL csoportból 1 értéket kizártunk. (B) A normalizált TnaA expressziót ábrázoltuk. (C) Alacsony és magas TIL betegek TnaA kifejeződése közötti összefüggést lineáris regresszióval is megállapítottuk. A statisztikai szignifikanciát párosítatlan kétszélű Student t-próbával számoltuk. Az adatokat átlag \pm SEM formában adtuk meg.

Rövidítések: Tna (triptofanáz), TIL (tumort infiltráló limfocita)

7. Megbeszélés

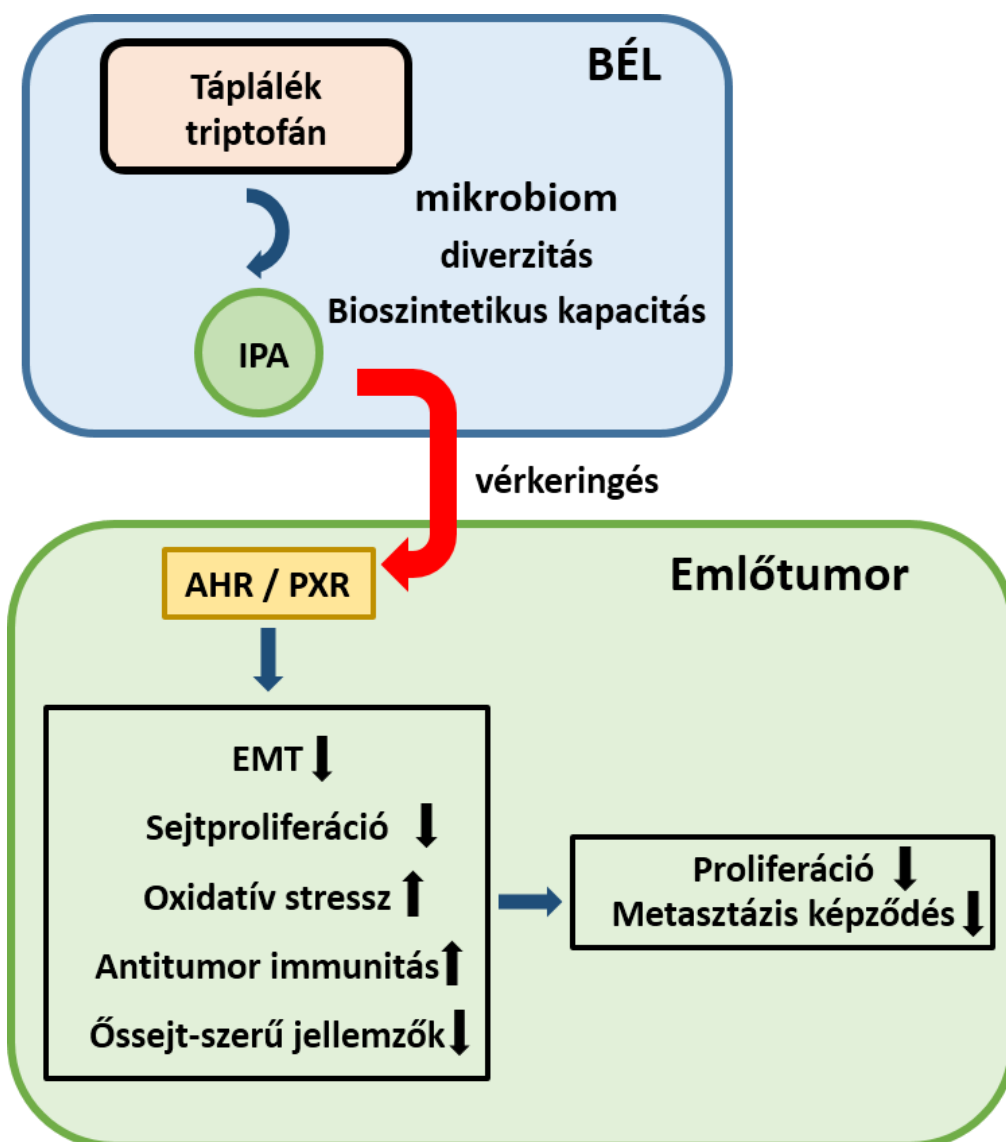
Irodalmi adatok alapján az emésztőrendszeri mikrobiom diszbiózisa patogén folyamatokat indukál, hozzájárulva neoplasztikus elváltozások kialakulásához. A mikrobiom összetételének megváltozása azonban nemcsak a rosszindulatú kórképek megjelenésénél figyelhető meg, hanem gyakran a tumor progressziójával súlyosbodhat, ezáltal az eubiotikus egyensúly fenntartása meghatározó szerepet játszik az emlőkarcinóma prevenciójában. Annak ellenére, hogy közvetlen ok-okozati összefüggések a mikrobiom és az emlődaganatok között, illetve az egzakt patomechanizmusok kevésbé ismertek, számos esetben mutattak ki korrelációt közöttük. Goedert és munkatársai a bakteriális közösség sokféleségének és diverzitásának csökkenéséről számoltak be emlőtumoros betegek és egészséges kontrollok széklet mikrobiom vizsgálatában [14]. Az emlő saját mikrobiomában szintén leírtak onkobiózist rosszindulatú emlődaganatokban [15, 16]. A legtöbb vizsgálat a mikrobiom csökkent fajgazdagságát mutatta ki emlőkarcinómában, ennek következtében a bioszintetikus kapacitás korlátozott mértékű [14, 20, 28, 47, 48], melyet feltehetően a bakteriális metabolitok limitált előállítására és hozzáférhetősége magyaráz. Egyes közleményekben a csökkent bioszintetikus kapacitást az ösztrogén receptor státusszal [19, 138], valamint a kedvezőtlen prognózist jelző TNBC esetekkel hozták összefüggésbe [47, 48, 58]. Több bakteriális metabolit, mint a rövid szénláncú zsírsavak, a litokólsav vagy a kadaverin esetében is mutattak ki citosztatikus hatást emlőkarcinómában [19, 20, 26, 27]. A mikrobiom és az emlőtumoros megbetegedések közötti funkcionális kapcsolatot alátámasztja az a megfigyelés, hogy a rendszeres antibiotikum expozíció csökkent bakteriális diverzitást eredményezhet, és növeli az emlőrák incidenciáját és kiújulásának kockázatát [61, 62, 285], míg a probiotikum expozíció prevenciós hatását írták le [66, 67]. Ezen eredmények megerősítik hipotézisünket a csökkent bakteriális fajgazdagság és az emlőrák előfordulása közötti összefüggésről.

7.1. Az indolpropánsav és az indoxil szulfát citosztatikus hatása emlődaganatban

A bioaktív indoltartalmú metabolitok számos molekuláris mechanizmuson keresztül, elsősorban az AHR és a PXR aktivációjával gyakorolhatnak hatást szervezetünk fiziológiai működésére. Kulcsfontosságú szerepet töltenek be elsősorban a bélcsatorna nyálkahártya homeosztázisának és barrier funkciójának fenntartásában, mucin termelést indukálva elősegítik a patogén invázióval szembeni ellenállást, továbbá az indol expozíció pro- és

antiinflammatorikus citokinek expressziójának szabályozásával befolyásolja a gasztrointesztinális immunitást [221, 248]. A bakteriális triptofán metabolitok csökkent mennyisége összefüggésben állhat gyulladásos bélbetegségek kialakulásával, ezzel összhangban az IPA fokozott bioszintézisének protektív hatását állapították meg colitis ulcerosás egérmodellben [252]. A triptofán metabolizmus változásai kapcsolatban állnak különféle neoplasztikus megbetegedésekkel, jelentősen csökkent szisztémás triptofán koncentrációt mértek hematológiai kórképekben, kolorektális-, petefészek-, bőr- és tüdődaganatos betegek szérumban. Ezzel ellentétes módon, más vizsgálatokban a triptofán metabolitok tumor-promótáló hatásait hangsúlyozzák, ugyanis a triptofán degradáló enzimek, az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) és a triptofán-2,3-dioxigenáz (TDO) fokozott expresszióját figyelték meg a humán tumorok 58%-ában, melyek hozzájárulhatnak a tumorsejtek migrációjához és metasztatizációjához [286]. Habár az indol származékok karcinogenezisben betöltött szerepéről szóló közlemények ellentmondóak, az IPA hatásait rosszindulatú emlődaganatokban napjainkig nem vizsgálták.

Értekezésemben arra kerestük a választ, hogy az IPA képes-e modulálni különböző emlőkarcinóma sejtek viselkedését. Az IPA-mediálta hatásokat sejtes és egérmodellben karakterizálva, az eredményeink azt mutatják, hogy az IPA antineoplasztikus tulajdonsággal bír a humán referencia tartományban adva. A referencia szérum koncentrációval megegyezően alkalmazott IPA szupplementáció egerekben csökkentette az emlőtumor sejtek invazivitását és a környező szövetekbe történő beszűrődését, ezáltal mérsékelve a kialakuló metasztázisok számát. Az IPA kezelés gátolta az emlőkarcinóma sejtek proliferációját és migrációját, ugyanakkor oxidatív stresszt idézett elő, daganatellenes immunválaszt és MET-et indukált, valamint megváltoztatta a tumorsejtek metabolikus aktivitását az AHR és a PXR jelátviteli útvonalakon keresztül. Hasonlóan egyéb antitumorális metabolitokhoz (pl. litokólsav és kadaverin) [19, 20], az IPA kezelés sem fejtett ki citosztatikus hatást a nem-transzformált fibroblaszt sejtekre (50. ábra).



50. ábra Az indolpropánsav által indukált hatások összefoglalása

Táplálék eredetű triptofánból az emésztőrendszeri mikrobiom által kifejezett triptofánáz (TnaA) enzim indolpropánsavat állít elő, mely a véráramon át eljutva, a gasztrointesztinális traktustól távol eső rákos sejtekre is hatást gyakorolhat. Az IPA kezelés AHR és PXR receptorokon keresztül befolyásolta az EMT-t, gátolta az sejtproliferációt, oxidatív stresszt és daganatellenes immunválaszt indukált, valamint csökkentette az emlőtumor sejtek őssejt-szerű jellemzőit, ezáltal megakadályozva a tumor progresszióját és metastázisok kialakulását.

Rövidítések: IPA (indolpropánsav), AHR (Aريل-Hidrokarbon Receptor), PXR (Pregnán X-Receptor), EMT (epiteliális-mezenchimális tranzíció)

A normál daganatellenes immunitás kialakulásához kulcsfontosságú a bakteriális közösség diverzitása [287, 288], továbbá egyes bakteriális metabolitok, köztük a triptofán származékok is hozzájárulhatnak az immunválasz moduláláshoz [221, 289]. A triptofán, illetve

a mikrobiális bontása során keletkező katabolitok hatásait AHR és PXR receptorok közvetítik [252, 253]. A triptofán szegény táplálkozás következtében csökkent indol előállítás AHR-függő módon immunsuppresszív hatású [257], mely jól korrelál az általunk megfigyelt emelkedett daganatellenes immunválasszal. Ennek megfelelően a primer tumort infiltráló limfociták száma egyenesen arányosan növekszik az IPA bioszintéziséért felelős TnaA expresszióval. Ugyanakkor fontos megjegyeznünk, hogy az immunrendszer triptofán (metabolit)-dependens szabályozása befolyásolhatja az emésztőrendszeri mikrobiom összetételét is [290].

Vizsgálataink arra utalnak, hogy az IPA kezelés oxidatív-nitrozatív stresszt indukált az emlőkarcinóma sejtekben az NRF2 expressziójának és aktivitásának csökkentésével, ami következményesen csökkenti az antioxidáns kapacitást (például csökkenti a kataláz enzim kifejeződését). Mindemellett fokozott iNOS expressziót és mitokondriális reaktív származékok felszabadulását figyeltük meg, mely eredmények korrelálnak a litokólsav esetében leírt hatásokkal [138]. A redox-egyensúly fenntartásában kulcsfontosságú szerepet játszik a pro- és antioxidánsok arányát szabályozó NRF2 és iNOS [24, 276]. Habár a fokozott oxidatív-nitrozatív stressz funkciója még tisztázatlan emlődaganatokban, legfrissebb tanulmányokban a prooxidánsok által indukált citosztatikus hatások jelentőségéről számoltak be [138, 148, 274, 275, 291]. Eredményeink arra utalnak, hogy az IPA-mediálta citosztázishoz létfontosságú a reaktív oxigén- és nitrogén származékok fokozott termelése. Továbbá az oxidatív stressz a tumor-iniciációjában és progressziójában kritikus jelentőségű daganatössejt jellemzők egyik legfontosabb szabályozója [282], ezáltal a prooxidánsok fokozott termelése elősegítheti az emlőtumor sejtek össejt-szerű tulajdonságainak elvesztését [292, 293]. Kísérleteink során az IPA kezelés csökkentette az emlőrák össejt arányát, míg hatását a tiol-reduktánsok jelenléte megakadályozta.

Az onkobiótikus transzformáció EMT-ben, valamint metasztázisok kialakulásában betöltött szabályozó funkcióját számos közleményben kifejtették [19-21, 25]. Tanulmányunkban az IPA több mikrobiális metabolittal megegyezően MET-et indukált [19, 20], mely lassítva a sejtek migrációját és invázióját csökkentette emlőtumor sejtekkel graftolt egérmodellben a metasztázisok számát.

Ezen eredmények mellett jelentős változást találtunk a mitokondriális biogenezist stimuláló enzimek kifejeződésében is. Az IPA kezelés hatására az AMPK, a FOXO1 és a PGC1 β transzkripciós faktorok AHR/PXR-függő módon indukálódtak. Az irodalmi adatokkal összhangban az energiaszenzor útvonal kulcsfontosságú enzimeinek aktiválása és fokozott expressziója az emlőrákos betegek hosszabb túlélésével társult [20, 203, 294].

Kutatásunk második részében karakterizáltuk az IPA-hoz hasonlóan citosztatikus tulajdonságokkal rendelkező, indoltartalmú bakteriális metabolit, az IS emlőtumor sejtekre gyakorolt hatásait. Az IS daganatellenes funkcióit az IPA-val megegyezően AHR és a PXR receptorok szabályozzák [218]. Vizsgálataink során azonban az AHR bizonyult dominánsabbnak, míg az IPA citosztatikus hatását mindkét receptor ekvivalens módon közvetítheti. Megfigyeltük, hogy az alacsonyabb AHR és PXR expresszió korrelál a kórkép előrehaladottabb stádiumával, grádusával, valamint a magasabb mitotikus aktivitással, mely háttérben az indol-mediált jelátvitel fokozatos elvesztése állhat.

Sejtes és állatmodellben az IS kezelés a referencia szérum koncentrációnak megfelelő tartományban csökkentette az proliferációs aktivitást, valamint mérsékelte az emlőtumor sejtek invázióját és a metasztázisok képződését, ugyanakkor nem befolyásolta a nem-transzformált sejtek proliferációját, mely hatások az emlődaganatokban citosztatikus tulajdonságú metabolitok közös jellemvonása [19, 20, 27, 138, 269, 281].

Egyéb bakteriális metabolitokhoz hasonlóan az IS tumorszuppresszív hatásának molekuláris mechanizmusa elsősorban az EMT reverzibilitásán alapszik [19-21, 25, 138]. Eredményeink azt mutatják, hogy az emlőtumor sejtek kevésbé invazív, epiteliális fenotípusának visszaállítása vagy az EMT gátlása lelassítja a sejtek migrációját, ezáltal gátolva a metasztázisok kialakulását. Az IS kezelés hatására az EMT-vel egyaránt csökkent a mezenchimális markerek (Vim, Fgfbpl, Tgfb3, MMP9, Snail és β -catenin) expressziója, míg az adherens sejtkapcsolatokban résztvevő E-cadherin és ZO-1 kifejeződésének emelkedését figyeltük meg, mely eredmények felvetik az EMT funkcionális szerepét az emlőtumor progressziójában.

Ezenkívül a fokozott iNOS expresszió, valamint az NRF2 csökkent aktivációja - hasonlóan a fentebb említett IPA-hoz - a redox-homeosztázis felborulását eredményezve oxidatív-nitrozatív stresszt indukált. A fokozott prooxidáns felszabadulás által kiváltott változások kulcsfontosságú szereppel bírnak az emlőkarcinóma sejtek citosztázisában [138, 274, 275, 291], valamint csökkentették az emlőrák őssejtek arányát [282, 292, 293], hozzájárulva az IS-indukált antitumor hatás kialakulásához. Mindemellett jelentős metabolikus változásokat detektáltunk IS kezelés során, melyek szintén elősegíthetik az emlődaganat őssejtek szuppresszióját és a tumorsejtek citosztázisát eredményezik [282, 283].

Megállapításainkat tágabb perspektívába helyezve, a triptofán- és az indol metabolizmus szoros összefüggést mutat az emlőrák kialakulásával és túlélésével, mely hozzájárul az emlődaganatos betegségek patomechanizmusáról alkotott képünk bővítéséhez

[295]. Eredményeinket összefoglalva feltételezzük, hogy az onkobiótikus transzformáció elsősorban az emlőrák progressziójában kulcsfontosságú, azonban a tumor-iniciációhoz nincs jelentős hozzájárulása.

7.2. Megfigyeléseink relevanciája humán emlőtumoros betegek vonatkozásában

A triptofán- és az indol metabolizmus szoros összefüggést mutat az emlőrák kialakulásával, valamint a túlélési rátával. Auslander és munkatársai a magas extracelluláris triptofán szintet kedvezőtlen túléléssel asszociálták emlőrákos betegek esetében [296]. Kimutatták, hogy az IS szint mind az ösztrogén receptor pozitív (ER+), mind a negatív (ER-) emlőrákos esetekben alulszabályozott [297], míg a proliferációs marker Ki67 pozitivitás az IS mennyiségével negatívan korrelált rosszindulatú emlődaganatokban [297]. Ezen metaanalízis adatok arra utalnak, hogy az indol származékok, köztük az IS elősegítik az emlőrákos betegek túlélését, valamint mennyiségük a betegség progressziójával csökken.

Az irodalmi adatokat alátámasztva eredményeink azt mutatják, hogy korai klinikai stádiumú emlőrákos betegekben a mikrobiom IPA bioszintetizáló kapacitása jelentősen csökkent. A legkifejezettebb változást *in situ* karcinómák esetében tapasztaltuk, megerősítve más bakteriális metabolitok, például a litokólsav és a kadaverin esetében megfigyelteket [19, 20]. Továbbá *in silico* vizsgálataink alapján, az ösztrogén szignalizáció befolyásolhatja az IPA és az IS által indukált antineoplasztikus hatásokat közvetítő jelátviteli útvonalak aktivitását. Az AHR és a PXR kifejeződése egyaránt csökkent ER+ emlőrákos betegekben, szemben a TNBC esetekkel. Hasonló trendet mutattunk ki az IS bioszintézist szabályozó humán enzimek kifejeződése során is. A Cyp2E1, a SULT1A1 és a SULT1A2 izoformák magasabb expressziója hosszabb túléléssel korrelált, mely protektív hatás a hormon receptor negatív emlődaganatos esetekben eltűnt, egyéb citosztatikus tulajdonságú metabolitokhoz hasonlóan [19, 20, 138]. Eredményeink jól korrelálnak az AHR és a PXR intratumorális expressziós mintázatával, illetve aktivitásával. A receptorok csökkent kifejeződését figyeltük meg nagy invazivitású, erősen proliferáló és differenciálatlan emlőtumorokban, valamint a betegség progressziójával párhuzamosan. Megfigyeléseink, illetve a rendelkezésre álló irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy az emésztőrendszeri mikrobiom diszbiózisa következtében a triptofán metabolizmus szuppresszálódik emlőrákos betegekben, mely elsősorban korai stádiumú, valamint *in situ* emlőkarcinómában a legkifejezettebb. Az IPA bioszintézis csökkenésével az emlőrák sejtek felszabadulnak a citosztatikus gátlás alól, így agresszívebb fenotípus alakulhat

ki. Az emlődaganat onkobiomot a citosztaticus tulajdonságú bakteriális metabolitok csökkent bioszintézise mellett, fokozott reaktív ösztrogén kapacitás és ösztrogén enterohepatikus cirkuláció jellemezi. Yager és munkatársai egér és patkány kísérletekben megfigyelték, hogy tartós ösztrogén, ösztron és ösztradiol expozíció fokozott emlőtumor sejtproliferációhoz vezet, míg az oxidatív metabolizmusok során keletkező katekol-kinon metabolitok karcinogén hatásúak, DNS-károsodást és mutagenezist váltanak ki [298]. A leírtakat összegezve úgy tűnik, hogy az onkobiotikus transzformáció meghatározó szerepet játszik az emlőrák progressziójában.

A fentebb említett tudományos eredmények rávilágítanak az onkobiom emlőrákban betöltött funkcionális szerepére, melyet egyaránt alátámasztanak humán populáció-alapú tanulmányok, antibiotikum expozícióra vonatkozó állatkísérletek, bakteriális metabolit szupplementáció megfigyelések, táplálkozási [299] és farmakológiai vizsgálatok [300]. Ezen tanulmányok citosztaticus hatású bakteriális metabolitok és onkobiom komponensek azonosításával új perspektívát nyitnak a rosszindulatú emlődaganatok terápiájában.

8. Összefoglalás

Az emberi test felszínén és a testüregekben számos baktériumfaj él a gazdaszervezettel dinamikus egységet képezve, melyek különböző bakteriális metabolitok bioszintézisén keresztül (például IPA és IS) befolyásolhatják a gazdaszervezet élettani folyamatait és egyes patológiás kórképek kialakulását. Külső és belső tényezők egyaránt (életkor, étrend, higiénia, genetikai faktorok, immunrendszer, antibiotikumok és xenobiotikumok szedése stb.) meghatározhatják a mikrobiális összetételt és működést. Az emésztőrendszeri mikrobiom diszbiózisa számos betegséggel, köztük a rosszindulatú emlődaganatok kialakulásával is összefüggést mutat.

A táplálék eredetű triptofánból több bakteriális metabolit képződhet. A bakteriális TnaA enzim segítségével IPA és IS keletkezhet, az utóbbi képződése a májban történő transzformációhoz kötött. A metabolitok az emberi test távoli szerveiben lévő daganatsejtekre is hatást fejthetnek ki, ahová a véráram útján jutnak el. Sejtes és egérmodellben is karakterizáltuk az IPA, valamint az IS által indukált hatásokat, s az eredményeink alapján ezen indoltartalmú bioaktív metabolitok antineoplasztikus tulajdonsággal rendelkeznek. A referencia szérum koncentrációnak megfelelő tartományban mind az IPA, illetve mind az IS kezelés csökkentette a primer emlőkarcinóma sejtek invazivitását, valamint infiltrációját a környező szövetekbe, ezáltal mérsékelve a képződő metasztázisok számát és tömegét. A primer tumorok szövettani elemzése során emelkedett limfocita arányt figyeltünk meg, mely a daganatellenes immunválasz indukálódására utal. Mindemellett az IPA, valamint az IS kezelés egyaránt csökkentette az emlőtumor sejtek proliferációs aktivitását és migrációját, ugyanakkor tumorsejt-specifitással jellemezhetőek, nem fejtettek ki hatást nem-transzformált humán fibroblaszt sejtekre. Mindkét bakteriális metabolitot fokozott iNOS expresszió, valamint csökkent NRF2 kifejeződés jellemez, ami a csökkent antioxidáns kapacitáson keresztül oxidatív-nitrozatív stresszt indukált. A redox-homeosztázis felborulása kulcsfontosságú szerepet játszik az emlőkarcinóma sejtek citosztázisában, valamint a daganatössejtek arányát csökkentve hozzájárul az antitumor hatás kialakulásához. Ezen eredményeket megerősítettük az IPA-indukált oxidatív hatások, valamint össejt-szerű jellemzők elvesztésének gátlásával tiol-reduktánsok jelenlétében is. Továbbá mind az IPA és mind az IS kezelés MET-et, valamint metabolikus változásokat indukálva hozzájárulhatnak a tumorszuppresszív hatások kifejeződéséhez.

Az indoltartalmú metabolitok hatásait AHR és PXR jelátviteli utak közvetítik. Az AHR és a PXR magasabb expressziója egyaránt hosszabb túléléssel korrelál emlőrákos betegeknél. Ezzel összhangban a receptorok csökkent kifejeződést mutatnak erősen proliferáló és differenciálatlan emlőtumorokban, ezáltal kedvezőtlen prognózist jelezve. Mindemellett az IS szintézisében résztvevő májenzimek (Cyp2E1, SULT1 és SULT2) fokozott expressziója jobb túlélési rátával asszociálható. Az indol metabolitok bakteriális bioszintézise és az emlőtumor közötti kapcsolat igazolásához meghatároztuk a bakteriális TnaA enzimet kódoló DNS mennyiségét humán emlőtumoros és egészséges egyének székletmintáiban. Eredményeink alapján a mikrobiom indol származékokat bioszintetizáló kapacitása jelentősen csökkent, mely változás korai stádiumú, valamint *in situ* emlőkarcinómában a legkifejezettebb.

9. Summary

Many bacterial species live on the surface and the in cavities of the human body in dynamic interaction with the host. The microbiome can influence the physiological processes of the host, as well as the progression of pathological diseases through the biosynthesis of various bacterial metabolites (among indolepropionic acid and indoxyl sulfate). Both external and internal factors (age, diet, hygiene, genetic factors, immune system, use of antibiotics and xenobiotics etc.) can determine the microbial composition and function. Dysbiosis of the gut microbiota is associated with a number of diseases, including breast tumors.

From dietary tryptophan indolepropionic acid (IPA) and indoxyl sulfate (IS) can be formed in a bacterial tryptophanase enzyme-dependent manner. These metabolites can reach tumor cells in distant organs of the human body through the bloodstream. The effects of IPA and IS were characterized by both cellular and mouse models. Based on our results, these indole-containing bioactive metabolites have antineoplastic properties. In concentrations corresponding to the human reference serum concentration, both IPA and IS supplementation reduced the level of infiltration to the surrounding tissues, thereby, decreased the number and total mass of metastases. Histological analysis of primary tumors showed an elevated ratio of lymphocytes, suggesting an induction of antitumor immune response. In addition, the IPA as well the IS treatment reduced the proliferative activity and migration of breast cancer cells, at the same time, they had no effect on non-transformed human fibroblast cells. We also observed increased oxidative and nitrosative stress due to the downregulation of NRF2 and increased expression of iNOS. The imbalance of redox homeostasis plays an important role in inducing cytostasis, as well as, contributes to reducing the proportion of cancer stem cells. Moreover, both IPA and IS treatment enhanced mesenchymal-epithelial transition (MET) and metabolic changes, resulting in tumor-suppressing effects.

The effects of indole metabolites are mediated by Aryl-Hydrocarbon Receptor (AHR) and Pregnane X-Receptor (PXR) signaling pathways. Based on the kmplot.com database analysis, our data showed that higher expression of both AHR and PXR correlated with significantly longer survival in breast cancer patients. In line with these observations, the receptors were characterized by decreased expression in highly proliferating and undifferentiated breast cancers, thus associated with poor prognosis. Furthermore, increased expression of liver enzymes (Cyp2E1, SULT1, and SULT2) involved in the synthesis of IS

correlates with better overall survival. To verify the connection between bacterial biosynthesis of indole metabolites and breast cancer, we assessed the abundance of bacterial tryptophanase DNA in human fecal samples. Our results showed, that the capacity of microbiome to biosynthesize indole derivatives was significantly decreased, that is more pronounced in early stage, *in situ* breast carcinoma.

10. Irodalomjegyzék

1. Lynch, S.V. and O. Pedersen, *The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease*. N Engl J Med, 2016. **375**(24): p. 2369-2379.
2. Oka, A. and R.B. Sartor, *Microbial-Based and Microbial-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Diseases*. Dig Dis Sci, 2020. **65**(3): p. 757-788.
3. Fulbright, L.E. and M. Ellermann, *The microbiome and the hallmarks of cancer*. 2017. **13**(9): p. e1006480.
4. Tang, W.H., T. Kitai, and S.L. Hazen, *Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease*. Circ Res, 2017. **120**(7): p. 1183-1196.
5. Fox, M., D.A. Knorr, and K.M. Haptonstall, *Alzheimer's disease and symbiotic microbiota: an evolutionary medicine perspective*. Ann N Y Acad Sci, 2019. **1449**(1): p. 3-24.
6. Garrett, W.S., *Cancer and the microbiota*. Science, 2015. **348**(6230): p. 80-6.
7. Yu, H., et al., *Urinary microbiota in patients with prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*. Arch Med Sci, 2015. **11**(2): p. 385-94.
8. Gui, Q.F., et al., *Well-balanced commensal microbiota contributes to anti-cancer response in a lung cancer mouse model*. Genet Mol Res, 2015. **14**(2): p. 5642-51.
9. Picardo, S.L., B. Coburn, and A.R. Hansen, *The microbiome and cancer for clinicians*. Crit Rev Oncol Hematol, 2019. **141**: p. 1-12.
10. Gong, H.L., et al., *The Composition of Microbiome in Larynx and the Throat Biodiversity between Laryngeal Squamous Cell Carcinoma Patients and Control Population*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66476.
11. Yu, Y., et al., *The role of the cutaneous microbiome in skin cancer: lessons learned from the gut*. J Drugs Dermatol, 2015. **14**(5): p. 461-5.
12. Chase, D., et al., *The vaginal and gastrointestinal microbiomes in gynecologic cancers: a review of applications in etiology, symptoms and treatment*. Gynecol Oncol, 2015. **138**(1): p. 190-200.
13. Flores, R., et al., *Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: a cross-sectional study*. J Transl Med., 2012. **10**: p. 253.
14. Goedert, J.J., et al., *Investigation of the association between the fecal microbiota and breast cancer in postmenopausal women: a population-based case-control pilot study*. J Natl Cancer Inst., 2015. **107**(8): p. djv147.
15. Hieken, T.J., et al., *The Microbiome of Aseptically Collected Human Breast Tissue in Benign and Malignant Disease*. Sci Rep., 2016. **6**: p. 30751.
16. Urbaniak, C., et al., *The Microbiota of Breast Tissue and Its Association with Breast Cancer*. Appl Environ Microbiol, 2016. **82**(16): p. 5039-48.
17. Biernat, K.A., et al., *Structure, function, and inhibition of drug reactivating human gut microbial β -glucuronidases*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 825.
18. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
19. Kovács, T., et al., *Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 1300.
20. Miko, E., et al., *Lithocholic acid, a bacterial metabolite reduces breast cancer cell proliferation and aggressiveness*. Biochim Biophys Acta, 2018. **1859**(9): p. 958-974.
21. Vergara, D., et al., *The Cancer Microbiota: EMT and Inflammation as Shared Molecular Mechanisms Associated with Plasticity and Progression*. J Oncol., 2019: p. doi: 10.1155/2019/1253727.

22. Buchta Rosean, C., et al., *Preexisting Commensal Dysbiosis Is a Host-Intrinsic Regulator of Tissue Inflammation and Tumor Cell Dissemination in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer*. *Cancer Res.*, 2019. **79**(14): p. 3662-3675.
23. Kiss, B., et al., *Oncobiosis and Microbial Metabolite Signaling in Pancreatic Adenocarcinoma*. 2020. **12**(5).
24. Smolková, K., et al., *NRF2 in regulating cancer metabolism*. *Antioxid Redox Signal*, 2020: p. in press.
25. Ingman, W.V., *The Gut Microbiome: A New Player in Breast Cancer Metastasis*. *Cancer Res.*, 2019. **79**(14): p. 3539-3541.
26. Miko, E., et al., *Microbiome-Microbial Metabolome-Cancer Cell Interactions in Breast Cancer-Familiar, but Unexplored*. *Cells.*, 2019. **8**(4). p. E293.
27. Tang, W., et al., *Liver- and Microbiome-derived Bile Acids Accumulate in Human Breast Tumors and Inhibit Growth and Improve Patient Survival*. *Clin Cancer Res*, 2019. **11**: p. 1078-0432.
28. Goedert, J.J., et al., *Postmenopausal breast cancer and oestrogen associations with the IgA-coated and IgA-noncoated faecal microbiota*. *Br J Cancer*, 2018. **23**(10): p. 435.
29. *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. *Nature*, 2012. **486**(7402): p. 207-14.
30. Cong, J. and X. Zhang, *How human microbiome talks to health and disease*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018. **37**(9): p. 1595-1601.
31. Martín, R., et al., *The role of metagenomics in understanding the human microbiome in health and disease*. *Virulence*, 2014. **5**(3): p. 413-23.
32. Li, J. and H. Jia, *An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome*. 2014. **32**(8): p. 834-41.
33. Rea, D., et al., *Microbiota effects on cancer: from risks to therapies*. *Oncotarget*, 2018. **9**(25): p. 17915-17927.
34. Rinninella, E., P. Raoul, and M. Cintoni, *What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases*. 2019. **7**(1).
35. Hagymási, K., et al., *[The role of gut microbiota in chronic liver diseases, and treatment possibilities]*. *Orv Hetil*, 2018. **159**(36): p. 1465-1474.
36. O'Hara, A.M. and F. Shanahan, *The gut flora as a forgotten organ*. *EMBO Rep*, 2006. **7**(7): p. 688-93.
37. Helmkink, B.A., et al., *The microbiome, cancer, and cancer therapy*. *Nat Med*, 2019. **25**(3): p. 377-388.
38. Schwabe, R.F. and C. Jobin, *The microbiome and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2013. **13**(11): p. 800-12.
39. Contreras, A.V., et al., *Host-Microbiome Interaction and Cancer: Potential Application in Precision Medicine*. *Front Physiol*, 2016. **7**: p. 606.
40. Bultman, S.J., *Emerging roles of the microbiome in cancer*. *Carcinogenesis*, 2014. **35**(2): p. 249-55.
41. Goodman, B. and H. Gardner, *The microbiome and cancer*. *J Pathol*, 2018. **244**(5): p. 667-676.
42. Urbaniak, C., et al., *Microbiota of human breast tissue*. *Appl Environ Microbiol.*, 2014. **80**(10): p. 3007-14.
43. Iida, N., et al., *Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment*. *Science*, 2013. **342**(6161): p. 967-70.
44. Fox, J.G. and T.C. Wang, *Inflammation, atrophy, and gastric cancer*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 60-9.

45. Ye, W., et al., *Helicobacter pylori* infection and gastric atrophy: risk of adenocarcinoma and squamous-cell carcinoma of the esophagus and adenocarcinoma of the gastric cardia. *J Natl Cancer Inst*, 2004. **96**(5): p. 388-96.
46. Caygill, C.P., et al., *Cancer mortality in chronic typhoid and paratyphoid carriers*. *Lancet*, 1994. **343**(8889): p. 83-4.
47. Banerjee, S., et al., *Distinct Microbial Signatures Associated With Different Breast Cancer Types*. *Front Microbiol.*, 2018. **9**: p. 951.
48. Banerjee, S., et al., *Distinct microbiological signatures associated with triple negative breast cancer*. *Sci Rep.*, 2015. **5**: p. 15162.
49. Fruge, A.D., et al., *Fecal Akkermansia muciniphila Is Associated with Body Composition and Microbiota Diversity in Overweight and Obese Women with Breast Cancer Participating in a Presurgical Weight Loss Trial*. *J Acad Nutr Diet*, 2018. **9**(18): p. 164.
50. Fuhrman, B.J., et al., *Associations of the fecal microbiome with urinary estrogens and estrogen metabolites in postmenopausal women*. *J Clin Endocrinol Metab.*, 2014. **99**(12): p. 4632-40.
51. Kwa, M., et al., *The Intestinal Microbiome and Estrogen Receptor-Positive Female Breast Cancer*. *J Natl Cancer Inst.*, 2016. **108**(8). p. djw029.
52. Meng, S., et al., *Study of Microbiomes in Aseptically Collected Samples of Human Breast Tissue Using Needle Biopsy and the Potential Role of in situ Tissue Microbiomes for Promoting Malignancy*. *Front Oncol.*, 2018. **8**: p. 318.
53. Wang, H., et al., *Breast tissue, oral and urinary microbiomes in breast cancer*. *Oncotarget.*, 2017. **8**(50): p. 88122-88138.
54. Dewhirst, F.E., et al., *The human oral microbiome*. *J Bacteriol*, 2010. **192**(19): p. 5002-17.
55. Neugent, M.L., et al., *Advances in Understanding the Human Urinary Microbiome and Its Potential Role in Urinary Tract Infection*. 2020. **11**(2).
56. Xuan, C., et al., *Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer*. *PLoS One.*, 2014. **9**(1): p. e83744. .
57. Fernandez, M.F., et al., *Breast Cancer and Its Relationship with the Microbiota*. *Int J Environ Res Public Health.*, 2018: p. doi: 10.3390/ijerph15081747.
58. Smith, A., et al., *Distinct microbial communities that differ by race, stage, or breast-tumor subtype in breast tissues of non-Hispanic Black and non-Hispanic White women*. *Sci Rep.*, 2019. **9**(1): p. 11940.
59. Luu, T.H., et al., *Intestinal Proportion of Blautia sp. is Associated with Clinical Stage and Histoprognostic Grade in Patients with Early-Stage Breast Cancer*. *Nutr Cancer.*, 2017. **69**(2): p. 267-275.
60. Zhu, J., et al., *Breast cancer in postmenopausal women is associated with an altered gut metagenome*. *Microbiome.*, 2018. **6**(1): p. 136.
61. Kirkup, B., et al., *Perturbation of the gut microbiota by antibiotics results in accelerated breast tumour growth and metabolic dysregulation*. *BioRxiv*, 2019: p. <https://doi.org/10.1101/553602>
62. Tamim, H.M., et al., *Risk of breast cancer in relation to antibiotic use*. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.*, 2008. **17**(2): p. 144-50.
63. Velicer, C.M., et al., *Antibiotic use in relation to the risk of breast cancer*. *JAMA.*, 2004. **291**(7): p. 827-35.
64. Elkrief, A., et al., *The negative impact of antibiotics on outcomes in cancer patients treated with immunotherapy: a new independent prognostic factor?* *Ann Oncol.*, 2019. **30**(10): p. 1572-1579.

65. Wirtz, H.S., et al., *Frequent antibiotic use and second breast cancer events*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 2013. **22**(9): p. 1588-99. .
66. Hassan, Z., et al., *Anti-breast cancer effects of live, heat-killed and cytoplasmic fractions of Enterococcus faecalis and Staphylococcus hominis isolated from human breast milk*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, 2016. **52**(3): p. 337-348.
67. Mendoza, L., *Potential effect of probiotics in the treatment of breast cancer*. *Oncol Rev.*, 2019. **13**(2): p. 422.
68. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. *Cell*, 2011. **144**(5): p. 646-74.
69. Yang, J., et al., *Gastrointestinal microbiome and breast cancer: correlations, mechanisms and potential clinical implications*. *Breast Cancer*, 2017. **24**(2): p. 220-228.
70. <https://onkol.hu/nemzeti-rakregiszter/>. 2020; Available from: <https://onkol.hu/nemzeti-rakregiszter/>.
71. DeSantis, C.E. and J. Ma, *Breast cancer statistics, 2019*. 2019. **69**(6): p. 438-451.
72. Senkus, E., et al., *Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. *Ann Oncol*, 2015. **26 Suppl 5**: p. v8-30.
73. Guo, R. and Y. Chen, *The Function and Mechanism of Lipid Molecules and Their Roles in The Diagnosis and Prognosis of Breast Cancer*. 2020. **25**(20).
74. Paci, E., et al., *European breast cancer service screening outcomes: a first balance sheet of the benefits and harms*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014. **23**(7): p. 1159-63.
75. https://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics. 2020; Available from: https://www.breastcancer.org/symptoms/understand_bc/statistics.
76. Baade, P., *Geographical Variation in Breast Cancer Outcomes*. *Int J Environ Res Public Health*, 2017. **14**(5).
77. Bleyer, A. and H.G. Welch, *Effect of three decades of screening mammography on breast-cancer incidence*. *N Engl J Med*, 2012. **367**(21): p. 1998-2005.
78. <https://gco.iarc.fr/>. 2020; Available from: <https://gco.iarc.fr/>.
79. <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer/risk-factors>. 2020; Available from: <https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/statistics-by-cancer-type/breast-cancer/risk-factors>.
80. Sun, Y.S., et al., *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer*. *Int J Biol Sci*, 2017. **13**(11): p. 1387-1397.
81. Minicozzi, P., et al., *Comorbidities, age and period of diagnosis influence treatment and outcomes in early breast cancer*. 2019. **144**(9): p. 2118-2127.
82. Oh, H., et al., *Breast cancer risk factors in relation to estrogen receptor, progesterone receptor, insulin-like growth factor-1 receptor, and Ki67 expression in normal breast tissue*. *NPJ Breast Cancer*, 2017. **3**: p. 39.
83. Tan, P.H. and I. Ellis, *The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast*. 2020. **77**(2): p. 181-185.
84. Ehemann, C.R., et al., *The changing incidence of in situ and invasive ductal and lobular breast carcinomas: United States, 1999-2004*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2009. **18**(6): p. 1763-9.
85. Trent, I.J., 2nd, R.S. Benjamin, and V. Valero, *Primary soft tissue sarcoma of the breast*. *Curr Treat Options Oncol*, 2001. **2**(2): p. 169-76.
86. Esebua, M., *Cell and Molecular Biology of Breast Cancer*, ed. HeideSchatten. 2013.
87. O'Sullivan, B., et al., *The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations*. *Lancet Oncol*, 2017. **18**(7): p. 849-851.
88. Cserni, G., et al., *The new TNM-based staging of breast cancer*. *Virchows Arch*, 2018. **472**(5): p. 697-703.

89. Madaras, L., et al., *Clinicopathological features and prognosis of pregnancy associated breast cancer - a matched case control study*. *Pathol Oncol Res*, 2014. **20**(3): p. 581-90.
90. Sotiriou, C. and L. Pusztai, *Gene-expression signatures in breast cancer*. *N Engl J Med*, 2009. **360**(8): p. 790-800.
91. Sinn, H.P. and H. Kreipe, *A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition*. *Breast Care (Basel)*, 2013. **8**(2): p. 149-54.
92. Arneth, B., *Tumor Microenvironment*. *Medicina (Kaunas)*, 2019. **56**(1).
93. Park, C.C., M.J. Bissell, and M.H. Barcellos-Hoff, *The influence of the microenvironment on the malignant phenotype*. *Mol Med Today*, 2000. **6**(8): p. 324-9.
94. Elkhattouti, A., M. Hassan, and C.R. Gomez, *Stromal Fibroblast in Age-Related Cancer: Role in Tumorigenesis and Potential as Novel Therapeutic Target*. *Front Oncol*, 2015. **5**: p. 158.
95. Koontongkaew, S., *The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas*. *J Cancer*, 2013. **4**(1): p. 66-83.
96. Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, *The tumor microenvironment at a glance*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 23): p. 5591-6.
97. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. *Nat Med*, 1997. **3**(7): p. 730-7.
98. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. *Nature*, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
99. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
100. Clevers, H., *The cancer stem cell: premises, promises and challenges*. *Nat Med*, 2011. **17**(3): p. 313-9.
101. Sato, R., et al., *Concise Review: Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Targets*. *Stem Cells*, 2016. **34**(8): p. 1997-2007.
102. Allen, M. and J. Louise Jones, *Jekyll and Hyde: the role of the microenvironment on the progression of cancer*. *J Pathol*, 2011. **223**(2): p. 162-76.
103. Tao, L., et al., *Cancer associated fibroblasts: An essential role in the tumor microenvironment*. *Oncol Lett*, 2017. **14**(3): p. 2611-2620.
104. Fu, Y., et al., *The reverse Warburg effect is likely to be an Achilles' heel of cancer that can be exploited for cancer therapy*. *Oncotarget*, 2017. **8**(34): p. 57813-57825.
105. Orimo, A., et al., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. *Cell*, 2005. **121**(3): p. 335-48.
106. Bussard, K.M., et al., *Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment*. *Breast Cancer Res*, 2016. **18**(1): p. 84.
107. Baghban, R., et al., *Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance*. *Cell Commun Signal*, 2020. **18**(1): p. 59.
108. Kloc, M., et al., *Pericytes, microvascular dysfunction, and chronic rejection*. *Transplantation*, 2015. **99**(4): p. 658-67.
109. Baluk, P., et al., *Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(5): p. 1801-15.
110. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal-redux*. *Cancer Immunol Res*, 2015. **3**(1): p. 1-11.

111. Murdoch, C., et al., *The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis*. Nat Rev Cancer, 2008. **8**(8): p. 618-31.
112. Uribe-Querol, E. and C. Rosales, *Neutrophils in Cancer: Two Sides of the Same Coin*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 983698.
113. Yuen, G.J., E. Demissie, and S. Pillai, *B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship*. Trends Cancer, 2016. **2**(12): p. 747-757.
114. Gao, G., et al., *Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis*. BMC Cancer, 2020. **20**(1): p. 179.
115. Santarpia, L., S.M. Lippman, and A.K. El-Naggar, *Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy*. Expert Opin Ther Targets, 2012. **16**(1): p. 103-19.
116. Yuan, T.L. and L.C. Cantley, *PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme*. Oncogene, 2008. **27**(41): p. 5497-510.
117. Pópulo, H., J.M. Lopes, and P. Soares, *The mTOR signalling pathway in human cancer*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(2): p. 1886-918.
118. Gomez-Pinillos, A. and A.C. Ferrari, *mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in cancer therapy*. Hematol Oncol Clin North Am, 2012. **26**(3): p. 483-505, vii.
119. Kandoth, C., et al., *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types*. Nature, 2013. **502**(7471): p. 333-339.
120. Kohno, T. and J. Yokota, *How many tumor suppressor genes are involved in human lung carcinogenesis?* Carcinogenesis, 1999. **20**(8): p. 1403-10.
121. Amin, A., et al., *Evasion of anti-growth signaling: A key step in tumorigenesis and potential target for treatment and prophylaxis by natural compounds*. Semin Cancer Biol, 2015. **35** Suppl: p. S55-s77.
122. Sharma, A., L.H. Boise, and M. Shanmugam, *Cancer Metabolism and the Evasion of Apoptotic Cell Death*. 2019. **11**(8).
123. Fernald, K. and M. Kurokawa, *Evading apoptosis in cancer*. Trends Cell Biol, 2013. **23**(12): p. 620-33.
124. Jafri, M.A., et al., *Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies*. Genome Med, 2016. **8**(1): p. 69.
125. Pezzella, F., et al., *Blood vessels and cancer much more than just angiogenesis*. Cell Death Discov, 2015. **1**: p. 15064.
126. Saman, H., S.S. Raza, and S. Uddin, *Inducing Angiogenesis, a Key Step in Cancer Vascularization, and Treatment Approaches*. 2020. **12**(5).
127. Fares, J., et al., *Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited*. Signal Transduct Target Ther, 2020. **5**(1): p. 28.
128. Berx, G. and F. van Roy, *Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009. **1**(6): p. a003129.
129. Cavallaro, U. and G. Christofori, *Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 118-32.
130. Negrini, S., V.G. Gorgoulis, and T.D. Halazonetis, *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(3): p. 220-8.
131. Lee, J.K., et al., *Mechanisms and Consequences of Cancer Genome Instability: Lessons from Genome Sequencing Studies*. Annu Rev Pathol, 2016. **11**: p. 283-312.
132. Suarez-Carmona, M., et al., *EMT and inflammation: inseparable actors of cancer progression*. Mol Oncol, 2017. **11**(7): p. 805-823.
133. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* Trends Biochem Sci, 2016. **41**(3): p. 211-218.

134. Vinay, D.S., et al., *Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies*. *Semin Cancer Biol*, 2015. **35 Suppl**: p. S185-s198.
135. Cruz, A.L.S. and E.A. Barreto, *Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks*. 2020. **11**(2): p. 105.
136. Garrido, P., et al., *Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways*. *Oncotarget*, 2017. **8**(46): p. 80568-80588.
137. Gill, J.G., E. Piskounova, and S.J. Morrison, *Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2016. **81**: p. 163-175.
138. Kovács, P., et al., *Lithocholic acid, a metabolite of the microbiome, increases oxidative stress in breast cancer*. *Cancers (Basel)*, 2019: p. doi: 10.3390/cancers11091255.
139. Reuter, S., et al., *Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?* *Free Radic Biol Med*, 2010. **49**(11): p. 1603-16.
140. Halliwell, B., *Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease*. *Am J Med*, 1991. **91**(3c): p. 14s-22s.
141. Squadrito, G.L. and W.A. Pryor, *Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide*. *Free Radic Biol Med*, 1998. **25**(4-5): p. 392-403.
142. Birben, E., et al., *Oxidative stress and antioxidant defense*. *World Allergy Organ J*, 2012. **5**(1): p. 9-19.
143. Liguori, I., et al., *Oxidative stress, aging, and diseases*. *Clin Interv Aging*, 2018. **13**: p. 757-772.
144. Peng, C., et al., *Biology of ageing and role of dietary antioxidants*. 2014. **2014**: p. 831841.
145. Redza-Dutordoir, M. and D.A. Averill-Bates, *Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species*. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1863**(12): p. 2977-2992.
146. Zou, D., et al., *Reactive oxygen and nitrogen species induce cell apoptosis via a mitochondria-dependent pathway in hyperoxia lung injury*. 2019. **120**(4): p. 4837-4850.
147. Jezierska-Drutel, A., S.A. Rosenzweig, and C.A. Neumann, *Role of oxidative stress and the microenvironment in breast cancer development and progression*. *Adv Cancer Res*, 2013. **119**: p. 107-25.
148. Bekele, R.T., et al., *Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: implications for tamoxifen therapy and resistance*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 21164.
149. Das, J., A. Sarkar, and P.C. Sil, *Hexavalent chromium induces apoptosis in human liver (HepG2) cells via redox imbalance*. *Toxicol Rep*, 2015. **2**: p. 600-608.
150. Malhotra, D., et al., *Global mapping of binding sites for Nrf2 identifies novel targets in cell survival response through ChIP-Seq profiling and network analysis*. *Nucleic Acids Res*, 2010. **38**(17): p. 5718-34.
151. Suzuki, T., H. Motohashi, and M. Yamamoto, *Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway*. *Trends Pharmacol Sci*, 2013. **34**(6): p. 340-6.
152. Kobayashi, A., et al., *Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(16): p. 7130-9.
153. Zhang, D.D., et al., *Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(24): p. 10941-53.
154. Magesh, S., Y. Chen, and L. Hu, *Small molecule modulators of Keap1-Nrf2-ARE pathway as potential preventive and therapeutic agents*. *Med Res Rev*, 2012. **32**(4): p. 687-726.

155. Fuse, Y. and M. Kobayashi, *Conservation of the Keap1-Nrf2 System: An Evolutionary Journey through Stressful Space and Time*. *Molecules*, 2017. **22**(3).
156. Bao, L., et al., *ABCF2, an Nrf2 target gene, contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells*. 2017. **56**(6): p. 1543-1553.
157. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. *Cell*, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
158. Witsch, E., M. Sela, and Y. Yarden, *Roles for growth factors in cancer progression*. *Physiology (Bethesda)*, 2010. **25**(2): p. 85-101.
159. Nickerson, N.K., et al., *Autocrine-derived epidermal growth factor receptor ligands contribute to recruitment of tumor-associated macrophage and growth of basal breast cancer cells in vivo*. *Oncol Res*, 2013. **20**(7): p. 303-17.
160. Lindsey, S. and S.A. Langhans, *Epidermal growth factor signaling in transformed cells*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2015. **314**: p. 1-41.
161. Appert-Collin, A., et al., *Role of ErbB Receptors in Cancer Cell Migration and Invasion*. *Front Pharmacol*, 2015. **6**: p. 283.
162. Trachootham, D., J. Alexandre, and P. Huang, *Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?* *Nat Rev Drug Discov*, 2009. **8**(7): p. 579-91.
163. Wang, J., et al., *Inhibition of cancer growth in vitro and in vivo by a novel ROS-modulating agent with ability to eliminate stem-like cancer cells*. *Cell Death Dis*, 2017. **8**(6): p. e2887.
164. Kalluri, R. and R.A. Weinberg, *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1420-8.
165. Kalluri, R. and E.G. Neilson, *Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis*. *J Clin Invest*, 2003. **112**(12): p. 1776-84.
166. Smith, A., T.N. Teknos, and Q. Pan, *Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma*. *Oral Oncol*, 2013. **49**(4): p. 287-92.
167. Matysiak, M., et al., *EMT promoting transcription factors as prognostic markers in human breast cancer*. *Arch Gynecol Obstet*, 2017. **295**(4): p. 817-825.
168. Lamouille, S., J. Xu, and R. Derynck, *Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(3): p. 178-96.
169. Hazan, R.B., et al., *N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma*. *Cell Adhes Commun*, 1997. **4**(6): p. 399-411.
170. Dongre, A. and R.A. Weinberg, *New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019. **20**(2): p. 69-84.
171. Zeisberg, M. and E.G. Neilson, *Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions*. *J Clin Invest*, 2009. **119**(6): p. 1429-37.
172. Brabletz, T., et al., *Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(18): p. 10356-61.
173. Lee, J.M., et al., *The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease*. *J Cell Biol*, 2006. **172**(7): p. 973-81.
174. Gunasinghe, N.P., et al., *Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer*. *Cancer Metastasis Rev*, 2012. **31**(3-4): p. 469-78.
175. Thiery, J.P., *Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(6): p. 442-54.
176. Wang, Y. and B.P. Zhou, *Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis*. *Chin J Cancer*, 2011. **30**(9): p. 603-11.

177. Casalino, L. and P. Verde, *Multifaceted Roles of DNA Methylation in Neoplastic Transformation, from Tumor Suppressors to EMT and Metastasis*. Genes (Basel), 2020. **11**(8).
178. Chen, C.L., et al., *E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours*. Eur J Cancer, 2003. **39**(4): p. 517-23.
179. Radisky, E.S. and D.C. Radisky, *Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2010. **15**(2): p. 201-12.
180. Zhang, J. and L. Ma, *MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2012. **31**(3-4): p. 653-62.
181. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-15.
182. Wang, S.S., et al., *Links between cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition*. Onco Targets Ther, 2015. **8**: p. 2973-80.
183. Mateescu, B., et al., *miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response*. Nat Med, 2011. **17**(12): p. 1627-35.
184. Škovierová, H., et al., *Molecular regulation of epithelial-to-mesenchymal transition in tumorigenesis (Review)*. Int J Mol Med, 2018. **41**(3): p. 1187-1200.
185. Stemmler, M.P., et al., *Non-redundant functions of EMT transcription factors*. Nat Cell Biol, 2019. **21**(1): p. 102-112.
186. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *MicroRNAs: Crucial multi-tasking components in the complex circuitry of tumor metastasis*. Cell Cycle, 2009. **8**(21): p. 3506-12.
187. Lim, S., et al., *Immunoregulatory Protein B7-H3 Reprograms Glucose Metabolism in Cancer Cells by ROS-Mediated Stabilization of HIF1 α* . Cancer Res, 2016. **76**(8): p. 2231-42.
188. Migneco, G., et al., *Glycolytic cancer associated fibroblasts promote breast cancer tumor growth, without a measurable increase in angiogenesis: evidence for stromal-epithelial metabolic coupling*. Cell Cycle, 2010. **9**(12): p. 2412-22.
189. Huang, R. and X. Zong, *Aberrant cancer metabolism in epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis: Mechanisms in cancer progression*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. **115**: p. 13-22.
190. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY*. J Gen Physiol, 1927. **8**(6): p. 519-30.
191. Cha, Y.J., E.S. Kim, and J.S. Koo, *Amino Acid Transporters and Glutamine Metabolism in Breast Cancer*. 2018. **19**(3).
192. Blücher, C. and S.C. Stadler, *Obesity and Breast Cancer: Current Insights on the Role of Fatty Acids and Lipid Metabolism in Promoting Breast Cancer Growth and Progression*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 293.
193. Du, T., et al., *Invasive lobular and ductal breast carcinoma differ in immune response, protein translation efficiency and metabolism*. 2018. **8**(1): p. 7205.
194. Kulkoyluoglu-Cotul, E., A. Arca, and Z. Madak-Erdogan, *Crosstalk between Estrogen Signaling and Breast Cancer Metabolism*. Trends Endocrinol Metab, 2019. **30**(1): p. 25-38.
195. El Ansari, R., et al., *Altered glutamine metabolism in breast cancer; subtype dependencies and alternative adaptations*. Histopathology, 2018. **72**(2): p. 183-190.
196. Chen, C.C., et al., *FoxOs inhibit mTORC1 and activate Akt by inducing the expression of Sestrin3 and Rictor*. Dev Cell, 2010. **18**(4): p. 592-604.
197. Hadad, S.M., et al., *Histological evaluation of AMPK signalling in primary breast cancer*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 307.

198. Song, X., et al., *Molecular Characterization of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-Gamma Coactivator-1 α (PGC1 α) and Its Role in Mitochondrial Biogenesis in Blunt Snout Bream (Megalobrama amblycephala)*. *Front Physiol*, 2018. **9**: p. 1957.
199. Hay, N., *Interplay between FOXO, TOR, and Akt*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1813**(11): p. 1965-70.
200. Yadav, R.K., et al., *FoxO transcription factors in cancer metabolism*. *Semin Cancer Biol*, 2018. **50**: p. 65-76.
201. Faubert, B., et al., *AMPK is a negative regulator of the Warburg effect and suppresses tumor growth in vivo*. *Cell Metab*, 2013. **17**(1): p. 113-24.
202. Herzig, S. and R.J. Shaw, *AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018. **19**(2): p. 121-135.
203. Fodor, T., et al., *Combined Treatment of MCF-7 Cells with AICAR and Methotrexate, Arrests Cell Cycle and Reverses Warburg Metabolism through AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) and FOXO1*. *PLoS One.*, 2016. **11**(2): p. e0150232.
204. Velasco-Velázquez, M.A., et al., *The role of breast cancer stem cells in metastasis and therapeutic implications*. *Am J Pathol*, 2011. **179**(1): p. 2-11.
205. Shackleton, M., et al., *Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution*. *Cell*, 2009. **138**(5): p. 822-9.
206. Takebe, N., R.Q. Warren, and S.P. Ivy, *Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition*. *Breast Cancer Res*, 2011. **13**(3): p. 211.
207. Dittmer, J., *Breast cancer stem cells: Features, key drivers and treatment options*. *Semin Cancer Biol*, 2018. **53**: p. 59-74.
208. Geng, S.Q., A.T. Alexandrou, and J.J. Li, *Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis*. *Cancer Lett*, 2014. **349**(1): p. 1-7.
209. Liu, H., et al., *Cancer stem cells from human breast tumors are involved in spontaneous metastases in orthotopic mouse models*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(42): p. 18115-20.
210. Morrison, B.J., et al., *Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2008. **10**(4): p. 210.
211. Pavlides, S., et al., *The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma*. *Cell Cycle*, 2009. **8**(23): p. 3984-4001.
212. Snyder, V., et al., *Cancer Stem Cell Metabolism and Potential Therapeutic Targets*. *Front Oncol*, 2018. **8**: p. 203.
213. Chae, Y.C. and J.H. Kim, *Cancer stem cell metabolism: target for cancer therapy*. *BMB Rep*, 2018. **51**(7): p. 319-326.
214. Ginestier, C., et al., *ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome*. *Cell Stem Cell*, 2007. **1**(5): p. 555-67.
215. Diehn, M., et al., *Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 780-3.
216. Gorrini, C., I.S. Harris, and T.W. Mak, *Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy*. *Nat Rev Drug Discov*, 2013. **12**(12): p. 931-47.
217. Liu, J. and Z. Wang, *Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy*. *Oxid Med Cell Longev*, 2015. **2015**: p. 294303.
218. Roager, H.M. and T.R. Licht, *Microbial tryptophan catabolites in health and disease*. *Nat Commun.*, 2018. **9**(1): p. 3294.
219. Gao, K., et al., *Tryptophan Metabolism: A Link Between the Gut Microbiota and Brain*. *Adv Nutr*, 2020. **11**(3): p. 709-723.
220. Le Floc'h, N., W. Otten, and E. Merlot, *Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications*. *Amino Acids*, 2011. **41**(5): p. 1195-205.

221. Gao, J., et al., *Impact of the Gut Microbiota on Intestinal Immunity Mediated by Tryptophan Metabolism*. Front Cell Infect Microbiol., 2018: p. doi: 10.3389/fcimb.2018.00013.
222. Hendriks, T. and B. Schnabl, *Indoles: metabolites produced by intestinal bacteria capable of controlling liver disease manifestation*. 2019. **286**(1): p. 32-40.
223. Hashimoto, T., et al., *ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation*. Nature, 2012. **487**(7408): p. 477-81.
224. Yokoyama, M.T. and J.R. Carlson, *Microbial metabolites of tryptophan in the intestinal tract with special reference to skatole*. Am J Clin Nutr., 1979. **32**(1): p. 173-8.
225. Gheorghe, C.E., et al., *Focus on the essentials: tryptophan metabolism and the microbiome-gut-brain axis*. Curr Opin Pharmacol, 2019. **48**: p. 137-145.
226. Agus, A., J. Planchais, and H. Sokol, *Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease*. Cell Host Microbe, 2018. **23**(6): p. 716-724.
227. Marcobal, A., et al., *A metabolomic view of how the human gut microbiota impacts the host metabolome using humanized and gnotobiotic mice*. Isme j, 2013. **7**(10): p. 1933-43.
228. Clarke, G., et al., *The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner*. Mol Psychiatry, 2013. **18**(6): p. 666-73.
229. Williams, B.B., et al., *Discovery and characterization of gut microbiota decarboxylases that can produce the neurotransmitter tryptamine*. Cell Host Microbe, 2014. **16**(4): p. 495-503.
230. Agus, A., J. Planchais, and H. Sokol, *Gut Microbiota Regulation of Tryptophan Metabolism in Health and Disease*. Cell Host Microbe., 2018. **23**(6): p. 716-724.
231. Lee, J.H. and J. Lee, *Indole as an intercellular signal in microbial communities*. FEMS Microbiol Rev, 2010. **34**(4): p. 426-44.
232. Ma, Q., X. Zhang, and Y. Qu, *Biodegradation and Biotransformation of Indole: Advances and Perspectives*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 2625.
233. Palmieri, A. and M. Petrini, *Tryptophol and derivatives: natural occurrence and applications to the synthesis of bioactive compounds*. Nat Prod Rep, 2019. **36**(3): p. 490-530.
234. Totmar, O. and E. Hellström, *Aldehyde dehydrogenase in blood: a sensitive assay and inhibition by disulfiram*. Pharmacol Biochem Behav, 1983. **18 Suppl 1**: p. 103-7.
235. Wlodarska, M., et al., *Indoleacrylic Acid Produced by Commensal Peptostreptococcus Species Suppresses Inflammation*. Cell Host Microbe, 2017. **22**(1): p. 25-37.e6.
236. Liu, Y., et al., *Gut Microbial Metabolites of Aromatic Amino Acids as Signals in Host-Microbe Interplay*. Trends Endocrinol Metab, 2020. **31**(11): p. 818-834.
237. Taleb, S., *Tryptophan Dietary Impacts Gut Barrier and Metabolic Diseases*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 2113.
238. Kim, J. and W. Park, *Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration?* J Microbiol, 2015. **53**(7): p. 421-8.
239. Stewart, V. and C. Yanofsky, *Evidence for transcription antitermination control of tryptophanase operon expression in Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1985. **164**(2): p. 731-40.
240. DeMoss, R.D. and K. Moser, *Tryptophanase in diverse bacterial species*. J Bacteriol, 1969. **98**(1): p. 167-71.
241. Rety, S., P. Deschamps, and N. Leulliot, *Structure of Escherichia coli tryptophanase purified from an alkaline-stressed bacterial culture*. Acta Crystallogr F Struct Biol Commun, 2015. **71**(Pt 11): p. 1378-83.

242. Gong, F., et al., *The mechanism of tryptophan induction of tryptophanase operon expression: tryptophan inhibits release factor-mediated cleavage of TnaC-peptidyl-tRNA(Pro)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 8997-9001.
243. Deeley, M.C. and C. Yanofsky, *Transcription initiation at the tryptophanase promoter of Escherichia coli K-12*. J Bacteriol, 1982. **151**(2): p. 942-51.
244. Li, G. and K.D. Young, *A new suite of tnaA mutants suggests that Escherichia coli tryptophanase is regulated by intracellular sequestration and by occlusion of its active site*. BMC Microbiol, 2015. **15**(1): p. 14.
245. Tuomainen, M., et al., *Associations of serum indolepropionic acid, a gut microbiota metabolite, with type 2 diabetes and low-grade inflammation in high-risk individuals*. 2018. **8**(1): p. 35.
246. Wikoff, W.R., et al., *Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3698-703.
247. Rosas, H.D., et al., *A systems-level "misunderstanding": the plasma metabolome in Huntington's disease*. Ann Clin Transl Neurol., 2015. **2**(7): p. 756-68.
248. Zhang, L.S. and S.S. Davies, *Microbial metabolism of dietary components to bioactive metabolites: opportunities for new therapeutic interventions*. Genome Med, 2016. **8**(1): p. 46.
249. de Loor, H., et al., *Sodium octanoate to reverse indoxyl sulfate and p-cresyl sulfate albumin binding in uremic and normal serum during sample preparation followed by fluorescence liquid chromatography*. J Chromatogr A, 2009. **1216**(22): p. 4684-8.
250. Schroeder, J.C., et al., *The uremic toxin 3-indoxyl sulfate is a potent endogenous agonist for the human aryl hydrocarbon receptor*. Biochemistry, 2010. **49**(2): p. 393-400.
251. Dou, L., et al., *The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells*. J Thromb Haemost, 2007. **5**(6): p. 1302-8.
252. Venkatesh, M., et al., *Symbiotic bacterial metabolites regulate gastrointestinal barrier function via the xenobiotic sensor PXR and Toll-like receptor 4*. Immunity., 2014. **41**(2): p. 296-310.
253. Zelante, T., et al., *Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22*. Immunity., 2013. **39**(2): p. 372-85.
254. Giguère, V., *Orphan nuclear receptors: from gene to function*. Endocr Rev, 1999. **20**(5): p. 689-725.
255. Sever, R. and C.K. Glass, *Signaling by nuclear receptors*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(3): p. a016709.
256. Stevens, E.A., J.D. Mezrich, and C.A. Bradfield, *The aryl hydrocarbon receptor: a perspective on potential roles in the immune system*. Immunology, 2009. **127**(3): p. 299-311.
257. Sonner, J.K., et al., *Dietary tryptophan links encephalogenicity of autoreactive T cells with gut microbial ecology*. Nat Commun., 2019. **10**(1): p. 4877.
258. Murray, I.A., A.D. Patterson, and G.H. Perdew, *Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(12): p. 801-14.
259. Kliewer, S.A., B. Goodwin, and T.M. Willson, *The nuclear pregnane X receptor: a key regulator of xenobiotic metabolism*. Endocr Rev, 2002. **23**(5): p. 687-702.
260. He, L., et al., *Functions of pregnane X receptor in self-detoxification*. Amino Acids, 2017. **49**(12): p. 1999-2007.
261. Ouyang, N., et al., *Pregnane X receptor suppresses proliferation and tumorigenicity of colon cancer cells*. Br J Cancer, 2010. **102**(12): p. 1753-61.
262. Verma, S., M.M. Tabb, and B. Blumberg, *Activation of the steroid and xenobiotic receptor, SXR, induces apoptosis in breast cancer cells*. BMC Cancer, 2009. **9**: p. 3.

263. Durantón, F., et al., *Normal and pathologic concentrations of uremic toxins*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(7): p. 1258-70.
264. Barrera, G., *Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy*. ISRN Oncol, 2012. **2012**: p. 137289.
265. Uchida, K., et al., *Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(18): p. 8742-6.
266. Mabley, J.G., et al., *Suppression of intestinal polyposis in Apcmin/+ mice by targeting the nitric oxide or poly(ADP-ribose) pathways*. Mutat.Res., 2004. **548**(1-2): p. 107-116.
267. Szántó, M., et al., *Deletion of PARP-2 induces hepatic cholesterol accumulation and decrease in HDL levels*. Biochem Biophys Acta - Molecular Basis of Disease, 2014. **1842**(4): p. 594-602.
268. Rueden, C.T., et al., *ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data*. BMC Bioinformatics, 2017. **18**(1): p. 529.
269. Sári, Z., et al., *Fecal expression of Escherichia coli lysine decarboxylase (LdcC) is downregulated in E-cadherin negative lobular breast carcinoma*. 2020.
270. Howlander, N., et al., *Overview of breast cancer collaborative stage data items--their definitions, quality, usage, and clinical implications: a review of SEER data for 2004-2010*. Cancer, 2014. **120 Suppl 23**: p. 3771-80.
271. Csonka, T., et al., *Assessment of candidate immunohistochemical prognostic markers of meningioma recurrence*. Folia Neuropathologica, 2016. **54**(2): p. 114-126.
272. Stenger, M. *Calculating H-Score*. 2015 [cited 2019 2019. 01. 07.]; Available from: <http://www.ascopost.com/issues/april-10-2015/calculating-h-score/>.
273. Goldberg, A.A., et al., *Lithocholic bile acid selectively kills neuroblastoma cells, while sparing normal neuronal cells*. Oncotarget., 2011. **2**(10): p. 761-82.
274. Davila-Gonzalez, D., et al., *Pharmacological Inhibition of NOS Activates ASK1/JNK Pathway Augmenting Docetaxel-Mediated Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer*. Clin Cancer Res., 2018. **24**(5): p. 1152-1162.
275. Luo, M., et al., *Targeting Breast Cancer Stem Cell State Equilibrium through Modulation of Redox Signaling*. Cell Metab., 2018. **28**(1): p. 69-86.
276. Pacher, P., J.S. Beckman, and L. Liaudet, *Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease*. Physiol Rev, 2007. **87**(1): p. 315-424.
277. Ozsvári, B., et al., *Mitoriboscins: Mitochondrial-based therapeutics targeting cancer stem cells (CSCs), bacteria and pathogenic yeast*. Oncotarget., 2017. **8**(40): p. 67457-67472.
278. Bao, B., et al., *Targeting CSCs in tumor microenvironment: the potential role of ROS-associated miRNAs in tumor aggressiveness*. Curr Stem Cell Res Ther., 2014. **9**(1): p. 22-35.
279. Tang, S., et al., *The role of oxidized ATM in the regulation of oxidative stress-induced energy metabolism reprogramming of CAFs*. Cancer Lett., 2014. **353**(2): p. 133-44.
280. Huang, H., et al., *Inhibition of drug metabolism by blocking the activation of nuclear receptors by ketoconazole*. Oncogene., 2007. **26**(2): p. 258-68.
281. Salimi, V., et al., *Sodium butyrate promotes apoptosis in breast cancer cells through reactive oxygen species (ROS) formation and mitochondrial impairment*. Lipids Health Dis, 2017. **16**(1): p. 208.
282. De Francesco, E.M., F. Sotgia, and M.P. Lisanti, *Cancer stem cells (CSCs): metabolic strategies for their identification and eradication*. Biochem J, 2018. **475**(9): p. 1611-1634.
283. Sotgia, F., M. Fiorillo, and M.P. Lisanti, *Hallmarks of the cancer cell of origin: Comparisons with "energetic" cancer stem cells (e-CSCs)*. Aging (Albany NY), 2019. **11**(3): p. 1065-1068.

284. Lanczky, A., et al., *miRpower: a web-tool to validate survival-associated miRNAs utilizing expression data from 2178 breast cancer patients*. *Breast Cancer Res Treat.*, 2016. **160**(3): p. 439-446.
285. Velicer, C.M., et al., *Association between antibiotic use prior to breast cancer diagnosis and breast tumour characteristics (United States)*. *Cancer Causes Control.*, 2006. **17**(3): p. 307-13.
286. Platten, M., E.A.A. Nollen, and U.F. Röhrig, *Tryptophan metabolism as a common therapeutic target in cancer, neurodegeneration and beyond*. 2019. **18**(5): p. 379-401.
287. Routy, B., et al., *Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors*. *Science.*, 2018. **359**(6371): p. 91-97.
288. Viaud, S., et al., *The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide*. *Science.*, 2013. **342**(6161): p. 971-6.
289. Kim, C.H., *Immune regulation by microbiome metabolites*. *Immunology.*, 2018. **154**(2): p. 220-229.
290. Zhang, L., R.G. Nichols, and A.D. Patterson, *The aryl hydrocarbon receptor as a moderator of host-microbiota communication*. *Curr Opin Toxicol.*, 2017. **2**: p. 30-35.
291. Pons, D.G., et al., *UCP2 inhibition sensitizes breast cancer cells to therapeutic agents by increasing oxidative stress*. *Free Radic Biol Med.*, 2015. **86**: p. 67-77.
292. Kai, K., et al., *Breast cancer stem cells*. *Breast Cancer.*, 2010. **17**(2): p. 80-5.
293. Vera-Ramirez, L., et al., *Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies*. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 2011. **80**(3): p. 347-68.
294. Cheng, J., et al., *Prognostic significance of AMPK in human malignancies: A meta-analysis*. *Oncotarget.*, 2016. **7**(46): p. 75739-75748. .
295. Caruso, J.A., et al., *Indole-3-carbinol and its N-alkoxy derivatives preferentially target ERα-positive breast cancer cells*. *Cell Cycle*, 2014. **13**(16): p. 2587-99.
296. Auslander, N., et al., *A joint analysis of transcriptomic and metabolomic data uncovers enhanced enzyme-metabolite coupling in breast cancer*. *Sci Rep.*, 2016. **6**: p. 29662.
297. Tang, X., et al., *A joint analysis of metabolomics and genetics of breast cancer*. *Breast Cancer Res*, 2014. **16**(4): p. 415.
298. Yager, J.D., *Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1-quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention--A review*. *Steroids*, 2015. **99**(Pt A): p. 56-60.
299. Newman, T.M., M.Z. Vitolins, and K.L. Cook, *From the Table to the Tumor: The Role of Mediterranean and Western Dietary Patterns in Shifting Microbial-Mediated Signaling to Impact Breast Cancer Risk*. *Nutrients.*, 2019: p. doi: 10.3390/nu11112565.
300. Chiba, A., et al., *Neoadjuvant Chemotherapy Shifts Breast Tumor Microbiota Populations to Regulate Drug Responsiveness and the Development of Metastasis*. *Mol Cancer Res*, 2019. **18**: p. 1541-7786.

11. Tárgyszavak

Aril-Hidrokarbon Receptor	Aryl Hydrocarbon Receptor
Emlődaganat	Breast cancer
Epiteliális-mezenchimális tranzíció	Epithelial-mesenchymal transition
Indolpropánsav	Indolepropionic acid
Indoxil szulfát	Indolxyl sulfate
Metasztázis	Metastasis
Mikrobiom	Microbiome
Nitrozatív stressz	Nitrosative stress
Onkobiom	Oncobiome
Oxidatív stressz	Oxidative stress
Pregnán X-Receptor	Pregnane X-Receptor

12. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Dr. Bay Péternek, hogy lehetőséget biztosított munkám sikeres elvégzéséhez és értekezésem megírásához. Hálával tartozom támogatásáért és nélkülözhetetlen szakmai tanácsaiért, amivel alapvetően hozzájárult szakmai fejlődésemhez.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Virág László intézetigazgatónak, hogy lehetővé tette számomra a kutatómunkát az Orvosi Vegytani Intézetben. Továbbá köszönetem fejezném ki az Intézet minden munkatársának türelméért és önzetlen segítségükért.

Gyakorlati tanácsaiért és támogatásáért hálás vagyok Dr. Mikó Editnek és Dr. Kovács Tündének, hogy időt nem sajnálva bízottak és megosztották velem elméleti és szakmai ismereteiket. Szeretném megköszönni Jankó Laurának és Antal Dórának munkám során nyújtott segítségét és lelki támogatását, akikre nemcsak kollégaként, hanem barátként is mindig számíthattam. Továbbá hálával tartozom Ujlaki Gyulának adatbázis elemzésekben nyújtott támogatásáért, valamint Lente Grétának állatkísérleteim kivitelezéséhez való hozzájárulását.

Gyakorlati tanácsaiért és technikai segítségéért hálával tartozom Finta László és Bancsi László laborasszisztenseknek.

Köszönetem fejezném ki Dr. Boratkó Anitának és Dr. Sipos Adriennek az ECIS mérések végzéséért és az eredmények kiértékelése során nyújtott segítségükért. Köszönetet mondok laborunk minden munkatársának a jó hangulatban eltöltött mindennapokért, s hogy segítőkész tanácsaikkal elősegítették munkámat.

Szeretném megköszönni Dr. Csonka Tamásnak és Prof. Dr. Méhes Gábornak a szövettani vizsgálatok elvégzését, illetve Dr. Török Miklósnak és Dr. Kovács Ilonának (Kenézy Gyula Egyetemi Kórház, Debrecen) a humán szövettani minták patológiai leletezését. Hálásak vagyunk James J. Goedertnek (NCI-NIH) az emlőtumoros betegektől származó széklet DNS minták biztosításáért, valamint Dr. Sebő Évának (Kenézy Gyula Egyetemi Kórház, Debrecen), Dr. Tóth Juditnak és Dr. Szabó Juditnak a humán székletminták gyűjtéséért. Köszönettel tartozom Dr. Kiss Borbálának, Dr. Tóth Dezsőnek és Dr. Árkosy Péternek az emlőtumoros betegek tanulmányunkba történő beválogatásában nyújtott segítségükért.

Köszönetem fejezném ki Dr. Karen Uraynak közleményeink nyelvi lektorálásáért.

Köszönöm barátaimnak, hogy szüntelenül biztatva mellettem álltak. Nem utolsó sorban szeretném kifejezni megbecsülésemet és hálámat szeretett családomnak, szüleimnek és férjemnek, Dr. Máté Istvánnak, akik támaszt nyújtottak, gondoskodással és türelemmel kísérték végig munkámat.

A disszertáció elkészítését a GINOP-2.3.2-15-2016-00006 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával valósult meg. Munkánk alapjául szolgáló kutatást az Innovációs és Technológiai Minisztérium által meghirdetett Tématerületi Kiválósági Program (TKP2020-IKA-04) támogatta.

13. Publikációs lista



**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/376/2020.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sári Zsanett
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Sári, Z.**, Mikó, E., Kovács, T., Jankó, L., Csonka, T., Lente, G., Sebő, É., Tóth, J., Tóth, D., Árkosy, P., Boratkó, A., Ujlaki, G., Török, M., Kovács, I., Szabó, J., Kiss, B., Méhes, G., Goedert, J. J., Bai, P.: Indolepropionic Acid, a Metabolite of the Microbiome, Has Cytostatic Properties in Breast Cancer by Activating AHR and PXR Receptors and Inducing Oxidative Stress.
Cancers (Basel). 12 (9), 1-27, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12092411>
IF: 6.126 (2019)
2. **Sári, Z.**, Mikó, E., Kovács, T., Boratkó, A., Ujlaki, G., Jankó, L., Kiss, B. K., Uray, K., Bai, P.: Indoxylsulfate, a Metabolite of the Microbiome, Has Cytostatic Effects in Breast Cancer via Activation of AHR and PXR Receptors and Induction of Oxidative Stress.
Cancers (Basel). 12 (10), 1-23, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12102915>
IF: 6.126 (2019)

További közlemények

3. **Sári, Z.**, Kovács, T., Csonka, T., Török, M., Sebő, É., Tóth, J., Tóth, D., Mikó, E., Kiss, B. K., Szeőcs, D., Uray, K., Karányi, Z., Kovács, I., Méhes, G., Árkosy, P., Bai, P.: Fecal expression of *Escherichia coli* lysine decarboxylase (LdcC) is downregulated in E-cadherin negative lobular breast carcinoma.
Physiol Int. 107 (2), 349-358, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/2060.2020.00016>
IF: 1.41 (2019)
4. Jankó, L., **Sári, Z.**, Kovács, T., Kis, G., Szántó, M., Antal, M., Juhász, A. G., Bai, P.: Silencing of PARP2 blocks autophagic degradation.
Cells. 9 (2), 1-21, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells9020380>
IF: 4.366 (2019)





5. Kovács, T., Mikó, E., Ujlaki, G., **Sári, Z.**, Bai, P.: The Microbiome as a Component of the Tumor Microenvironment.
In: Tumor Microenvironment / Alexander Birbrair, Springer Nature - Springer Cham, Switzerland, 137-153, 2020, (dvances in Experimental Medicine and Biology, 0065-2598 ; 1225)
6. Kovács, P., Csonka, T., Kovács, T., **Sári, Z.**, Ujlaki, G., Sipos, A., Karányi, Z., Szeőcs, D., Hegedűs, C., Uray, K., Jankó, L., Kiss, M., Kiss, B. K., Laoui, D., Virág, L., Méhes, G., Bai, P., Mikó, E.: Lithocholic acid, a metabolite of the microbiome, increases oxidative stress in breast cancer.
Cancers (Basel). 11, 1-31, 2019.
IF: 6.126
7. Simándi, Z., Pájer, K., Károlyi, K., Sieler, T., Jiang, L. L., Kolostyák, Z., **Sári, Z.**, Fekecs, Z., Pap, A., Patsalos, A., Contreras, G. A., Rehó, B., Papp, Z., Guo, X., Horváth, A., Kiss, G., Keresztessy, Z., Vámosi, G., Hickman, J., Xu, H., Dormann, D., Hortobágyi, T., Antal, M., Nógrádi, A., Nagy, L.: Arginine Methyltransferase PRMT8 Provides Cellular Stress Tolerance in Aging Motoneurons.
J. Neurosci. 38 (35), 7683-7700, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3389-17.2018>
IF: 6.074
8. Mikó, E., Vida, A., Kovács, T., Ujlaki, G., Trencsényi, G., Márton, J., **Sári, Z.**, Kovács, P., Boratkó, A., Hujber, Z., Csonka, T., Antal-Szalmás, P., Watanabe, M., Gombos, I., Csóka, B., Kiss, B. K., Vígh, L., Szabó, J., Méhes, G., Sebestyén, A., Goedert, J. J., Bai, P.: Lithocholic acid, a bacterial metabolite reduces breast cancer cell proliferation and aggressiveness.
Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 1859 (9), 958-974, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.04.002>
IF: 4.441

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 34,669

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapján szolgáló közleményekre):
12,252**

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, 2020.12.22.



14. Függelék

A függelék az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatait tartalmazza: