

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Az indol származékok szerepe rosszindulatú  
emlődaganatok patogenezisében**

Dr. Máténé Sári Zsanett Mercédesz



DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2021

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Az indol származékok szerepe rosszindulatú  
emlődaganatok patogenezisében**

Dr. Máténé Sári Zsanett Mercedesz

Témavezető: Dr. Bay Péter



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2021

## **Az indol származékok szerepe rosszindulatú emlődaganatok patogenezisében**

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

Írta: Dr. Máténé Sári Zsanett Mercedesz okleveles klinikai laboratóriumi kutató

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Bay Péter

Az értekezés bírálói:

Dr. Pankotai Tibor, PhD  
Dr. Szegedi István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora  
tagok: Dr. Mádi András, PhD  
Dr. Pankotai Tibor, PhD  
Dr. Sebestyén Anna, PhD  
Dr. Szegedi István, PhD

Az értekezés védésének (online formátumban) időpontja: 2021. április 30. 12:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben részt kíván venni, úgy jelezze a sari.zsanett@med.unideb.hu e-mail címre küldött üzenetben a vitát megelőző munkanap (2021. április 29.) 16 óráig. A határidő lejártát követően technikai okok miatt már nincs lehetőség a védéshez kapcsolódni.

# Bevezetés

## A humán mikrobiom

Az emberi test felszínén és a testüregekben (többek között a bőrön, szájban, orrban, hüvelyben, belekben) élő mikroorganizmusok összessége által alkotott ökológiai rendszer a mikrobiom, 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 homeosztatikus 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. 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.

## Diszbiózis – onkobiózis

Az emberi gasztrointesztinális rendszerben nagyszámú, becslések szerint  $10^{14}$  baktérium fordul elő. A MetaHit mikrobiom tanulmányban mintegy 3,3 millió mikrobiális gént írtak le, illetve további metaanalízis vizsgálatok több, mint 9,7 millió bakteriális gént azonosítottak egészséges felnőttek székletében. Az emésztőrendszer ökoszisztémája nagyfokú diverzitással jellemezhető, mely a homeosztatikus egyensúly megőrzésében meghatározó faktor. 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. A mikrobiom képes neurotranszmitterek és neurotranszmitter-szerű anyagok szintézisére és ezen keresztül képes befolyásolni 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.

Az emésztőrendszeri 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. 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. Számos tanulmányban megfigyelték, hogy a bakteriális diverzitás csökkenése daganatos kórképekkel társul. A neopláziára jellemző transzformált mikrobiomot onkobiomnak nevezzük. 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.

Számos neoplasztikus betegséggel, köztük az emlőrák kialakulásával is összefüggésbe hozták a mikrobiális közösség összetételének megváltozását. Ezen változások elsősorban a bakteriális sokféleség és diverzitás csökkenését okozták emlőrákos betegeknél, mely összefüggést mutatott a minták földrajzi származásával, valamint a molekuláris altípussal. A tripla negatív emlőrákos esetek mikrobiális összetétele eltér a többi típustól, mely korrelál a betegség grádusával és agresszivitásával is. Ezen megfigyelések arra utalnak, hogy az onkobiózis központi szerepet játszik az emlőrák patomechanizmusában.

### **Az emlő rosszindulatú daganatai**

Fejlett országokban a legnagyobb prevalenciájú malignus megbetegedés az emlőrák, mely a második leggyakoribb haláloknak tekinthető a nők körében. Évente

megközelítőleg egy millió beteget diagnosztizálnak, az életkorral korrigált becslést éves mortalitás 23,1 haláleset 100 000 lakosra nézve Európában. Jelentős földrajzi és gazdasági megoszlást mutat az emlőrák incidenciája, a fejlett országokban magasabb előfordulási kockázatot figyeltek meg. Azonban a szűrőprogramok népszerűsítése és következményesen a korai felismerés miatt az emlőrák öt éves túlélési aránya meghaladhatja a 80% -ot a fejlett világban.

A rosszindulatú emlődaganatoknak számos kockázati faktora ismert, ennek ellenére az esetek jelentős részének az oka tisztázatlan marad. 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 menopauzán átesett nőket érinti. Tartós hormon expozíció, mint például orális fogamzásgátlók szedése, hormonpótló terápiák, valamint korai menarche vagy a késői menopauza szintén növeli az emlőrák kockázatát. 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. Ezzel szemben a terhesség, szoptatás, rendszeres fizikai aktivitás és káros szenvedélyektől mentes egészséges életmód csökkentheti az emlőrákra való fogékonyságot.

### **Oxidatív és nitrozatív stressz**

A reaktív oxigén és nitrogén származékok fiziológiai 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 redukáns egyensúly fenntartása.

Fokozott szabadgyökök és reaktív metabolit termelődés, valamint csökkent antioxidáns 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 nekrosis mehet végbe, amely potenciális hatást gyakorol az egész szervezetre. Az oxidatív stressz összefüggésbe hozták számos patológiás kórkép kialakulásával, beleértve neurológiai rendellenességeket, ateroszklerózist, hipertenziót, cukorbetegséget, akut légzési distressz szindrómát, idiopátiás tüdőfibrózist, krónikus obstruktív tüdőbetegséget, asztmát és neoplasztikus megbetegedéseket is. A tartós gyulladás és az ebből következő oxidatív stressz DNS-károsodást és genom instabilitást idézhet elő, ennek következtében a felhalmozódott mutációk karcinogenezist indukálhatnak. Ugyanakkor bizonyos rosszindulatú daganatokban, többek között emlőrákban, a fokozott oxidatív stressz citosztatikus hatását állapították meg.

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. Több, mint ezer NRF2 célgént azonosítottak, többségük az antioxidáns védelmi rendszer fontos részét képezi, mint a SOD, a CAT vagy a GPX. Az evolúciósan konzervált citoprotektív NRF2 általában pro-neoplasztikus hatású, aktivációja hozzájárul a sejtek túléléséhez antiapoptotikus szignálok stimulálásával, metabolikus változásokat indukál, valamint a migráció és az invázió támogatásával kedvező környezetet teremt a tumorsejtek proliferációjához és metasztatikus kialakulásához.

### **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. A folyamat kulcsképe, 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 (EMT) nevezünk. Az EMT során a sejtek citoskeletális rendszere átrendeződik, a hámsejtekre jellemző citokeratin intermedier filamentum hálózat vimentinre (Vim) cserélődik ki, valamint a sejtmozgást elősegítő aktin stressz-szálak képződnek. A sejtek elnyúlt, fibroblaszt-szerű morfológiára tesznek szert, valamint a sejtek közötti szoros sejtkapcsolatok (*zonula occludens*, *tight junction*) felbomlanak és megszűnnek. Továbbá, az adherens interakciókban résztvevő E-cadherin kifejeződése csökken, ellenben a mezenchimális marker, neurális-cadherin (N-cadherin) expressziója megemelkedik. Az EMT meghatározó szerepet játszik fiziológiás folyamatokban (embriogenezis, sebgyógyulás), ugyanakkor a neoplasztikus folyamatokat jellemző onkogén EMT jelenségét emlődaganatokban is azonosították, mely lehetővé teszi a primer daganatsejtek migrálását, s a véráramon át távoli metasztázisok kialakulásához vezethetnek. Az áttétek képződése során a mezenchimális jellegű sejtekben gyakran lejátszódik az EMT reverz folyamata, a mezenchimális-epiteliális átmenet (MET), mely visszaállítja a neoplasztikus sejtek epitél jellegét.

Számos transzkripciós faktor és molekuláris esemény szabályozza az EMT-t emlődaganatokban. Különböző DNS mutációk, mint az epitheliális integritást biztosító E-cadherin elvesztése, valamint a mátrix metalloproteinázok (MMP) felszabadulása a tumorgenezist elősegítve stimulálják a sejtinváziót és az áttétképződést. Több EMT-ben résztvevő transzkripciós faktor ismert, közülük a Snail (Snai1), a Slug (Snai2), a Twist1, a ZEB1 és a ZEB2 aktivációja indukálja az EMT-t az E-cadherin represszióján keresztül. Ezen transzkripciós faktorok kulcsfontosságúak a mezenchimális jelleg fenntartásában, valamint az összejt-szerű fenotípus megjelenésében, ezzel elősegítve a metasztatizációt, illetve a terápiás rezisztencia kialakulását, mely kedvezőtlen prognózist vetít előre.

### **Az emlődaganatok metabolizmusa**

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. A daganatos progressziót támogató metabolikus változások hátterében többek között az mTOR (mammalian target of

rapamycin), a forkhead box O1 fehérje (FOXO1), az adenzin-monofoszfát aktivált protein kináz (AMPK), valamint a peroxiszóma proliferátor aktivált receptor gamma koaktivátor-1 $\alpha$  és  $\beta$  (PGC1 $\alpha$  és PGC1 $\beta$ ) celluláris energiaszenzor útvonal szabályozóknak a komplex újraprogramozása állhat. A FOXO1 transzkripciós faktor elsősorban az mTORC1 gátlásán keresztül a sejtciklus leállítását vagy a sejtproliferációs kapacitás csökkenését váltja ki. Mindemellett emlőrákos betegeknél az antitumor hatású AMPK alulműködését figyelték meg - aktivációjára az acetyl-CoA-karboxiláz (ACC) fokozott foszforilációja utal - kulcsfontosságú szerepet játszik az energia-homeosztázis fenntartásában, valamint a PGC1 $\alpha$  és PGC1 $\beta$  szabályozásával stimulálja a mitokondriális biogenezist. Daganatos megbetegedésekben, többek között az emlőrákban is azonosított Warburg-féle metabolikus változások helyreállítását célzó terápiás eljárások antiproliferatív hatásúak, meghatározó szerepet töltenek be a jövő tumoros betegeinek kezelésében.

### **Emlőrák őssejtek és oxidatív stressz**

Létezik az őssejteknek egy speciális alcsoportja, a korlátlan önmegújulásra képes úgynevezett daganatőssejtek, melyekből heterogén tumorsejt populáció létrehozására alkalmas progenitor utódsejtek keletkeznek. Metabolizmusukat elsősorban fokozott mitokondriális oxidáció és jelentős metabolikus flexibilitás jellemzi, ami elősegíti a tumoriniciációját és progresszióját, valamint hozzájárul a kemorezisztencia kialakulásához. Két formájukat különböztetjük el, a mezenchima-szerű őssejtek CD44 sejtfelszíni markert expresszálnak, míg az epiteliális fenotípusúak aldehid-dehidrogenáz-1 (ALDH1) pozitivitást mutatnak.

Az emlődaganat őssejtek és a korai progenitorok alacsonyabb ROS-szinttel jellemezhetőek, mint a tumorigén potenciállal nem rendelkező sejtek, mely kritikusnak bizonyult az őssejtek működésének fenntartásában. A fokozott oxidatív stressz csökkenti az őssejtek klonogenitását, és radioszenzitizációt eredményez. 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 daganatossejtek szelektív eliminálásához, a normál sejtek működésének minimális károsítása mellett.

### **Az indolpropánsav és indoxil szulfát élettani szerepe**

A triptofán táplálék eredetű esszenciális aminosav, mely jelentős része (4-6 %) a mikrobiális katabolizmus során számos bioaktív indol származékok prekursoraként szolgálhat. Az enterális baktériumok triptofánból indol szintézisét katalizálják triptofanáz (TnaA) enzimaktivitásuk révén, mely a triptofánt hidrolizálva indolt, piruvátot és ammóniát hoz létre. A legszélesebb körben az *Escherichia coliból* származó triptofanáz operont (tnaCAB) tanulmányozták, mely két fő szerkezeti génből. A TnaA gén az enzimaktivitásért felelős, míg a TnaB alacsony affinitású, nagy kapacitású triptofán-specifikus transzportert kódol. Továbbá azonosítottak néhány olyan baktériumfajt, melyek nem indukálható módon, hanem konstitutívan termelik az enzimet.

Számos Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumfajból izolálták a TnaA enzimet, mely többek között az indolpropánsav (IPA) és indoxil szulfát (IS) bakteriális metabolitok képződését modulálja. A triptofán dezaminációjával keletkező humán IPA termelését elsősorban a *Clostridium sporogenes* jelenléte határozza meg. Szérum koncentrációja az egészséges felnőttekben 0.291–1.095  $\mu\text{M}$ . Az IPA szabályozza a pro- és antiinflammatorikus gének kifejeződését a bél hámsejtekben, jelentősen fokozza az IL-10 gyulladáscsökkentő interleukin termelését, valamint csökkenti a gyulladással kapcsolatos citokinek tumornekrózis-faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) és IFN- $\gamma$  felszabadulását, hozzájárulva az emésztőrendszeri mikrobiom gyulladásgátló hatásához. Nemcsak a gasztrointesztinális traktusban expresszálódik az IPA, hanem a központi idegrendszer sejtjeiben is, ahol meghatározó szerepet játszik a neuronok proliferációjában, differenciálódásában, valamint neuroprotektív hatással rendelkezik.

Az IS szintén triptofán eredetű bioaktív indol származék. A triptofán indol-3-piruvát intermedieren keresztül indollá alakul, majd a keringésen át a májba lép, ahol a Cyp2E1 hidroxilálja, valamint a SULT1 és a SULT2 (szulfotranszferáz) enzimek szulfáttal konjugálják. Az IS képződését determinálja a kommenzális baktériumflóra, átlagos szérum koncentrációja az egészséges szervezetben 2  $\mu\text{M}$  körül mozog. Patológias koncentrációban

citotoxikus hatással bírhat, krónikus veseelégtelenséggel és vaszkuláris betegségekkel is összefüggésbe hozták, valamint endoteliális proliferáció és migráció gátlást figyeltek meg, ugyanakkor a pontos patomechanizmus még tisztázatlan. Egyes közlemények beszámoltak az IS oxidatív stresszben betöltött szerepéről, *in vitro* körülmények között fokozza a ROS termelődését, 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. Az AHR a xenobiotikumok metabolizmusában és a vaszkuláris fejlődésben jelentős szerepet játszó citoszolikus ligand-aktivált transzkripciós faktor. Az AHR aktiváció kulcsfontosságú az immunrendszer szabályozásában, ligand-specifikus módon befolyásolhatja a veleszületett és adaptív immunválaszt, valamint szabályozza a nyálkahártya immunitást. A receptor tumorigenezisben betöltött funkcionális jelentősége még tisztázatlan, azonban egyes tanulmányokban az AHR agonisták hatásosnak bizonyultak a sejtproliferációs- és a migrációs potenciál csökkentésében.

A magreceptor szupercsalád fontos tagja a PXR. Aktivációját számos endogén és exogén ligandum kiválthatja, többek között a szteroidok, antibiotikumok, antimikotikumok és epesavak, mely következtében kulcsfontosságú a detoxifikáció szabályozásában, a gyulladásos immunválaszban, a sejtproliferációban, a glükóz, a koleszterin és a lipid anyagcsere folyamatokban, valamint az endokrin homeosztázis fenntartásában. A PXR tumorszuppresszor funkciójú transzkripciós faktor, azonban az általa közvetített tumorszuppresszív hatások molekuláris háttere nem pontosan ismert. Emlődaganat sejtekben apoptózist és sejtciklus leállást váltott ki indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) indukcióján keresztül.

## 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 útvonalaikat, 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 citosztatikus hatásainak vizsgálata egérmódelben.
- 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.

# Eredmények

## **Antitumor hatású indolpropánsav jellemzése emlőkarcinómákban**

### **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 nem volt hatással a primer tumorok kialakulására, ugyanakkor szignifikánsan csökkentette a primer tumorok invazivitását és a környező szövetekbe való beszűrődését, továbbá csökkentette a kialakuló áttétek számát és teljes tömegét. A primer daganatok szövettani elemzése során emelkedett limfocita arányt figyeltünk meg, valamint csökkent az osztódó tumorsejtek aránya az IPA kezelt egerekben.

### **Az indolpropánsav kezelés gátolja az emlőtumor sejtvonalak proliferációját**

*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  $\mu\text{M}$ ). Az IPA szignifikánsan csökkentette a 4T1 sejtek kolónia képző kapacitását, ugyanakkor sem a propidium-jodid pozitív nekrotikus sejtek aránya, sem az AnnexinV-FITC-propidium-jodid kettős pozitív apoptotikus sejtek hányada nem változott. Ezen eredményeket megerősítették SKBR-3 sejteken végzett vizsgálatok is. Ugyanakkor nem-transzformált, humán fibroblaszt sejtek proliferációjára nem volt hatással az IPA kezelés, valamint citotoxicitást sem figyeltünk meg hasonlóan más citosztatikus metabolitokhoz.

### **Az indolpropánsav kezelés az NRF2 expresszió csökkentésével oxidatív stresszt indukál**

A következőkben arra kerestük a választ, hogy az IPA képes-e modulálni, a neoplasztikus sejtekre jellemző folyamatokat. Bár az oxidatív stressz emlődaganatban betöltött szerepe vitatott, több kutatócsoport rámutatott, hogy az oxidatív stressz

fokozódása felelős a citosztázis vagy sejtpusztulás kiváltásáért. Az IPA lipidperoxidációt indukált, melyre tiobarbitursav-reaktív termékek (TBARS) és emelkedett 4-hidroxinonenál (4HNE) képződés utalt. Ezek alapján az oxidatív stressz fokozódására következtethetünk. Az antioxidáns enzimek szabályozásában kulcsfontosságú NRF2 kifejeződése csökkent ezzel párhuzamosan, illetve a nitrozatív stressz kialakításában résztvevő iNOS fokozott expresszióját figyeltük meg. Az IPA hatására emelkedett a tumorsejtek energetikai stressz markereinek (pACC, ACC, FOXO1 és PGC-1 $\beta$ ) expressziója, miközben csökkentette az tumor-iniciáló emlőrák össejtek arányát.

### **Indolpropánsav visszafordítja az epiteliális-mezenchimális tranzíciót (EMT)**

További kísérleteinkben 4T1 emlőtumor sejtekben megfigyeltük az IPA kezelés által előidézett morfológiai változásokat, valamint vizsgáltuk az EMT-ben kulcsfontosságú markerek expressziós szintjét. Az IPA stimulálta az epiteliális morfológiai jegyek megjelenését, mely fokozott MET-re enged következtetni. Impedancia alapú sejtanalizátorral végzett vizsgálatokban (ECIS Z $\Theta$ ) fokozott ellenállást mértünk, ami erősebb sejtkapcsolatokra utal a kontroll csoporthoz képest. Eredményeinket megerősítette a mezenchimális markerek (Vim, Fgfbpl, Snail és  $\beta$ -catenin) jelentősen csökkent expressziója, míg az epitel sejtekre specifikus E-cadherin kifejeződése emelkedett.

### **Az indolpropánsav antineoplasztikus hatásait reaktív intermedierek termelése okozza**

Az EMT folyamatát, valamint a rákos össejtek jellegzetességeit reaktív oxigén- és nitrogén intermedierek modulálják. Annak megértése érdekében, hogy az emlőrák sejtekre kifejtett IPA-vezérelt citosztatikus hatások oxidatív stressz kontroll alatt állnak-e, vizsgáltuk tiol-reduktáns glutation (GSH) és N-acetil-cisztein (NAC), valamint a mitokondriális antioxidáns MitoTEMPO jelenlétében az IPA antitumor hatásait. Az általános tiol-reduktánsok csökkentették a TBARS képződését, míg az ALDH1-pozitív rákos össejt arány csökkenést nem tapasztaltuk, mely az IPA-indukálta hatások gátlására utal. Mindemellert a MitoTEMPO blokkolta az IPA-vezérelt citosztázist. Az eredmények

alapján arra következtethetünk, hogy az IPA által kiváltott reaktív intermedier termelés kulcsfontosságú az IPA-közvetített daganatellenes hatások kialakításában.

### **Az indolpropánsav hatásait AHR és PXR közvetíti**

Az IPA receptorok közül a PXR és az AHR receptorokon keresztül kifejtett hatásokat vizsgáltam részletesen. Az AHR (CH223191) és a PXR (ketokonazol) farmakológiai inhibitorait használtuk annak megerősítésre, hogy az említett receptorok részt vesznek az IPA-indukálta hatás közvetítésében. Az AHR és a PXR blokkolása több IPA által előidézett változást kioltott, gátolta az EMT-t, az ACC foszforilációján keresztül végbemenő AMPK aktivációt, valamint az NRF2 expresszió csökkenését.

### **Citosztatikus hatású indoxil szulfát karakterizálása emlődaganatokban**

#### **Az indoxil szulfát kezelés csökkenti az emlőrák agresszivitását egérmódelben**

Munkám során az IS *in vivo* citosztatikus hatásait 4T1 emlőrák sejtekkel graftolt nőstény BALB/c egérmódelben 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  $\mu\text{M}$  szérumszintnek felel meg, összhangban a humán IS szérumszint referenciáival. Az IS kezelés nem befolyásolta a primer tumorok számát és méretét, ellenben jelentősen csökkentette környező szövetekbe való infiltrációját. Mind az áttétek számában, összességében, mind pedig a metasztázisok egyedi tömegében szignifikáns csökkenést figyeltünk.

#### **Az indoxil szulfát kezelés csökkenti az emlődaganat sejtek proliferációját**

Az IS, hasonlóan más citosztatikus metabolitokhoz több emlőkarcinóma sejtvonal proliferációját (4T1, MCF7, SKBR-3, MDA-MB-231, ZR75-1) gátolta SRB vizsgálatokban, a humán referenciáival megfelelő (0,25-4  $\mu\text{M}$ ) koncentrációtartományban. Az antiproliferatív hatásokat megerősítettük a 4T1 sejtek kolónia formálásának mérésével is. Ugyanakkor az apoptotikus és nekrotikus sejtek aránya nem változott egér és humán emlőtumor sejtekben. Továbbá az IS kezelés nem befolyásolta a nem-transzformált, humán fibroblaszt sejteket.

### **Az indoxil szulfát-mediált oxidatív és nitrozatív stressz**

Kísérleteinkben, hogy az IS daganatellenes funkciójáról minél teljesebb képet kapjunk elsőként a tumor progresszió szabályozásában kulcsfontosságú oxidatív/nitrozatív stressz markereket karakterizáltuk. Mind a TBARS mennyisége, mind a 4HNE kifejeződése szignifikáns emelkedést mutatott a 4T1 tumorsejtekben, melyek a lipid oxidatív károsodás fontos markerei. Ezután a fehérje károsodást és a nitrozatív stresszt jellemző nitrotirozin (NTyr) expressziós profilját vizsgáltuk, amely során a NTyr kifejeződése IS kezelés mellett indukálódott. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy az IPA-hoz hasonlóan az IS kezelés is serkenti a reaktív intermedierek termelését, mely a változások korreláltak az iNOS megnövekedett és az NRF2 csökkent expressziójával. Az NRF2 alulszabályozásából adódóan az antioxidáns enzimek (GPX2, GPX3, SOD3, CAT) expressziója csökkent.

### **Az indoxil szulfát hatása az epiteliális-mezenchimális tranzíció (EMT) folyamatára**

Vizsgáltuk a neoplasztikus folyamatokra jellemző, tumorsejtek vándorlását és invázióját elősegítő EMT-t. Az IS kezelés dóziszfüggően visszafordította az EMT-t, ezzel összhangban sejtadhéziós vizsgálatokban megnövekedett rezisztenciát mértünk, mely szorosabban kapcsolódó sejtek jelenlétére utal. Annak érdekében, hogy megértsük az IS-indukált MET molekuláris mechanizmusát, karakterizáltuk az EMT markereket, mely során jelentősen csökkent a mezenchimális markerek kifejeződése, miközben az epitel sejtekre specifikus gének fokozott expressziót mutattak. Mindemellett IS jelenlétben szignifikánsan csökkent az emlőtumor sejtek migrációja Boyden-kamra kísérletben.

### **Az indoxil szulfát indukálta metabolikus változások**

Az IS által előidézett metabolikus változások feltárásához Seahorse XF96 oximéterrel mértük a glikolízist és a mitokondriális oxidációt, továbbá karakterizáltuk a mitokondriális biogenezist szabályozó gének expresszióját. IS hatására szignifikánsan csökkent az extracelluláris savasodási arány (ECAR). A sejtekben az energiaszenzor útvonal kulcsfontosságú szabályozói indukálódtak (AMPK, ACC, FOXO1), valamint az

ALDH1 pozitív emlőrák őssejtek aránya csökkent, melyet feltételezhetően a sejtanycserében bekövetkezett változások idéztek elő.

### **Az indoxil szulfát az AHR és PXR receptorokon keresztül fejti ki hatásait**

Az indol származékok hatásait az AHR és a PXR jelátviteli útvonalak szabályozzák. Ennek igazolásához farmakológiai inhibitorokat alkalmaztunk, ahol a CH223191 és a ketokonazol egyaránt blokkolta az IS-indukált morfológiai változásokat (MET). Az AHR és a PXR antagonisták gátolták az IS-mediálta lipidperoxidációt, valamint az E-cadherin fehérje szintű kifejeződését a CH223191 inhibitor blokkolta, míg a ketokonazol nem volt rá hatással. Ezzel szemben az ACC és az AMPK foszforilációját mindkét gátlószer megakadályozta.

### **Humán emlőtumoros betegek mintáin végzett tanulmányok**

#### **Az AHR és a PXR expressziója pozitívan korrelál az emlőtumoros betegek túlélésével**

Mind az IPA és mind az IS hatásait az AHR és a PXR receptorokon keresztül fejti ki. Így Kaplan-Meier plotter adatbázis segítségével vizsgáltuk, hogy ezen receptorok expressziója mutat-e összefüggést az emlőrákos betegek túlélésével. Megállapítottuk, hogy az AHR és a PXR magasabb expressziója szignifikánsan hosszabb túléléssel társul. Majd a receptor expresszió függvényében sztratifikálva a betegeket trendszerű hatásokat tapasztaltunk, a magasabb AHR és PXR kifejeződés jobb túlélést biztosított, ugyanakkor ez a védő hatás eltűnt a tripla negatív emlőtumrok (TNBC) esetében.

#### **A SULT és a Cyp2E1 expressziója korrelál az emlődaganatos betegek túlélésével**

A következőkben azt tanulmányoztuk, hogy az IS bioszintézist szabályozó humán enzimek expressziója hogyan befolyásolja az emlőrákos betegek túlélését. Hasonlóan az előbbiekhez, kmpplot adatbázissal végeztünk elemzéseket, mely során a Cyp2E1 enzim izoformák, valamint a SULT1A1 és a SULT1A2 izoformák magasabb kifejeződése egyaránt kedvezőbb túlélést biztosított a betegeknél. Miközben TNBC-ben nem volt hatással a túlélésre, hasonlóan más bakteriális citosztatikus metabolitokhoz.

## **Az AHR és a PXR kifejeződés emlőrákos betegek szövetszövetmintáiban**

*In silico* vizsgálataink eredményeit az AHR és a PXR intratumorális expressziójának karakterizálásával egészítettük ki. Szöveti mikroarray eljárással (TMA) immunhisztokémiai festést végzett kollaborációs partnerünk 88 emlődaganatos beteg archivált szövetszövetmintáinak. Az AHR aktivitást reprezentáló nukleáris AHR kifejeződése csökkent a betegség progressziójával. Ezzel összhangban az invazív dukális karcinómák nem speciális típusaként (NST) azonosított tumorokban alacsonyabb AHR aktivitást tapasztaltunk a lobuláris tumorokhoz képest. A Nottingham grádus emelkedésével csökkent a sejt egészében értékelt PXR kifejeződés, továbbá erősen proliferáló és alacsonyabb differenciáltságú tumorokban alacsonyabb PXR expressziót detektáltunk.

## **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. 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 összevetve, szignifikáns csökkenést figyeltünk meg az *Alistipes shahii* TnaA-t kódoló génjének mennyiségében, valamint hasonló trend volt jellemző a *Bacteroides xylanisolvens* esetében is. Ezt követően a betegség stádiumával korreláltattuk a TnaA-t kódoló gén mennyiségét, mely során 0. klinikai stádiumú (*in situ* karcinóma) betegeknél tapasztaltuk a legkifejezettebb csökkenést.

## **Az E. coli TnaA fehérje expressziója korrelál a tumort infiltráló limfociták számával**

Ismereteink bővítése céljából vizsgáltuk a bakteriális indol bioszintézis kulcsenzimének fehérje szintű változásait. Mellrákos betegek székletében meghatároztuk az *E. coli* TnaA expresszióját, s megállapítottuk, hogy magasabb TnaA expresszióval arányosan emelkedik a TIL aránya. Az eredményekkel összhangban összefüggést mutattunk ki az emlőtumoros betegek *E. coli* TnaA expressziója és a TIL között.

## 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. Az emlő saját mikrobiomában szintén leírtak onkobiózist rosszindulatú emlődaganatokban. A legtöbb vizsgálat a mikrobiom csökkent fajgazdagságát mutatta ki emlőkarcinómában, ennek következtében a bioszintetikus kapacitás korlátozott mértékű, melyet feltehetően a bakteriális metabolitok limitált előállítása és hozzáférhetősége magyaráz. Több bakteriális metabolit, mint a rövid szénláncú zsírsavak, a litokólsav vagy a kadaverin esetében is, mutattak ki citosztatikus hatást emlőkarcinómában. A mikrobiom és az emlőtumoros megbetegedések közötti funkcionális kapcsolatot alátámasztja az a megfigyelés, hogy rendszeres antibiotikum expozíció csökkent bakteriális diverzitást eredményezhet, és növeli az emlőrák incidenciáját és kiújulásának kockázatát, míg a probiotikum expozíció prevenció hatását írták le. Ezen eredmények megerősítik hipotézisünket a csökkent bakteriális fajgazdagság és az emlőrák előfordulása közötti összefüggésről.

### **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 fiziológiás működésére. Kulcsfontosságú szerepet töltenek be elsősorban a bélcsatorna

nyálkahártya homeosztázisának fenntartásában, elősegítik a patogén invázióval szembeni ellenállást, továbbá pro- és antiinflammatorikus citokinek expressziójának szabályozásával befolyásolja a gastrointesztinális immunitást. A bakteriális triptofán metabolitok csökkent mennyisége összefüggésben állhat gyulladásozó bélbetegségek kialakulásával, ezzel összhangban a fokozott IPA bioszintézis protektív hatású volt colitis ulcerosás egerekben. A triptofán metabolizmus változásai kapcsolatban állnak különféle neopláziákkal, jelentősen csökken a szisztémás triptofán koncentráció hematológiai kórképekben, kolorektális-, petefészek-, bőr- és tüdődaganatos betegek szérumban. Ellenben, más vizsgálatok a triptofán metabolitok tumor-promótáló hatásait hangsúlyozzák, ugyanis a triptofán degradáló enzimek (IDO és TDO) fokozott expresszióját figyelték meg a humán tumorok 58%-ában, melyek hozzájárulhatnak a tumorsejtek migrációjához és metasztatizációjához.

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. Az IPA szupplementáció egerekben csökkentette az emlőtumor sejtek invazivitását és a környező szövetekbe történő beszűrődését, ezáltal mérsékelve a kialakuló metasztatizikus 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), az IPA kezelés sem fejtett ki citosztatikus hatást a nem-transzformált fibroblaszt sejtekre.

A normál daganatellenes immunitás kialakulásához kulcsfontosságú a bakteriális közösség diverzitása, továbbá egyes bakteriális metabolitok, köztük a triptofán származékok is hozzájárulhatnak az immunválasz modulálásához. A triptofán, illetve a mikrobiális bontása során keletkező katabolitok hatásait AHR és PXR receptorok közvetítik. A triptofán szegény táplálkozás következtében csökkent indol előállítás AHR-függő módon immunszuppresszív hatású, mely jól korrelál az általunk megfigyelt

emelkedett daganatellenes immunválasszal. Ennek megfelelően a TIL száma egyenesen arányosan növekszik az IPA bioszintéziséért felelős TnaA expresszióval.

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. Mindemellett fokozott iNOS expressziót és mitokondriális reaktív származékok felszabadulását figyeltük meg, mely eredmények korrelálnak a lítokólsav esetében leírt hatásokkal. Habár a fokozott oxidatív-nitrozatív stressz funkciója még tisztázatlan emlődaganatokban, legfrissebb tanulmányokban a prooxidánsok által indukált citosztatikus hatások jelentőségéről számoltak be. Eredményeink arra utalnak, hogy az IPA-mediálta citosztázisoz 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, ezáltal a prooxidánsok fokozott termelése elősegítheti az emlőtumor sejtek összejt-szerű tulajdonságainak elvesztését. Kísérleteink során az IPA kezelés csökkentette az emlőrák összejtek arányát, míg hatását a tiol-reduktánsok jelenléte megakadályozta.

Az onkobiótikus transzformáció EMT-ben, valamint metasztázisok kialakulásában betöltött szabályozó funkcióját számos közleményben kifejtették. Tanulmányunkban az IPA több mikrobiális metabolittal megegyezően MET-et indukált, mely lassítva a sejtek migrációját és invázióját csökkentette emlőtumor sejtekkel graftolt egérmódelben a metasztázisok számát. Ezen eredmények mellett a mitokondriális biogeneizist stimuláló transzkripciós faktorok (AMPK, FOXO1 és PGC1 $\beta$  kifejeződése AHR/PXR-függő módon indukálódtak. Az irodalmi adatokkal összhangban az energiaszenzor útvonal kulcsfontosságú enzimeinek aktiválása és fokozott expressziója az emlőrákos betegekben hosszabb túléléssel társult.

Kutatásunk második részében karakterizáltuk az IS emlőtumor sejtekre gyakorolt hatásait. Az IS daganatellenes funkcióit az IPA-val megegyezően AHR és a PXR receptorok szabályozzák. 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 háttérében az indol-mediált jelátvitel fokozatos elvesztése állhat.

Sejtes és állatmodellben az IS kezelés 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. Egyéb bakteriális metabolitokhoz hasonlóan az IS tumorszuppresszív hatásának molekuláris mechanizmusa elsősorban az EMT reverzibilitásán alapszik. 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 hatására csökkent a mezenchimális markerek (Vim, Fgfbpl, Tgfb3, MMP9, Snail és  $\beta$ -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 indolpropánsavhoz - a redox-homeosztázis felborulását eredményezve oxidatív-nitrozatív stresszt indukált. A fokozott prooxidáns felszabadulás által kiváltott változások kulcsfontosságú szereppel bírnak az emlőkarcinóma sejtek citosztázisában, valamint csökkentették az emlőrák összejekt arányát, hozzájárulva az IS-indukált antitumor hatás kialakulásához. Mindemellett jelentős metabolikus változásokat detektáltunk IS kezelés során, melyek szintén elősegíthetik az emlődaganat összejekt szuppresszióját és a tumorsejtek citosztázisát eredményezik.

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.

### **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. Kimutatták, hogy az IS szint mind az ösztrogén receptor pozitív (ER+), mind a negatív (ER-) emlőrákos esetekben alulszabályozott, míg a proliferációs marker Ki67 pozitivitás az IS mennyiségével negatívan korrelált rosszindulatú emlődaganatokban. 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. 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. A leírtakat összegezve úgy tűnik, hogy az onkobiózis 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 és farmakológiai vizsgálatok. Ezen tanulmányok citosztatikus hatású bakteriális metabolitok és onkobiom komponensek azonosításával új perspektívát nyitnak a rosszindulatú emlődaganatok terápiájában.

## Összefoglalás

Az emberi test felszínén és a testüregekben számos baktériumfaj él a gazdaszervezettel dinamikusan egységet képezve, melyek különböző bakteriális metabolitok bioszintézisének 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 indoxil szulfát 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 szérumban megfelelő koncentrációknak 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 metasztatikusok 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 metabolit 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 daganatsejtek arányát csökkentve hozzájárul az antitumor hatás kialakulásához. Ezen eredményeket megerősítettük az IPA-indukált oxidatív hatások, valamint összejt-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 tumorsuppresszív 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.



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., Vigh, 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 alapjául szolgáló közleményekre): 12,252**

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

Debrecen, 2020.12.22.

