

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Antineoplasztikus hatású bakteriális metabolitok azonosítása és jellemzése emlőtumorban

Ujlaki Gyula

Témavezető: Prof. Dr. Bay Péter



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2024

Antineoplasztikus hatású bakteriális metabolitok azonosítása és jellemzése emlőtumorban

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

Írta: Ujlaki Gyula, okleveles molekuláris biológus

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. Köröskényi Krisztina, PhD
Dr. Pankotai Tibor, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora
tagok: Dr. Köröskényi Krisztina, PhD
Dr. Szatmári István, PhD
Dr. Pankotai Tibor, PhD
Dr. Apáti Ágota, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,
Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2024. október 21., 14:00 óra

Bevezetés

Az emlőtumor

A malignus daganatok összetett, szisztémás betegségek, celluláris és genomi változások eredményei, melyek egyre súlyosabb egészségügyi problémát jelentenek Magyarországon. A Nemzeti Rákregiszter adatai szerint 2020-ban 7144 új páciensnél azonosítottak malignus emlődaganatot.

Az Egyesült Államokban az emlőrák a második leggyakoribb malignus halálozási ok a nők körében. Európában évente körülbelül egy millió esetet diagnosztizálnak, a becsült éves halálozási arány pedig 23,1 haláletet 100 000 lakosra. Az American Cancer Society 2019-es emlőrák jelentése szerint az emlőrák előfordulása évente átlagosan 0,3%-kal nőtt 2012 és 2016 között. Mindazonáltal, a halálozási arány az utóbbi évtizedekben jelentősen csökkent a rendszeres szűrés széleskörű elterjedésének köszönhetően. Az Amerikai Egyesült Államokban 2022-ben 287 850 újonnan diagnosztizált invazív emlőrákesetet és 51 400 újonnan diagnosztizált *in situ* emlőrákesetet regisztráltak. Statisztikai becslések szerint 2022-ben az Egyesült Államokban 43 250 nő halt meg emlőrákban. Az emlőrák előfordulása jelentős földrajzi és gazdasági különbségeket mutat, a fejlett országokban magasabb az előfordulási aránya. A szűrési programok népszerűsítése és ennek következtében a korai felismerés miatt az emlőrák ötéves túlélési aránya 99% *in situ* emlőrák esetén, 86% regionális nyirokcsomó-áttétet képzett emlőrák esetén, és 30% távoli áttétet képzett emlőrák esetén a SEER adatbázis szerint.

Az emlőrák kialakulásának kockázati tényezői:

- Nem és életkor,
- Genetikai és epigenetikai tényezők, ideértve a BRCA1 és BRCA2 génmutációkat, az epidermális növekedési factor receptor (EGFR) és human epidermális növekedési faktor receptor (HER2) magas expresszióját,
- Hosszantartó hormon expozíció, mint például a fogamzásgátlók, hormonpótló terápiák használata, valamint korai menarche vagy késői menopauza,
- Emlőrák vagy más neoplasztikus betegségek a családi anamnézisben,
- Elhízottság, rendszeres dohányzás és alkoholfogyasztás,
- Sűrű (denz) emlőszövet.

Ezzel szemben a terhesség, a szoptatás, a rendszeres testmozgás és az egészséges életmód, a káros szenvedélyektől mentes élet csökkentheti az emlőrák hajlamát.

Sejtprolifерáció az emlőtumorban

Az egészséges szövetekben a növekedést elősegítő jelátviteli fehérjék kifejeződése szigorúan szabályozott folyamat, így fenntartva a szövet homeosztázisát, szerkezetét és funkcióját. Ezzel szemben a rákos sejtek képessé válnak a proliferatív jelek fenntartására és ezzel együtt a folyamatos sejtosztódásra, ezáltal felborítva a normális szöveti szerkezetet.

A tumorsejtek a folyamatos növekedési szignált fenntarthatják:

- növekedési faktorok túlzott expressziójával
- saját növekedési faktorok termelésével (autokrin jelátvitel)
- a növekedési faktorok jelátvitelében bekövetkező mutációval.

A növekedési faktorok jelátvitelében bekövetkező mutációk gátolhatják az apoptózist, befolyásolhatják a sejtciklusból való kilépést és a sejtciklus progresszióját. Ezek a génmutációk jellemzően a MAPK, PI3K, Akt és mTOR jelátviteli útvonalakban következnek be. Az említett hatásokon túl ezeknek a mutációknak szerepük van a hagyományos terápiás megközelítésekkel szembeni rezisztenciában is.

A neoplasztikus sejtek a növekedési kontroll elvesztésével képessé válnak a tumorszuppresszor fehérjék általi növekedés gátlás és eliminálás elkerülésére is. Ezek a tumorszuppresszor fehérjék gátolják a mutációt szenvedett sejtek osztódását a sejtciklus szabályozásán keresztül, szenescenciát, kritikus károsodott sejtek esetében pedig nyugalmi állapotot vagy apoptózist idéznek elő. Genetikai mutációk nem kizárólag csak növekedési faktorok jelátvitelében következhetnek be. A tumorok 70%-ában a tumorszuppresszor gének mutációt szenvednek. A két legfontosabb tumor szuppresszor a Retinoblastoma fehérje (Rb) és a tumor protein 53 (p53), melyek a sejtciklusban G0/G1 ellenőrzőpont fenntartásában játszanak fontos szerepet.

A folyamatos sejtosztódás szakirodalma kiterjedt, ezért a továbbiakban az eredményeink értelmezéséhez fontos jelátviteli útvonalak tárgyalására összpontosítunk. Az emlőtumorok proliferációjában a Wnt/ β -catenin útvonal kulcsfontosságú szerepet tölt be. Azok a mutációk, melyek a β -catenin, vagy a β -catenin targeteinek stabilizálódását idézik elő, gyakran hozhatók összefüggésbe a tumor agresszivitással. Ha a WNT útvonal downregulált, a β -catenin-t a

ubikvitinálja és foszforilálja GSK-3 $\alpha\beta$ a lebontó komplexben. Ez a β -catenin degradálásához vezet. Ellenkező esetben, amikor a WNT útvonal upregulált, a GSK-3 $\alpha\beta$ nem foszforilálja a β -catenint. Ebben az aktív állapotban, a β -catenin a nukleuszba transzlokálódik, ahol a CYCLIN D1, c-MYC, PDK, MTC-1, MMP7, fibronectin, COX2 és AXIN-2 gének kifejeződését idézi elő. A szakirodalom alapján úgy tűnik, a konstitutív β -catenin szignaling támogatja az őssejtek növekedését és túlélését a tumorfejlődés korai stádiumában. A β -catenin útvonal konstitutív aktivitása gyakran összefügg a CTNNB1, APC, AXIN-1 és AXIN-2 gének mutációjával. A β -catenin aktivitásának értékeléséhez általában szükséges a GSK-3 $\alpha\beta$ foszforiláltsági állapotának mérése is, mivel a GSK-3 $\alpha\beta$ foszforilált állapotában (inaktivált) nem képes foszforilálni a β -catenint, mely a β -catenin lebomlását gátolja.

EMT az emlőtumorban

A tumorsejtek általában elveszítik epithelialis morfológiájukat, mely folyamatot epitheliális-mesenchymális tranzíciónak (EMT) hívunk. Az EMT egy összetett biológiai folyamat, mely során az epithelialis sejtek molekuláris változások sorozatán mennek keresztül, aminek eredményeként mesenchymális fenotípusra jellemző tulajdonságokat vesznek fel. Általában ezek a mesenchymális sejtek elveszítik a képességüket fokális adhézióra és mobilissá válnak. Ez a mobilitás lehetővé teszi a daganatsejtek terjedését és a metsztázis kialakulását. Ez a folyamat kulcsfontosságú szerepet játszik az embriogenezis során, a szövetjavításban és a sebgyógyulásban, mivel ezek a sejtek migrációs képességgel rendelkeznek. Az EMT különböző patológiai folyamatokban is szerepet játszik, ideértve a tumorprogressziót és metasztázist.

A folyamat során az epithelsejtek az őket körülvevő (mikro)környezettől kapott jelek vagy az EMT jelátvitelben bekövetkező mutációk válaszként EMT-n mennek keresztül. Az EMT tanulmányozása kihívást jelent, mivel a sejt morfológia és a molekuláris jellemzők általában nem mutatnak egyértelmű képet, nem utalnak kizárólag epithelialis vagy mesenchymális fenotípusra. Bizonyos citokinek, például a transforming growth factor- β (TGF- β), a fibroblaszt növekedési factor (FGF) család, az epidermális növekedési factor (EGF) és a hepatocita növekedési factor (HGF) EMT-t indukálnak vagy elősegítenek. Ezek az EMT-indukáló szignálok specifikus transzkripciós faktorok, például Snail transzkripciós represszor fehérjecsald (SNAI), a Twist fehérjecsald BHLH transzkripciós faktor (TWIST), a Cink-ujj E-boksz binding homeobox (ZEB) és a β -catenin kifejeződését elősegítik. Az EMT transzkripciós faktorok gyakran működnek együtt

miRNS-ekkel és különböző epigenetikai és posztranszlációs szabályozókkal, így összehangolva az EMT folyamatát. Az miR-34a megakadályozza a TGF- β által indukált EMT-t és szabályozza a SNAI1 expresszióját a 3'-UTR-n keresztül. Ezen felül a SLUG és ZEB1 kifejeződését is gátolja. A tumorsejtek általában egy spektrumot mutatnak az epithelialis-mesenchymalis jellemzőiket illetően: az E-cadherin, az occludinok és a citokeratinok gyakran epithelialis markek, míg az N-cadherint és vimentint mesenchymalis markerek. Az E-cadherin és az occludinok az epithel sejtek felszínén található zonulae occludens részei, ahol fő szerepük a sejt-sejt kapcsolatok fenntartása, míg a citokeratinok a citoszkeleton intermedier szálainak tagjai. A mesenchymális markerek közé sorolható N-cadherin is közvetíti a sejt-sejt adhéziót, de az EMT során a sejt viselkedésének változásait a migrációs fenotípus irányában segíti. A vimentin egy intermedier filamentum fehérje, amely az EMT fenotípussal társul. A legutóbbi kutatások azt mutatták, hogy bizonyos daganatos sejtek kifejeznek mind epithelialis, mind mesenchymalis markereket.

A tumorsejtek energiaháztartása

A gliklízis során képződő piruvát, leggyakrabban a piruvát-dehidrogenáz (PDH) komplexen keresztül alakul át, acetyl-koenzim A-vá. Az acetyl-koenzim A ezt követően oxalacetáttal egyesülve citráttá alakul, a citrát-szintáz enzim hatására. A keletkező citrát vagy izocitráttá alakul a TCA-ciklusban, vagy elhagyhatja a mitokondriumot. A citoszolba kerülő citrátot az ATP citrát liáz acetyl-koenzim A-vá alakítja. A citoszolikus acetyl-koenzim A *de novo* lipid bioszintézis és a fehérje acetylációs rendszer szubsztrátja. A piruvát-citrát inga megfelelő működése kulcsfontosságú a zsírsavak és koleszterin szintéziséhez, valamint a fehérje acetyláláshoz. Bizonyos kivételekkel, például hipoxia esetén, a legtöbb rákos sejt számára a lipogén acetyl-koenzim A fő forrása a PDH-útvonalon glükózból keletkező piruvát.

A szénhidrátok mellett az aminosavak is fontos szerepet játszanak mitokondriális anyagcsere alapjaként, melyből lipidek, fehérjék és más molekulák képződnek. A tumor szempontjából különösen fontosak a glutation, prolin, aszpartát és alanin feldolgozásában részt vevő mitokondriális enzimek. A glutation fontos anaplerotikus szubsztrát, hozzájárul a TCA-ciklus intermediereinek újbóli feltöltéséhez. A glutationból származó szén beépülhet az acetyl-koenzim A-ba és így részt vehet a *de novo* lipid szintézisben.

Az aminosavak és a lipidek szintézise mellett a nukleotidok szintézise is jelentősen támaszkodik a mitokondriális anyagcsere és az ahhoz kapcsolódó intermedierekre. Míg a

nukleotidok ribóz része kizárólag a citoplazmában keletkezik, számos komponens nélkülözhetetlen a pirimidin és a purin bázisok felépítéséhez.

A sejttanyacsere változásai összefüggnek a sejtes energia-érzékelő rendszer bonyolult átprogramozásával. Ezek között a szenzorok között szerepel az mTOR, a forkhead box O1 (FOXO1), az adenosin monofoszfát-aktivált protein kináz (AMPK), valamint a peroxiszóma-proliferátor-aktivált receptor gamma koaktivátor 1 α és 1 β (PGC-1 α és PGC-1 β) hálózata. Az mTOR komplexek (mTORC1 és mTORC2) indukciója fokozza azoknak a géneknek az expresszióját és aktivitását, amelyek részt vesznek a Warburg-hatás és a glutaminolízis folyamataiban. Eközben a FOXO1 transzkripció faktor főként sejtciklus leállást vagy a sejtosztódási kapacitás csökkenését idézi elő az mTORC1 gátlásán keresztül, aminek eredményeként a tumornövekedés gátolt. Az emlőrákban az AMP-aktivált kináz (AMPK) serin/threonin kináz aktivitása alacsony. Az alacsony AMPK aktivitás aerob glikolízissel (Warburg hatással) és felgyorsult tumor növekedéssel mutat összefüggést. Az AMPK-n kívül anti-Warburg hatású a PGC-1 α és PGC-1 β , illetve a nuclear respiratory factor (NRF1). Az emlőrákban, a Warburg típusú metabolikus átrendeződés terápiás kezelése csökkentheti a rákos sejtek osztódási sebességét, tehát ezen útvonalak gyógyszeres befolyásolása ígéretes célpontnak tűnik.

A bél mikrobiom

A mikrobiom kifejezés a mikrobiális fajok egy kompartmenten belüli együttesét jelenti, melyek azonosítása új-generációs szekvenálással történik. A mikrobiomot a fajok számával és az fajon belüli egyedek sokaságával jellemezhetjük egy adott térben. A mikrobiom változatossága magába foglalja az egyes baktériumfajok egyedei közti genetikai változatosságot. A mikrobiom számos bioaktív vegyületet állít elő, beleértve az enzimeket és a vitaminokat is. A mikrobiom összetételében bekövetkező változásokat diszbiózisnak nevezünk.

A mikrobiom változatosságát olyan tényezők befolyásolják, mint például az egyén életkora, etnikuma, hormonszintje és életmódbeli választásai. Ilyen életmódbeli választás például az étrend, prebiotikumok és probiotikumok fogyasztása, a stressz, a higiénia, az alkoholfogyasztás és a dohányzási szokások. Antibiotikumok használata, iatrogén tényezők, például kemoterápia és sugárkezelés szintén jelentős hatással van a mikrobiom összetételére. A mikrobiom összetétele személyenként jelentősen eltérhet, és minden egyes egyén mikrobiális ujjlenyomata egyedi.

A bél mikrobiom diszbióza emlőtumorokban

Emlőtumorok esetében az emlőszövet, a tejcsatornák, a bélrendszer, a húgyutak és az emlőtumor saját mikrobiomjában diszbiózis (onkobiózis) következik be. A daganatszövetben vírusokat (humán papillomavírus, Herpesvirida, Retroviridae, Parapoxviridae, Polyomaviridae, Papillomaviridae), gombákat és parazitákat is találtak, bár ezek a markerek nem mindig találhatók meg minden egyénben. Az onkobiom részét képező mikrobiom összetétele összefüggést mutat az emlőrákos betegek túlélésével. A mikrobiom már elismert része a tumor mikrokörnyezetnek. Az emlőtumor kockázati tényezői között szerepel a csökkent diverzitás, sűrű emlőszövet, korai menarche, alacsony fizikai aktivitás, és magas BMI. Ezen túlmenően az antibiotikumok túlzott fogyasztása csökkenti a mikrobiom diverzitását, ami az emlőtumor kialakulásának kockázatát növeli, míg probiotikumok fogyasztása a biodiverzitást növeli és jótékony hatású.

A bél mikrobiom és az emlődaganat egymástól távol helyezkedik el, ezért a kompartmentek között jelátviteli utak közvetítenek. Azok a bélbaktériumok, amelyek kifejezik a béta-galaktózidázokat (gus és BC gének), képesek a konjugált ösztrogének dekonjugálására. Emlőtumorban az onkobiom ösztrogén dekonjugációs kapacitása megnő az eubiomhoz képest, így képes segíteni az ösztrogénreceptor pozitív (ER+) emlődaganatokat.

A mikrobiom bioaktív metabolitokat választ ki, amelyek – hasonlóan a hormonokhoz – a véráramba kerülve eljutnak a daganatsejtekhez és ott pro- vagy antineoplasztikus hatást fejtenek ki. Tekintettel arra, hogy a testben a bél mikrobiomban található a legtöbb baktérium, anyagcsere kapacitása jelentős. Az onkobiom bioszintetikus kapacitása az eubiomhoz képest viszont jelentősen lecsökken. Több bioaktív bakteriális metabolitot fedeztek fel eddig, amelyek befolyásolhatják az emlőtumor sejtek viselkedését. Ilyen metabolitok a kadaverin, a másodlagos epesavak, indol metabolitok, valamint a rövidszénláncú zsírsavak (SCFA-k). Ezek a metabolitok különböző folyamatokat szabályoznak a karcinogenezisben, például a sejtosztódást, az epithelialis-mesenchymalis tranzíciót (EMT) és az oxidatív stresszt. Ezen metabolitok mellett valószínűleg más, még felfedezetlen bakteriális metabolitok is léteznek, amelyek bioaktívak lehetnek a mellrákban.

A másodlagos epesavak szintézise és reabszorpciója

Az epesavak az emberi emésztésben fontos molekulák, melyek részt vesznek a táplálkozási zsír felszívásában. A máj naponta körülbelül 200-600 mg elsődleges epesavat szintetizál

koleszterinből. Két elsődleges epesavat ismerünk, a kólsavat és a kenodezoxikólsavat. Hozzávetőlegesen naponta a teljes epesav mennyiség 5%-a ürül ki széklettel, míg a többi a vékonybél terminális részén visszaszívódik, és belép az enterohepatikus körforgásba. A teljes epesav mennyiség körülbelül 3g. Az elsődleges epesavak szintézise 17 különböző enzim aktivitását igényli, amelyek különböző sejt-kompartmentekben találhatóak, beleértve a citoplazmát, az endoplazmatikus retikulumot, a mitokondriumot és a peroxisómát. A klasszikus szintézisben a kulcsfontosságú kezdeti reakciót a koleszterin 7 α -hidroxiláz (CYP7A1) katalizálja, Ez a reakció az epesavszintézis sebességmeghatározó lépése. A szterol 12 α -hidroxiláz (CYP8B1) jelenléte a szintézis végtermékeként kólsavat eredményez, míg hiánya a kenodezoxikólsav képződését eredményezi. Az alternatív útvonalon a szterol 27-hidroxiláz (CYP27A1), egy mitokondriális citokróm P450 enzim, katalizálja az első reakciót. A májban szintetizált epesavak mindössze 9%-a képződik ezen az alternatív útvonalon. Szintézis után a legtöbb epesav karboxilcsoportja vagy glicinnel, vagy taurinnal konjugálódik. A disztális ileumban a konjugált kólsav és kenodezoxikólsav dekonjugálódik, majd a bakteriális 7 α -hidroxilázok alakítják ezeket olyan másodlagos epesavakká, mint a dezoxikólsav és a litokólsav. Emellett a bakteriális epimerázok segítik a kenodezoxikólsav 7 α -hidroxilcsoportjának 7 β -hidroxilcsoporttá történő átalakítását, mely reakció termékeként urzodezoxikólsav képződik. A másodlagos epesavak előállításában résztvevő bakteriális enzimek a másodlagos epesavak által indukálható (bile acid inducible – bai) operonban kódoltak. Az epesavak transzformációja miatt a másodlagos epesavak hidrofób tulajdonságai megváltoznak, ami miatt elveszítik képességüket a baktériumok elleni detergensként vagy toxinokként való működésre. A transzformációt követően az epesavak visszaszívódnak a vékonybél terminális részén, és belépnek az enterohepatikus körforgásba, ahol visszakerülnek a májba. Azonban az epesavak egy kis része elkerüli a májban történő feldolgozást és a szisztémás keringésben maradnak, így a véráram útján eljuthatnak a test távoli részeire.

Az epesavak anyagcseréjének és jelátvitelének rendellenessége szerepet játszik különféle daganattípusokban. Bizonyos epesavak, különösen a másodlagos epesavak, daganatot elősegítő hatásokkal rendelkeznek. Aktiválhatják a sejtosztódásban, túlélésben és gyulladásban szerepet játszó jelátviteli útvonalakat. Az epesavak DNS-károsodást és genomi instabilitást idézhetnek elő, hozzájárulva a rák kialakulásához és progressziójához. Az epesavak képesek kölcsönhatásba lépni specifikus receptorokkal is, például a farnezoid X receptorral (FXR) és a G-fehérje-kapcsolt epesav receptorral 1-el (TGR5), amelyek különböző szövetekben fejeződhetnek ki, beleértve a

májat, beleket és vastagbelet. Az epesavak által kiváltott receptor aktivitás befolyásolja a gének kifejeződését, ami befolyásolhatja a daganatok kialakulását. Egyes epesavak azonban lehetnek antitumor tulajdonságúak is. Például az urzodezoxikólsavat (UDCA) a potenciális sejtproliferációt gátló és apoptózist előidéző hatása miatt vizsgálták májtumor sejteken.

A bél mikrobiom szerepet játszik az epesavak anyagcseréjében, és a bél mikrobiális összetételének változása befolyásolhatja az epesavak profilját. Az epesavak és a mikrobiális összetétel közötti kapcsolat nem egyirányú; az epesavak is befolyásolják a bél mikrobiom összetételét. Az epesavak hatása a bél mikrobiomra valószínűleg annak eredménye, hogy megváltoztatják a baktériumok környezet érzékelését, vagyis a quorum sensing-et. A quorum sensing mechanizmus során a környezetben lévő sejtek számának függvénye a génaktiválódás. A környezet érzékelésében részt vevő baktériumok szignál molekulákat termelnek és szabadítanak fel, amelyeket autoinduktoroknak nevezünk, és amelyek felhalmozódnak a sejtpopuláció növekedésével. Amikor ezeknek az autoinduktoroknak a koncentrációja eléri egy küszöbértéket, ez választ vált ki a génexpresszióban. Mind a Gram-pozitív, mind a Gram-negatív baktériumok használnak quorum sensing rendszert, hogy biológiai folyamatok széles spektrumát szabályozzák, beleértve a virulenciát, a kompetenciát, a kojugációt, az antibiotikum szintézist, a mozgást, a sporulációt és a biofilmek kialakítását. Ebben az összefüggésben az epesavak szerepet játszhatnak a quorum sensingben, mivel befolyásolják a bél mikrobiom összetételét.

A vékonybél mikrobiom kulcsfontosságú szerepet játszik az elsődleges epesavak másodlagos epesavakká történő átalakításában. Ennek eredményeként a másodlagos epesavak által okozott változások közvetlenül jelentik az vékonybél mikrobiom hatását. Vizsgálataink során három fő másodlagos epesavra összpontosítottunk – litokólsav (LCA), dezoxikólsav (DCA) és urzodezoxikólsav (UDCA). Kísérleteink során a másodlagos az epesavakat olyan koncentráció tartományban alkalmaztuk, mint a szérumban referenciatartományuk (LCA: 31 nM, DCA: 701 nM, UDCA: 147 nM), és emlőciszta folyadék referenciatartományuk (LCA: 9-23 μ M, DCA: 17-160 μ M).

Konvolúciós neurális hálózatok a képelemzésben

Objektumok detektálása – például sejtmagok detektálása – hagyományos szegmentálási módszerek esetében az egyes adatkészletek között paraméter finomhangolást igényel. Ez a megközelítés kísérletek között nagyban növeli az eredmények szórását – például a rosszul

beállított detektálási paraméterek a minták jelölési hibáinak detektálását is eredményezi, miközben halvány de valódi jeleket nem érzékel a rendszer. Az utóbbi évtizedben a konvolúciós neurális hálózatok megoldották ezt a problémát a képelemzésben, szemantikus szegmentáló modellek használatával. Ennek segítségével nagy áteresztőképességű mikroszkópai képek szegmentálása standardizálható az egyes kísérletek között is.

A konvolúciós neurális hálózatokat (CNN) évek óta használják úgynevezett „computer vision” feladatok megoldására. Azonban valódi potenciáljukat csak 2012-ben, az ImageNet versenyen fedezték fel, ahol hatékonyságukat a grafikus feldolgozó egységek (GPU-k) kapacitásának, a „rectified linear unit” (ReLU) aktiváció, „dropout” szabályozás és hatékony adatdúsítás (data augmentation) használatával együtt mutatták be. A CNN-ek népszerűvé váltak nemcsak a computer vision területtel foglalkozó szakemberek körében, hanem különféle alkalmazásokban is, például természetes nyelv feldolgozásban, hiperspektrális képek elemzésében és orvosi képanalízisben. A CNN-ek fő ereje abban rejlik, hogy mély architektúrával rendelkeznek, ami lehetővé teszi a képek jellemzőinek kinyerését több absztrakciós szinten. Azonban egy mély CNN teljes tanítása a nulláról kihívásokkal jár. Először is, a CNN-ek számottevő mennyiségű annotált tanítási adatot igényelnek, ami gyakran problémát okoz az orvosi területen, ahol a szakértői annotációk beszerzése költséges lehet. Másodszor, a mély CNN tanítás jelentős számítási és memória erőforrást igényel, különben a folyamat túlzottan időigényessé válik. Harmadszor, a túltanulás (overfitting) és a konvergencia problémák gyakran bonyolítják a mély CNN tanítását, ami a hálózat architektúrájának vagy tanulási paramétereinek iteratív beállítását igényli a hatékony tanulás biztosításának érdekében. Ennek eredményeként a nulláról való mélytanulás fáradtságos és időigényes lehet, továbbá jelentős szakértelmet és türelmet igényel. Azonban a nulláról való mély tanulás mellett van lehetőség arra, hogy már meglévő, nagy mennyiségű annotált adaton tanított CNN-t finom hangoljunk (fine tuning). Ilyen előtanított modelleket sikeresen alkalmaztak különféle computer vision feladatokban, mellyel kinyerték a képek tulajdonságait, vagy a modell teljesítményét referenciapontként használták.

A konvolúciós neurális hálózatok (CNN) fontos jellemzője az előtanított CNN súlyainak átvihetősége. A kutatások azt mutatják, hogy a súlyok, vagyis a tanult paraméterek átvitelének hatékonysága függ a tanításhoz használt adatkészlet és az átvitel céljaként használt adatbázis közötti különbségtől. Bár a természetes képadatbázisok és az orvosi képalkotási adatbázisok jelentősen különböznek egymástól, a legújabb kutatások ígéretes lehetőséget mutatnak a

súlyátvitelre az orvosi képképzés területére. A módszer egy alkalmazási módja egy előre tanított CNN használata a jellemzők kinyerésére (feature extraction). Ebben a megközelítésben az előre tanított CNN-t egy bemeneti képen használják, és a CNN jellemzőket generál (kinyer) a hálózat adott rétegeiből. Ezeket a kinyert jellemzőket aztán új mintázat osztályozó tanításához használják, amit a konvolúciós neurális hálózat kimeneti rétegének is neveznek.

Bizonyos vizuális feladatok esetén, különösen az orvosi képfeldolgozásban (például a sejtmagok szegmentálása), a kívánt eredmény magában foglalja a lokalizációt, ami azt jelenti, hogy minden képpontot osztályhoz kell rendelni. Ezenkívül ezernél több tanításhoz használt kép előkészítése gyakran kihívást jelent az orvosi feladatokban. Ezeket a problémákat megoldandó, egy csúszó ablakos módszert alkalmaznak a hálózat tanításához, ahol a cél az, hogy a hálózat minden képponthez osztályt rendeljen, bemenetként használva az adott képpont körüli területet. Ez a megközelítés két előnnyel is jár. Először is, a hálózat képes a lokalizáció elemzésére is. Másodszor, a darabok formájában rendelkezésre álló tanítási adat szignifikánsan nagyobb a tanításhoz használt képek számánál. Azonban ennek a stratégiának két hátránya is van. Viszonylag lassú, mivel a hálózatot külön-külön futtatni kell minden darabhoz, és redundancia van az átfedések miatt. Tehát a lokalizáció pontossága és a kontextus használata között van egy kiegyensúlyozandó tényező. A nagyobb darabok több kontextusinformációt szolgáltatnak, de csökkenthetik a lokalizáció pontosságát a max-pool rétegek számára. Ezzel ellentétben, a kisebb darabok jobb lokalizációs pontosságot tesznek lehetővé, de korlátozott kontextusinformációt biztosítanak. Újabb megközelítések olyan jellemzők használatát javasolják, mely figyelembe veszi több réteg kimenetét. Ez lehetővé teszi a jó lokalizációt miközben a kontextust is figyelembe veszi. Ezt a módszert, ami pixelek osztályozását több réteg kimeneti értékéből végzi, szemantikus szegmentálásnak nevezzük.

Az orvosi képanalízisben, CNN-el végzett szemantikus szegmentálásnak a számítógép-segített detektálási rendszereken túl is van szerepe. Az utóbbi időben használják nyaki intimamédia vastagság mérésére ultrahangképekben, hasnyálmirigy szegmentációra CT-képekben, agydaganat szegmentációra MRI felvételeken, multimodalitású izointenzív csecsemő agyi kép szegmentálásra, térdporc szegmentálásra MRI felvételeken, és még sok más alkalmazási területen, amely túlnyúlik e rövid áttekintés határain. Az elmúlt évtized során számos népszerű szemantikus szegmentálási modell jelent meg az orvosi képelemzés területén:

- A UNet kiemelkedik az orvosi képek szegmentálásának területén, a modell szimmetrikus kódoló és dekódoló struktúrát tartalmaz, melyek között úgynevezett „skip” kapcsolatok vannak.
- A DeepLab „atrous” konvolúciókat használ többszintű kontextus kinyeréshez.
- A Mask R-CNN-t eredetileg egyedi objektumok szegmentálására tervezték, de a szemantikus szegmentálás területén is széleskörűen alkalmazott modell.
- PSPNet: A Pyramid Scene Parsing Network egy kódoló-dekódoló struktúrán alapul, és széleskörben elfogadott és alkalmazott különböző területeken, beleértve az orvosi képek szegmentálását is.
- LinkNet: Egy könnyű architektúra a szemantikus szegmentálási feladatokhoz, amely népszerűséget szerzett a számítási hatékonyságával.

Célok

Az emésztőrendszeri mikrobiomban bekövetkező diszbiózis különböző betegségekkel hozható összefüggésbe, beleértve az emlődaganatokat. Célunk olyan bélflóra által szintetizált bakteriális metabolitok azonosítása és jellemzése volt, melyek a véráram révén elérhetik az emlődaganat sejteket, és módosíthatják a daganatsejtek jelátviteli útvonalait, beleértve a sejtproliferációs és EMT útvonalakat. Ebből kifolyólag céljaink a következők voltak:

1. A litokólsav citosztikus hatásainak értékelése.
2. A litokólsav hatásainak értékelése az epithelialis-mesenchymalis tranzícióban.
3. A litokólsav hatásainak értékelése a sejten belüli energiametabolizmusra.
4. A litokólsav hatásáért felelős receptor meghatározása.
5. Egy potenciálisan antineoplasztikus hatású bakteriális metabolitokból álló könyvtár létrehozása.
6. High Content Screening módszer létrehozása és bevezetése a sejtproliferáció és EMT vizsgálatára.
7. Citosztatikus bakteriális metabolitok azonosítása a metabolit könyvtárban.
8. Olyan bakteriális metabolitok azonosítása, melyek befolyásolják az epithelialis-mesenchymalis tranzíciót.

Anyagok és módszerek

Sejtkultúrák

A sejteket 37 °C hőmérsékleten, 5% CO₂ mellett tartottuk fenn. Munkánk során a 4T1 egér emlőkarcinóma, MCF7 humán emlőkarcinóma, SKBR3 humán emlőkarcinóma, A2780 humán ovárium karcinóma, és Capan2 humán pankréász adenokarcinóma sejtes modelleket és humán primer fibroblaszt sejteket használtunk. A fenntartáshoz használt médiumok pontos összetételét az **1. Táblázat** tartalmazza.

1. Táblázat. Sejtkultúra médiumok összetétele.

Sejtvonal	Médium	Katalógus száma	FBS	Penicillin/ Streptomycin	L-glutamine	HEPES	piruvát
4T1	RPMI-1640	Sigma R5886	10 %	1 %	2 mM	-	1 %
A2780	RPMI-1640	Sigma R5886	10 %	1 %	2 mM	-	-
MCF7	MEM	Sigma M8042	10 %	1 %	2 mM	-	-
Capan2	MEM	Sigma M8042	10 %	1 %	2 mM	-	-
SKBR3	MEM	Sigma D6429	10 %	1 %	2 mM	10 mM	-
Primary fibroblasts	DMEM low glucose	Sigma D5546	20%	1%	2 mM	10 mM	-

Anyagok

A pulse-chase metabolomika kísérletekhez a radioaktívan jelölt szubsztrátokat a Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA) biztosította. A TGR5 kísérletekben használt inhibitorokat és antagonistákat (U73343 (phospholipase C inhibitor), NF449 (G α -szelektív antagonist), GSK2033 (LCR antagonist)) a Tocris Bioscience vállalattól szereztük be, és 5 μ M koncentrációban alkalmaztuk ezeket, illetve az U73343 inhibitort 1 μ M koncentrációban alkalmaztuk.

Sulphorhodamine B (SRB) sejtproliferációs assay

SRB proliferációs assay alkalmazása a másodlagos epesavak hatásának mérésére

A sejtproliferációs mérésekhez SRB assayt alkalmaztunk. A sejteket 96-well platekre raktuk ki (3000-5000 sejt/well). A sejteket 48 óráig másodlagos epesavakkal kezeltük. Ezt követően a

sejteket 10% triklórecetsavval (TCA) fixáltuk és SRB oldattal (0,4% SRB 1% ecetsavban oldva) festettük. A nem kötődött festéket 1% ecetsavval mostuk le. Ezt követően a megkötött festéket 10 mM TRIS bázissal oldottuk fel. Az abszorbanciát automatizált plate reader-el (Thermo Labsystems Multiskan MS, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mértük 540 nm-en.

SRB proliferációs assay a kép-alapú sejtproliferációs módszer validálására

A sejteket TPP 96-well platerre raktuk ki, majd 8 óra múlva fixáltuk. Ezzel párhuzamosan, a sejteket PerkinElmer CellCarrier Ultra 96 well platerre is kiraktuk, ugyanolyan sejtszámban. A TPP 96-well platen a sejteket 10% TCA-val fixáltuk, majd festettük SRB oldattal. A nem kötődött festéket 1% ecetsavas mosással távolítottuk el. A kötött festéket 10 mM TRIS bázissal oldottuk fel. Az abszorbanciát automatizált plate reader-el (Thermo Labsystems Multiskan MS) mértük le 540 nm-en.

A CellCarrier Ultra 96 platen a sejteket 4% paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk, majd 1% Triton-X 100/PBS oldattal permeabilizáltuk. A nem-specifikus kötési helyeket 1% BSA/PBS oldattal blokkoltuk. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük. A mikroszkópos képeket PerkinElmer Opera Phenix High Content Screening System nagy teljesítményű mikroszkóppal készítettük.

Kolónia formáló assay

A kolóniaformáló assay során egy 6-well platerre 500 sejtet tettünk ki minden wellbe. Ezeket a sejteket 7 napig kezeltük különböző koncentrációjú LCA-val. A kísérletek végén a sejtekről a kezelési médiumot lemostuk PBS-el. Ezt követően a kolóniákat metanollal fixáltuk 15 percig, amit szárítás és 15 percig tartó May-Grünwald-Giemsa festés követett. A felesleges festést desztillált vizes mosással távolítottuk el. A képződött kolóniákról készült képeket ImageJ szoftverrel elemeztük.

DNS és RNS preparálás, qPCR

A széklet minták DNS tartalmát PowerSoil DNA Isolation kit-el izoláltuk (MO BIO Laboratories, Inc. Carlsbad, California). A génkifejeződés mértékének vizsgálatához 2 µg RNS-ből végeztünk reverz transzkripciót High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, Ca, USA) segítségével. A qPCR reakciók qPCRBIO SyGreen Lo-ROX

Supermix (PCR Biosystems Ltd., London, UK) hozzáadása után LightCycler 480 Detection System (Roche Applied Science) qPCR brendezésen történtek. A 36B4 és cyclophyllin kifejeződés mértani középértékét használtuk normalizáló faktorként. A primereket a **2. Táblázatban** listáztuk.

2. Táblázat. Az RT-qPCR során használt primerek.

Gén neve	Egér forward és reverse primer pár (5'-3')	Humán forward és reverse primer pár (5'-3')
Atp5g1	GCTGCTTGAGAGATGGGTTC AGTTGGTGTGGCTGGATCA	CTAAACAGCCTTCCTACAGCAACTT TGAACCAGCCACACCAACTGT
Ndufb5	CTTCGAACTTCCTGCTCCTT GGCCCTGAAAAGAAGACTACG	GTATTCATTGGTCAAGCTGAACTAG CAGCTCCTTTACCCGTAATTCAGC
Cytc	TCCATCAGGGTATCCTCTCC GGAGGCAAGCATAAGACTGG	TAAGAACAAAGGCATCATCTGG AGGCAGTGGCCAATTATTACTC
36b4	AGATTCGGGATATGCTGTTGG AAAGCCTGGAAGAAGGAGGTC	CCATTGAAATCCTGAGTGATGTG GTCGAACACCTGCTGGATGAC
Cyclophilin	TGGAGAGCACCAAGACAGACA TGCCGGAGTCGACAATGAT	GTCTCCTTTGAGCTGTTTGCAGAC CTTGCCACCAGTGCCATTATG

SDS-PAGE és Western blot

A sejteket RIPA pufferben lizáltuk (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Nonidet P-40, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaF, 0.5% nátrium dezoxikólsav, 1 mM fenilszulfonil fluorid, proteáz inhibitor keverék, pH 8.0), majd 50 mM Tris, 2% (w/v) SDS, 3.34% (v/v) glicerol és 16.67 mM β-merkaptoetanol hozzáadása után forraltuk. A Protein lizátumokban lévő fehérjéket méret szerint SDS-PAGE módszerrel különítettük el. Az protein lizátumokat ezt követően a gélből nitrocellulóz membránra (Bio-Rad Laboratories, Supported, Hercules, California, USA) vittük át. Az antitesteket 5% BSA oldatban alkalmaztuk, az antitesteket az **4. Táblázatban** foglaltuk össze. Másodlagos antitestként HRP-konjugált anti-rabbit antitestet (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) alkalmaztunk. Az előhívás során szubsztrátként Supersignal West Pico és Supersignal West Femto ECL kit-et (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használtunk. A jelek detektálását Chemidoc Touch Imaging System segítségével végeztük és az eredményeket ImageLab szoftverrel (Bio-Rad) szoftverrel értékeltük.

4. Táblázat. A kísérletek során használt antitestek.

Antitest	Koncentráció	Gyártó(#katalógusszám)
Phospho-ACC (Ser79)	1:1000	Cell Signaling Technology (#3661)
Phospho-AMPKα (Thr172)	1:1000	Cell Signaling Technology (#2531)
NRF1	1:1000 (WB) 1:100 (immuncitokémia)	Abcam (ab175932)
PGC1β	1:1000	Abcam (ab176328)
FOXO1	1:1000	Cell Signaling Technology (#9454)
Phospho-GSK-3α/β (Ser21/9) (D17D2)	1:2000	Cell Signaling Technology (#8566)
GSK-3α/β (D75D3)	1:2000	Cell Signaling Technology (#5676)
β-Catenin	1:1000	Sigma (C7082)
TGR5/GPBAR1	1:1000	NOVUS (NBP2–23669)
Snai1	1:1000	Cell Signaling Technology (3879S)
Vimentin	1:1000	Cell Signaling Technology (5741S)
β-actin	1:20 000	Sigma (A3854)

Sejthalál detektálása

Az LCA-indukált citotoxicitást propidium jodid (PI) felvétel mérésével végeztük. A kísérlethez a sejteket 6-well platerre raktuk ki (MCF7 – 200 000 sejt/well; 4T1 – 75 000 sejt/well) és LCA-val kezeltük két napig. Ezt követően a sejteket 100 μ g/mL propidium jodiddal kezeltük 30 percig, 37 °C-on. A jelölés végeztével a sejtekről a felesleges propidium jodidot PBS-es mosással távolítottuk el, majd áramlási citométerrel (FACS Calibur, BD Biosciences, Dr San Jose, CA, USA) mértük a propidium jodid felvétel mértékét.

Elektromos sejt-szubsztrát impedancia mérés (ECIS)

Az ECIS (Elektromos sejt-szubsztrát impedancia mérés) mérésekhez az ECIS model Z θ (Applied BioPhysics Inc., Troy, NY, USA) készüléket használtunk. A készülék segítségével az

MCF7 és a 4T1 sejtvonalak transzcelluláris elektromos ellenállását mértük. A sejteket a készülékkel kompatibilis 8W10E platereraktuk ki (MCF7 – 40 000 sejt/well; 4T1 – 20 000 sejt/well). Ezt követően 20 óráig inkubáltuk a platen a sejteket, majd vehikulummal vagy 0,3 μM LCA-val kezeltük. A kezelés után a teljes impedancia értékeket további 48 órán keresztül mértük. A mérést több frekvencián végeztük (62.5, 125, 250, 500, 1 000, 2 000, 4 000, 8 000, 16 000, 32 000, 64 000 Hz). Az Rb (barrier ellenállás) értékelésére az ECIS modeling tool-t alkalmaztuk, ahol 180s időintervallumokat állítottunk be. A referenciaértéket olyan lyuk adta, ahol nem voltak sejtek, illetve kezelés nélküli teljes médiumot tartalmazott.

Metabolomika, pulse-chase metabolomika

A sejteket 48 óráig LCA-val kezeltük, majd összegyűjtöttük. Egy gyors, folyékony nitrogénes fagyasztást követően, a jelölt sejteket (10 mM [^{13}C]-glükózt, vagy [^{13}C]-acetátot tartalmazó D5030 médiumban tenyésztett), és a jelöletlen sejteket metanol-kloroform- H_2O oldattal tártuk fel. Ezt követően a felülúszót sejttörmeléktől centrifugálással elválasztottuk (10 perc, 4 °C 15 000g) és -80 °C-on tároltuk elemzésig. A mintákat ezt követően szárítottuk és 3-nitrobenzyl alkohol-trimetil-klórszilán oldatban szonikáltuk, majd 80 °C-on inkubáltuk. A reakciót ammónium bikarbonáttal állítottuk le. A mintákat ezt követően szárítottuk, majd acetonitril-víz oldatban hígítottuk, majd a kivont metabolitokat fordított fázisú kromatográfiával választottuk el egy egy Waters Acquity LC rendszeren. A méréseket Waters Micromass Quattro Micro triple quadrupole tömegspektrométerrel végeztük (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Citokémia

Immuncitokémia a másodlagos epesav kísérletekben

A sejteket fedőlemezekben növesztettük, melyeket a kezelés végén PBS-el lemostunk. A sejteket 4% paraformaldehiddel fixáltuk, 15 percig szobahőn, majd permeabilizáltuk 1% Triton-X-100 oldatban 5 percig. Ezt követően a sejtekben az aspecifikus kötőhelyeket 1% BSA oldattal blokkoltuk 1 órán keresztül, majd 45 percig TexasRed-X Phalloidin (Invitrogen, Oregon, USA) festékkel jelöltük az aktin filamentumokat, így láthatóvá téve a sejteket. Az NRF1 celluláris lokalizációjának vizsgálatához anti-NRF1 primer antitesttel inkubáltuk a sejteket 4 °C-on, egy éjszakán keresztül. Az elsődleges antitest eltávolítását és mosást követően hozzáadtuk a

másodlagos antitestet (1:600, anti-rabbit Alexa 488, Life Technologies), majd 1 órán keresztül szobahőn inkubáltuk a mintákat. A sejtmagokat TO-PRO-3 iodide (1:1000, Life Technologies) alkalmazásával tettük láthatóvá. További mosási lépéseket követően a fedőlemezeket Mowiol/Dabco segítségével rögzítettük a tárgylemezre. A sejtmorfológia vizsgálatához Leica SP8 konfokális mikroszkópot és a hozzá tartozó LAS AF v3.1.3 szoftvert alkalmaztuk.

Citokémia a bakteriális metabolit könyvtár szűréséhez

A sejteket PerkinElmer CellCarrier Ultra-96 lemezeken tenyésztettük és kezeltük, ahol a kísérletek végén körülbelül 70% konfluenciát értek el a sejtek. A mintákat 15 percig 4% paraformaldehidben fixáltuk. A sejteket ezt követően 1% Triton-X 100 oldattal permeabilizáltuk, majd 1% BSA/PBS oldattal blokkoltuk aspecifikus kötőhelyeiket. A sejtmagokat DAPI-val (Thermo, R3706) 5 percig, az aktin filamentumokat pedig TexasRed-X Phalloidin-al (1:150, Thermo, T7471) jelöltük 1 óráig. A sejtmagok fluoreszcens képeit 1080x1080 felbontásban készítettük, 10x objektívvel (N.A. 0.3, 1.196 $\mu\text{m}/\text{px}$). A DAPI jelekről (excitáció/emisszió λ : 405/456) a teljes well területét lefedve készítettünk képeket, mely így 21 területet jelentett wellenként. A sejtmorfológia vizsgálatához (phalloidin-jelölt aktin filamentumok + DAPI jelölt sejtmagok) 2160x2160 felbontásban, 20x objektívvel (N.A. 0.4, 0.299 $\mu\text{m}/\text{px}$) készítettünk képeket. A DAPI és TexasRed-X Phalloidin DAPI and TexasRed-X (excitáció/emisszió λ : 561/599) jeleket wellenként 25 területen vizsgáltuk. Phalloidin signals (excitation/emission λ : 561/599) were detected, covering 25 fields in each well. A képek elkészítéséhez PerkinElmer Opera Phenix High Content Screening rendszert használtunk.

Képelemzés a metabolit szűrés kísérletekben

Mélytanulás adatkészlet – sejtmagok szegmentálása

A tanításhoz használt adatkészletet DAPI-jelölt A2780 ovárium karcinóma sejtvonal, 4T1 egér emlőtumor sejtvonal, Capan2 humán pankréász adenokarcinóma sejtvonal, és MCF7 humán emlőtumor sejtvonalról készült képekből hoztuk létre. A saját adatbázisunkból így 82 képet válogattunk össze a tanítási adatkészlethez. A kiválasztási folyamat során olyan képekre esett a választás, amik lehető legnagyobb változatosságot mutatták egyetlen képen belül és képek között is. A képet akkor választottuk ki, ha megfelelt egy vagy több feltételnek az alábbiak közül: 1) a

többi képhez viszonyítva magas vagy alacsony volt a fluoreszcens szignál erőssége, 2) tartalmazott jelölési hibát vagy váratlan objektumot, 3) a sejtmagok túl nagy számban voltak jelen a well szélén és kevert morfológiát mutattak. Ezekben a képeken látható sejtmagot először CellProfiler (Broad Institute, Cambridge, MA, USA) szegmentáltuk, majd a hibás szegmentálásokat kézzel javítottuk. Az eredeti adatkészletet képeiből adat-dúsítással (data augmentation) lépéssel további példákat generáltunk, ezt Albumentations (Python3) könyvtár segítségével végeztük. A képeket 90 °-al forgattuk, random részleteket vágunk ki, illetve megváltoztattuk a világosságukat. Az eredeti képekkel kiegészítve így 277 szürkeárnyalatos képpárt kaptunk, mely tartalmazta a mikroszkópos képeket és a hozzá tartozó címke képeket. A képeket ez után véletlen sorrendbe rendeztük, majd train, test és validation részletekre osztottuk 80:10:10 arányban.

A mélytanítás tanulási paraméterei

Az elkészített DAPI adatkészleten egy VGG-UNet szemantikus szegmentáló modellt tanítottunk. A modell architektúráját a Keras-segmentation 0.3.0 (Python3) könyvtárból nyertük ki. A modellt CPU-n tanítottuk 2 epoch-on keresztül, epoch-on belül 8 képpel batch-ként illetve 33 lépésben. A kísérleti adatok értékeléséhez használt modell loss értéke 0.0512, pontossága 0.9874 értéket ért el a validáló adatokon.

Proliferációs elemzés sejtmagok számolásával

Sejtmagok számolásához a CellProfiler beépített szegmentálási módszerét (háromosztályú adaptív Otsu módszer – középső osztály a háttérhez rendelve) alkalmaztuk. Ezt követően összegeztük a sejtmagok számát. Egy ezzel párhuzamos elemzés során a sejtmag szegmentálásra tanított modellel helyettesítettük a Cellprofiler saját beépített szegmentálási módszereit. A modellel szegmentált sejtmagokat szintén CellProfiler segítségével számoltuk meg.

Sejtmorfológia elemzés

A morfológia elemzéshez készített képeket Harmony 4.8 szoftverrel elemeztük. Először szegmentáltuk a sejtmagot és a citoplazmát, majd a szegmentált objektumok textúráját, jelintenzitását és pozícióját elemeztük. Ezt követően egy lineáris regressziós modellt tanítottunk

az elkészült adatok felhasználásával a TGF- β , SB-431542 kezelt és kontroll sejtekről készült képeken. A modellt az epitheliális és mesenchymalis morfológia elkülönítésére tanítottuk.

Infiltráció értékelése és TIL számolás

A tumor infiltráló limfocitákat (TIL) HE-festett, formalinban fixált, paraffinba ágyazott szövetmetszetekben számoltuk. Az értékét 100 tumor sejtre vonatkoztatva adtuk meg.

Bakteriális metabolitok szűréséhez összeállított könyvtár

A TGF- β 1-et a Thermo Scientific (Ref.: #100.21), az SB-431542-t a Sigma (St. Louise, MO, USA, Ref.: S4317) biztosították kísérleteinkhez. A bakteriális metabolitok származását, referencia számát, alkalmazott és szérum koncentrációját az **5. Táblázatban** foglaltuk össze.

5. Táblázat. A bakteriális metabolitok specifikációi.

Metabolit neve	Oldószer	Referenciaszám	Szérum referencia koncentrációk (μ M)	Alkalmazott koncentrációk (μ M)
1-Butanol	PBS	Sigma B7906-500ML	0 - 0.27 [148]	0.005 , 0.015 , 0.044 , 0.13 , 0.4
1-Propanol	PBS	Sigma 96566-5ML-F	0 - 0.8 [148]	0.05 , 0.1 , 0.2 , 0.4, 0.8
2,3 butándiol	PBS	Sigma B84904	0.5 - 0.9 [149]	0.48, 0.56, 0.66, 0.77, 0.9
3,4-dihydroxifenil ecetsav	PBS	Sigma 850217-14	0.0102 - 0.104 [150], [151]	0.01, 0.018, 0.032, 0.058, 0.104
3-hidroxifenil ecetsav	PBS	Sigma H49901	0.11 - 0.174 [150]	0.106, 0.120, 0.136, 0.154, 0.174
3-hidroxiopropionát	PBS	Sigma 792659-1G	3, 6, 8 (individual values) [152]	0.5 , 1 , 2 , 4 , 8
4-aminobenzoészav	EtOH	Sigma A9878-5G	5.01 - 32.0 [153]	0.3, 1.2, 3.6, 10.8, 32.4
4-hidroxibenzoészav	PBS	Sigma 8218140250	0.019 - 0.035 [150]	0.019, 0.022, 0.026, 0.03, 0.035
4-hidroxifenil ecetsav	PBS	Sigma H50004-54	0.283 - 0.61 [150]	0.28, 0.36, 0.41, 0.5, 0.61

Metabolit neve	Oldószer	Referenciaszám	Szérum referencia koncentrációk (μM)	Alkalmazott koncentrációk (μM)
Ecetsav	PBS	VWR UN2789	23 - 254.4 [148], [154]–[157]	15, 30, 60, 120, 240
Allantoin	DMSO	Sigma 05670	1.0 - 24.0 [158]–[160]	0.99, 2.2, 4.9, 10.8, 24
Butirát (vajsav)	PBS	Sigma B103500-5ML	1.39 - 14.15 [154], [155], [157]	1, 2, 4, 8, 16
D-alanin	PBS	Sigma A7377- 5G	0 - 0.77 [161]	0.048, 0.96, 0.193, 0.385, 0.77
D-glutamát	PBS	Sigma G1001- 1G	7.42 - 14.6 [161]	7.28, 8.66, 10.31, 12.27, 14.6
D-mannitol	PBS	Sigma M4125- 10MG	Nem ismert, D-mannózzal azonos koncentrációban	6.25, 12.5, 25, 50, 100
D-mannóz	DMSO	Nincs adat	13 - 73.87 [162]–[164]	6.25, 12.5, 25, 50, 100
Etilénglikol	PBS	Nincs adat	Nincs adat, toxikus (1.56 mg/kg)	1, 3, 9,27, 81
Formiát	PBS	Sigma F0507- 500ml	11.84 - 224.5 [165]	10, 30, 90, 270, 810
Glikolát	PBS	Sigma 124737	6.1 – 69 [152], [166]	1, 3, 9,27, 81
Hippursav	PBS	Sigma 112003	1.5 - 21.2 [150], [167]	0.024, 0.12, 0.6, 3, 15
Hidrocinnamonsav	EtOH	Sigma 135232- 5G	0.131 - 0.354 [168]	0.128, 0.165, 0.213, 0.274, 0.354
Isobutirát	PBS	Sigma I1754- 100ML	1.02 - 14.15 [154], [157]	1.02, 1.97, 3.80, 7.33, 14.15
L-pipekolsav	PBS	Sigma P2519	1.2 - 3.72 [169]	0.25, 0.5, 1, 2, 4
Oxalát	PBS	Sigma 75688	6.5 - 35.5 [170], [171]	6.5, 9.9, 15.2, 23.2, 35.5
Propionát	PBS	Sigma P1386- 1L	4.86 - 15.33 [154], [155], [157]	1.25, 2.5, 5, 10, 20
Sikimisav	DMSO	Sigma S5375- 10MG	0.03 - 0.23 [172]	0.01, 0.03, 0.09, 0.27, 0.81
Transz-ferulasav	DMSO	Sigma 52229	0.04 - 15.7 [150], [167]	0.016, 0.08, 0.4, 2, 10

Metabolit neve	Oldószer	Referenciaszám	Szérum referencia koncentrációk (µM)	Alkalmazott koncentrációk (µM)
Trimetilamin(TMA)	PBS	Sigma 92260	0.3 -14.44 [173], [174]	0.3, 0.79, 2.1, 5.4, 14.35
Trimetilamin-N-oxid (TMAO)	PBS	Sigma 317594	1.21 - 21.1 [175]–[177]	1.22, 2.48, 5.065, 10.33, 21.1
Vanillinsav	PBS	Sigma H36001	0.01 - 0.338 [150], [167]	0.01, 0.024, 0.058, 0.140,0.338

Statisztikai elemzés

Két csoport összehasonlítása esetén Student's T-tesztet alkalmaztunk, ha másképpen nincs jelölve. LCA kísérletekben a normál eloszlás eléréséhez \log_2 transzformáltuk a fold change adatokat. Több csoport összehasonlítására egyutas analysis of variance tesztet (ANOVA) alkalmaztunk, melyet Tukey's honestly significant difference (HSD) post-hoc teszt követett. Az adatokat átlag \pm SD formátumban tüntettük fel, ha másképp nincs jelölve. Outlier tesztként az LCA kísérletekben Thomson tau-tesztet, a metabolit szűrés kísérletekben pedig Z-score tesztet alkalmaztunk. A statisztikai elemzést GraphPad Prism 8.0 szoftverrel végeztük.

Eredmények

A litokólsav csökkenti az emlőtumor agresszivitását

A litokólsav gátolja a sejtproliferációt

Tanulmányunk első szakaszában rövid idejű proliferációs vizsgálatokat végeztünk a másodlagos epesavak sejtproliferációra gyakorolt hatásának értékelésére. Az LCA csökkentette az MCF7, SKBR3 és 4T1 emlőrák sejtek proliferációját 10 nM-tól 10 μ M-ig terjedő koncentráció tartományban. Ez magában foglalta a szérum referencia koncentrációját (31 nM) és az emlőciszták folyadékának koncentrációját is (9-23 μ M). Az LCA kezelés azonos koncentrációban a primer fibroblaszt sejtekre nem volt hatással, ez a hatás specifikus volt a tumorsejtekre.

Ezzel szemben más másodlagos epesavak, nevezetesen a DCA és az UDCA, nem voltak hatással az MCF7 és 4T1 emlőrák sejtek proliferációjára. Ezek a megállapítások arra utalnak, hogy a másodlagos epesavak hatása az emlőtumorsejtek sejtproliferációjára nem egységes a különböző másodlagos epesavak között.

Az LCA citosztatikus hatását kolónia képzési vizsgálatokkal validáltuk. Bár a kísérleti eredmények a sejtproliferáció csökkenését jelezték LCA kezelésben, lehetségesnek tartottuk, hogy a sejthalál okozta ezt a csökkenést. Ennek az aspektusnak az értékelésére propidium-jodid vizsgálatot végeztünk, amely lehetővé tette a sejthalál vizsgálatát. A vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy LCA kezelés után a propidium-jodid pozitív sejtek száma nem mutatott jelentős növekedést. Ezt az eredményt következetesen megfigyeltük mind a 4T1, mind az MCF7 sejtvonalakon

LCA hatása az EMT és metasztázis folyamatokra

Vizsgáltuk az LCA hatását az epithelialis-mesenchymalis tranzícióra is. Az LCA kezelés a sejtmorfológiát egy epithelialis-szerű fenotípus irányba változtatta meg. Ez a hatás az MCF7 és a 4T1 sejtvonalakon is megfigyelhető volt. Továbbá az ECIS mérések növekvő teljes impedanciát mutattak, ami funkcionális bizonyítékot szolgáltatott a szorosabb sejt-felület és sejt-sejt kapcsolódásra. A 4T1 sejtvonalon végzett migrációs kísérletekben az LCA kezelés hatására a sejtek üres terület felé történő migrációjában szembetűnő csökkenés volt megfigyelhető.

Ezen túlmenően, az LCA kezelés gátolta a β -catenin jelátvitelt, amit a GSK-3 α és GSK-3 β csökkent foszforilációja, valamint mindkét sejtvonalban és in vivo kísérletekben is lecsökkent β -catenin fehérjemennyiség is bizonyított.

Az LCA kezelés alacsonyabb VEGF mRNS kifejeződést is eredményezett, és nagyobb számú tumor infiltráló limfocita (TIL) volt megfigyelhető az LCA-val kezelt egerekben az kontroll kezelést kapott egerekhez képest.

Az LCA befolyásolja az energiametabolizmust

A Warburg-metabolizmus, amely a tumorsejtek egyik jellemzője, kiemelkedő metabolikus jellemzőnek bizonyult az emlőtumorban. Az emlőtumor sejtek jellegzetesen a glikolitikus fenotípus felé tolódnak, tehát oxigén jelenlétében is elsősorban a glikolízisre támaszkodnak az energia előállításához. Ebből kiindulva megvizsgáltuk az LCA sejttanyagcserére gyakorolt hatását is. Az LCA kezelés megnövekedett glikolízist (extracelluláris savasodási arány – ECAR) és mitokondriális oxigénfogyasztást (oxigénfogyasztási arány – OCR) eredményezett. Ezzel összhangban, az intracelluláris laktát és citrát szintek, valamint a citrát/laktát arány is nőtt az LCA kezelés hatására.

Az LCA kezelés a 4T1, és az MCF7 sejtekben az OXPHOS gének egy specifikus részének kifejeződését indukálta, mely összhangban van ezekkel a megfigyelésekkel. Ezután úgynevezett pulse-chase metabolomikai kísérleteket végeztünk 300 nM LCA-val kezelt MCF7 és 4T1 sejteken. A sejtek ¹³C-acetát telítése után, ami egy TCA-ciklusba kapcsolódó metabolit, az LCA kezelés megnövekedett ¹³C beépülést eredményezett szukcinátba és malátba. Ez növekvő forgalmat jelez a TCA-ciklusban. Továbbá, amikor a sejtek ¹³C-glükózt kaptak, mely után a ¹³C atomok belépnek a glikolízisbe és azt követően táplálják a TCA-ciklust vagy laktátot képeznek, az LCA kezelés hatására az MCF7 sejtekben a megemelkedett a ¹³C-jelölt citrát és laktát szintje, valamint megemelkedett a 4T1 sejtekben a ¹³C-jelölt szukcinát és laktát szintje. Ebből következik, hogy a ¹³C-citrát/¹³C-laktát vagy a ¹³C-szukcinát/¹³C-laktát arány növekedett, további bizonyítékot szolgáltatva a mitokondriális dominanciára az LCA által indukált metabolikus eltolódásban. Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy az LCA kezelés aktiválja a TCA-ciklust és az oxidatív foszforilációt (OXPHOS) az emlőrák sejtekben.

A megfigyelt anyagcsere-változások mögött álló alapvető mechanizmusok felderítésének érdekében megvizsgáltuk a sejt energiaérzékelő jelátviteli útvonalaikat és a mitokondriális

transzkripciós szabályozók különböző komponenseit. Az LCA kezelés emelkedett kifejeződést és aktivitást eredményezett a mitokondriális oxidatív foszforiláció pozitív regulátoraiban, beleértve a FOXO1-et és a PGC-1 β -t és a nukleáris légzési faktor-1-et (NRF1). Továbbá az LCA nemcsak növelte a kifejeződésüket, hanem fokozta aktivitásukat is, amit az NRF1 megnövekedett nukleáris transzlokációja és az ACC megnövekedett foszforilációja validált. *In vivo* kísérleteinkben megfigyeltük, hogy az LCA kezelés indukálta az AMPK aktivitást, amit a foszfo-ACC és foszfo-AMPK szintjének növekedése jelzett. Továbbá megfigyeltük a FOXO1 fokozott kifejeződését is. Azonban az LCA nem indukálta az NRF1 vagy a PGC-1 β kifejeződését *in vivo* kísérleteinkben.

Ezt követően megvizsgáltuk az indukált anyagcsere-szabályozók (NRF1, AMPK, PGCs) potenciális (pato)fiziológiai relevanciáját humán mintákban. Korábbi tanulmányok már fényt derítettek az AMPK és FOXO1 antitumor aktivitására emberi alanyokban. A kmplot.com adatbázis felhasználásával felfedeztük, hogy az NRF1 magas kifejeződése az emlőrák szövetben összefügg a diagnózis utáni prognózissal. Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy az AMPK, FOXO1, PGC-1 β , vagy az NRF1 (pato)fiziológiai jelentőséggel bírhat az LCA által kiváltott hatásokban.

Az LCA receptorok azonosítása

A következő célunk az volt, hogy meghatározzuk azokat a specifikus receptorokat, amelyek közvetítik az LCA által kiváltott hatásokat. Ennek eléréséhez különböző LCA receptorok farmakológiai gátlószereit alkalmaztuk, így fényt derítve szerepükre az LCA által kiváltott hatásokban. Ezért MCF7 sejteket kezeltünk LCA-val, melyhez kombinációban olyan farmaikológiai anyagokat adtunk, amik LCA receptorokat blokkolnak. Megfigyeléseink alapján a CINPA1(CAR antagonist), az NF449 (G α -szelektív antagonist) és az U73343 (foszfolipáz C gátló) hatékonyan blokkolták az LCA által közvetített sejtproliferáció csökkenést, míg más gátlószerek nem mutattak jelentős hatást. Az LCA által indukált morfológiai változások tekintetében az NF449 és az U73343 hatékonyan blokkolta a sejtek közötti üres területek bezáródását és epithelialis morfológia kialakulását az MCF7 és a 4T1 sejteknél is, míg a CINPA1 kezelésben nem tapasztaltunk ugyanilyen hatást.

Az NF449 és az U73343 nem TGR5-specifikus gátlószerek, de gátolhatják a TGR5 jelátvitelét azáltal, hogy gátolják a G α -t és a foszfolipáz C-t. A TGR5 szerepének közvetlen bizonyítása érdekében átmenetileg csendesítettük a TGR5-öt az MCF7 sejtekben.

A TGR5 csendesítése hatékonyan blokkolta az LCA által kiváltott MCF7 sejtek morfológiai változásait és megakadályozta a mitokondriális markerek, mint a CYTOCHROME C, ATP5G1 és az NDUFB5, valamint az AMPK aktiválódás markereinek mRNS szintű expressziójának fokozódását.

Érdemes megjegyezni, hogy az ebben a tanulmányban használt LCA koncentrációkban a biomembránok dinamikai tulajdonságai és mikrodomén szerveződése változatlan maradt. Ezt az a megfigyelés igazolta, hogy sem diffúziós állandó (D), sem a bezáródási idő (TD) nem változott az LCA hatására, még 100 μ M LCA kezelés esetén sem.

Emlőtumor sejteket befolyásoló bakteriális enzimek azonosítása

Metabolitkönyvtár létrehozása

Az emberi anyagcserét befolyásoló bakteriális metabolitokat kiterjedt irodalmi kutatás útján azonosítottuk. Az azonosított anyagcseretermékek gondos válogatáson estek át, hogy kizárjuk azokat a tévesen azonosított vegyületeket, amelyeket nem baktériumok termelnek. A bakteriális anyagcseretermékek szérumban referenciakonzentrációit az irodalmi adatok alapján állapítottuk meg. Egy közelmúltbeli tanulmány feltárta, hogy béta-adrenerg receptorok módosításán keresztül, egy daganat jelenléte befolyásolja a bélmozgást. Az emlőrákban szenvedő betegekben a megváltozott motilitási sebesség a gasztrointesztinális (GI) traktuson belül valószínűleg befolyásolja a redox környezetet, ami potenciális változásokat idéz elő a redox-érzékeny anyagcseretermékek redox állapotában. Ezért az egyes anyagcseretermékek redox partnerét (mannóz – D-mannitol, TMA – TMAO, 1-butanol – butirát, etilén-glikol -glikolsav – oxálsav) szintén beépítettük az anyagcseretermékek könyvtárába, azonban az etilén-glikolhoz nem álltak rendelkezésre konkrét irodalmi adatok, így referenciaként az ismert redox párok azonos koncentrációit használtuk.

Nagy áteresztőképességű technikák fejlesztése sejtproliferáció méréséhez

Korábbi vizsgálatainkban azonosítottuk és jellemeztünk egy olyan baktériumok által termelt anyagcseretermék csoportot, amelyek citosztatikus aktivitást mutattak. Azonban ezeknek az anyagcseretermékeknek az antiproliferatív hatása korlátozott volt, és az SRB proliferációs vizsgálat nem bizonyult kifejezetten pontosnak ezen koncentrációs tartományban. Ennek a korlátozottságnak a kezelésére két alternatív módszert dolgoztunk ki, melyekkel mikroszkópos

képeken sejtmagokat számoltunk. Az egyik módszerben a képszegmentálást és magok számolását a CellProfiler segítségével végeztük. A második módszerben egy, kifejezetten a projekt számára készült mélytanulás (deep learning - DL) alapú módszert alkalmaztunk a szegmentálásra, a magok számolását viszont szintén a CellProfilerrel végeztük. Eredményeink alátámasztották, hogy az SRB vizsgálat megbízhatatlannak bizonyult alacsony sejtszám esetén, 100-300 sejt/well tartományban. Emellett a fotometria belső korlátai miatt az 1,0-nál nagyobb abszorpció értékek túl magasak, korlátozva a vizsgálat végén mérhető sejtek maximális számát 10 000 – 30 000 közé. Az 1,0-nál magasabb abszorpció értékeket hígítás után lehet mérni, ami hígítási hibák lehetőségét veti fel. Ezzel szemben a képanalízis alapú vizsgálatok szélesebb dinamikus tartományt mutattak az SRB vizsgálatához képest. Mindkét képelemzés-alapú módszer megbízható eredményt adott még alacsony sejtszámoknál is. Továbbá ezek a módszerek képesek voltak akár 100 000 sejt/well detektálására is, valamint a DL-alapú szegmentálási módszer pedig felülmúlta a CellProfiler beépített szegmentálási módszerét. Ezen kívül a DL-alapú módszerben használt, szemantikus szegmentációs modellek nem igényelnek minden futtatásnál paraméterbeállítást, ellentétben a hagyományos módszerekkel, ami további érv a DL szegmentálási módszer mellett. Meg kell említeni, hogy a képanalízis-alapú vizsgálatok következetesen alacsonyabb sejtszámot adtak, mint az eredetileg platelt sejtszámok, amikor a sejtszám 1 000-tól 10 000-ig terjedt. Ezen wellek vizuális vizsgálatokor nyilvánvalóvá vált, hogy ilyen sejtszámoknál a sejtek kevésbé tapadtak a wellekhez, ami a wellekben csökkent sejtszámot eredményezett. Ez a sejt kultúrákban megfigyelt sejtszám csökkenés megerősítette a képanalízis-alapú vizsgálatok precizitását. Emiatt a további kísérleteinkben kizárólag képanalízis-alapú vizsgálatokat alkalmaztunk.

Proliferációt segítő és gátló mikrobiális metabolitok azonosítása

Megvizsgáltuk a könyvtárunkban található bakteriális metabolitok hatását a 4T1 emlőtumor sejtek proliferációjára. A sejtek az egyes metabolitok öt különböző koncentrációjával voltak kezelve, amelyek lefedték a szérum koncentrációjuk referenciatartományát. A statisztikai elemzést minden egyes metabolit dózis-válasz görbéjére külön-külön végeztük. Eredményeink nyolc bioaktív metabolitot azonosítottak, amelyek megváltoztatják a sejtproliferációt: butirát, glikolát, D-mannitol, 2,3-butándiol, transzferulát, 4-hidroxibenzoát, vanilinsav és 3-hidroxifenilecetsav. Megjegyzendő, hogy a hangyasav antiproliferatív tulajdonságokat mutatott a legmagasabb tesztelt koncentrációban, azonban óvatosan kezeltük ezt a megfigyelést, mivel a legmagasabb

koncentráció jelentősen meghaladta a referenciatartomány felső határát. A butirát, glikolát, D-mannitol, 2,3-butándiol és transz-ferulát antiproliferatív hatást mutatott a használt legmagasabb koncentrációban, míg a 4-hidroxibenzoésav, vanilinsav és 3-hidroxifenil-ecetsav konkrét koncentrációkban elősegítette a proliferációt.

Nagyáteresztőképességű megoldások fejlesztése EMT vizsgálatához

A korábban emlőrákban azonosított bakteriális metabolitok, mint például a litokólsav, kadaverin, indol-származékok és rövid szénláncú zsírsavak, hatást gyakoroltak az epithelialis-mesenchymalis tranzícióra. Annak érdekében, hogy felderítsük a metabolit könyvtárban található anyagcseretermékek hatását az EMT-re, High Content Screening alapú képelemzési módszert alkalmaztunk, melynek alapjául az szolgált, hogy az EMT során a sejtek morfológiája megváltozik emlőrákban. Ezen kívül megerősítettük az eredményeket az EMT markerek, mint például a vimentin és a Snail fehérjeszintű kifejeződésének értékelésével. Az EMT indukciójára és gátlására pozitív és negatív kontrollként TGF- β 1 (10 ng/mL) és SB-431542 (2 μ M) anyagokat alkalmaztunk. Az SB-431542 a TGF- β szupercsalád I. típusú activin receptor-szerű kinázainak gátlója. A sejteket 48 órán keresztül kezeltük ezekkel a vegyületekkel. A mesenchymalis tranzícióval összefüggő fehérje markerek, mint például a SNAI1 (Snail) cink-ujj fehérje és vimentin növekedését észleltük a TGF- β 1 indukciója során, míg a vimentin csökkent az SB-431542 kezelés során 4T1 sejtekben. Továbbá, a sejtek vizuális vizsgálata megerősítette a TGF- β által indukált mesenchymalis tranzíciót és az SB-431542 által közvetített epithelialis tranzíciót. Összhangban ezekkel a megfigyelésekkel, a High Content Screening szűrésen alapuló sejtosztályozási módszer növekvő mesenchymalis sejt morfológia arányt jelzett a TGF- β 1 indukció során, és csökkenést az SB-431542 kezelést követően. Ezen megállapítások alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a High Content Screening módszerek megbízhatóak az epithelialis és mesenchymalis sejtek arányának meghatározásához ezen kísérleti feltételek mellett.

EMT módosító bakteriális metabolitok azonosítása

A kifejlesztett módszer validálása után kiértékeljük a metabolit könyvtár tagjainak hatását, High Content Screening módszert alkalmazva. Ebből az elemzésből azonosítottuk a 3-hidroxifenil-acetátot, hidrocinnamonsavat, 2,3-butándiolt és 4-hidroxibenzoátot mint a kutatás szempontjából érdekes vegyületeket. Megjegyezzük, hogy egy jellegzetes V-alakú görbét

észleltünk, ahol minden egyes vegyület optimális koncentrációja jelentősen csökkentette a mesenchymalis sejtek arányát, míg az alacsonyabb és magasabb koncentrációk hatástalanok voltak. Az eredmények megerősítése érdekében Western blot analízist végeztünk. A 4T1 sejteket 48 órán keresztül kezeltük a metabolitok hatékony koncentrációival, és a fehérje mintákat anti-Snail és vimentin kifejeződés szempontjából vizsgáltuk. A 2,3-butanediol kivételével minden metabolit legalább egy mesenchymalis marker kifejeződésének csökkenését mutatta, megerősítve a High Content Screening eredményeket. A 2,3-butanediol esetében csökkenést észleltünk az EMT markerek kifejeződésében, de a statisztikai tesztek nem mutattak jelentős különbséget.

Diszkusszió

Az emberi szervezet ad otthont egy komplex mikroorganizmus ökoszisztémának, melynek együttesét mikrobiomként hívjuk. A mikrobiom fontos szerepet játszik különböző fiziológias folyamatokban. A mikrobiom összetétele egyénekenként eltérő, és az egészséges mikrobiom összetételének definiálása egy nagy kihívással járó feladat. Mindazonáltal, a bél mikrobiom összetételének felborulását (diszbiózis) több bélrendszeri és bélrendszert nem érintő betegséggel is összefüggésbe hozták már, pl.: irritábilis bél szindróma cöliákia, allergia, asthma, kardiovaszkuláris betegségek és elhízás. A diszbiózist az utóbbi évtizedben a diszbiózist összefüggésbe hozták az emlőtumorokkal is. Emlőtumorban, a mikrobiom összetétele jelentős változáson megy keresztül, diverzitása lecsökken a korai stádiumban. A pontos oka ennek a diszbiózisnak, illetve az emlőtumor és a mikrobiom közötti patomechanizmus még ismeretlen. Mindazonáltal azok a mikrobiális metabolitok, melyek eljutnak az emlőszövetbe, befolyásolhatják a tumorsejtek működését. A vér útján szállított bakteriális metabolitok közül, a kadaverin, indoxilszulfát és indolpropionsav már ismert antineoplasztikus ágensek emlőtumorok esetében, normál szérum koncentráció tartományban

Az LCA hatása emlőtumorokban

Korábbi tanulmányok feltételezték a másodlagos epesavak lehetséges onkogén tulajdonságait. Például az LCA transzformáló kapacitást mutatott a vastagbél epithelialis sejtekben, míg a DCA (modellrendszereinkben inaktív) újraprogramozta a szekretomot és elősegítette a hepatocelluláris karcinómát. Továbbá, a DCA antineoplasztikus hatásokat váltott ki hasnyálmirigy adenokarcinómában az EMT gátlásával, csökkentve ezzel a tumorössejtszerűséget. Emellett az epesavaknak a garatrák kialakulásában is szerepük van.

Az LCA egy bakteriális metabolit, mely potenciálisan a belekben képződik és a véráramon keresztül jut az emlőbe, ahol jelentős szerepet játszhat egy antitumor mikrokörnyezet kialakításában. Vizsgálataink során kimutattuk, hogy az LCA gátolta az MCF7, 4T1 és SKBR3 emlőrák sejtek proliferációját. DCA és UDCA nem volt hatással a sejtproliferációra. Ezeket az eredményeket SRB esszé és kolónia formáló esszé eredményeink is alátámasztották. Ezek a

hatások specifikusak voltak az emlőtumor sejtvonalakra, mivel a primer fibroblaszt sejtek proliferációja nem változott LCA kezelés hatására.

A fehérje tartalomban, vagy a kolónia méretben bekövetkező változások a sejthalálban bekövetkező változásoknak is tulajdoníthatóak. Korábbi tanulmányokban az LCA sejthalált idézett elő neuroblasztómában, prosztatarákban és MCF7 sejtekben. Azonban érdemes megjegyezni, hogy ezekben a tanulmányokban alkalmazott LCA koncentrációk magasabbak voltak, mint a jelen vizsgálatunkban alkalmazottak, ami magyarázhatja az akut LCA toxicitás hiányát. Kísérleteink alapján a propidium jodid pozitív MCF7 és 4T1 sejtek nem változtak az LCA kezelés után, ami azt mutatja, hogy nem a sejthalál volt a proliferációs kísérletekben bekövetkező változások elsődleges oka.

LCA hatására csökkent a mesenchymalis sejtek száma 4T1 emlőtumor sejtvonal kolóniáiban. ECIS kísérleteink szintén megerősítették ezt a megfigyelést MCF7 és 4T1 sejtekben, ahol az ellenállás értékek erősebb sejt-sejt és sejt-felület adhéziót jeleztek. Az EMT-n átesett sejtek migrációra hajlamosabbak és a mesenchymalis sejtek közötti kapcsolat gyengébb. A sejtek mobilitásának mérésére scratch esszét alkalmaztunk, eredményei alapján a kolóniák közötti rés bezárása lelassult. Ezek az eredmények együttesen mesenchymalis-epithelialis tranzíciót (MET) mutatnak LCA kezelés hatására.

A β -catenin a Wnt jelátviteli útvonalon a G1 fázisban szabályozza a sejtproliferációt. Vastagbél daganatokban a β -catenin EMT-t és pro-invazív expressziós profilt indukál a T-cell and lymphoid enhancer (TCF-LEF) transzkripciós faktor aktiválásán keresztül. Hagyományosan, a β -catenin szint értékeléhez szükséges a pGSK-3 $\alpha\beta$ / GSK-3 $\alpha\beta$ szint mérése is, mivel a GSK-3 $\alpha\beta$ foszforilált formában a β -catenin lebomlását idézi elő. *In vitro* Western blot eredményeinkben a β -catenin fehérje szintje csökkent, míg a GSK-3 $\alpha\beta$ defoszforiláción ment keresztül az MCF7 és 4T1 sejtvonalakban. Habár β -catenin expresszió mértéke magyarázatot adhat a sejtproliferációban bekövetkezett változásokra, azonban úgy tűnik a GSK-3 $\alpha\beta$ jelátvitel a β -catenin jelátviteltől szétkapcsolódott. Ez többféleképpen is magyarázható, pl.: a növekedési faktorok jelátvitelében bekövetkezett mutációkkal, vagy a GSK-3 $\alpha\beta$ alternatív aktiválásával a PI3K/Akt, protein phosphatase 2, vagy protein kináz B közreműködésével. *In vivo* kísérleteinkben LCA kezelés hatására szintén megnőtt a β -catenin expresszió mértéke.

In vivo kísérleteinkben a tumor-infiltráló limfociták száma LCA kezelés hatására megnőtt, míg qPCR eredményeink alapján a Vegfa mRNS szintje csökkent a tumorokban. A tumor-infiltráló

limfociták száma emlőtumorokban egy általános prognosztikai marker, emelkedése jobb prognózist jelez, míg a VEGFA egy vaszkularizációs marker.

A tipikus Warburg metabolizmus markereket is szeretnénk volna megvizsgálni kísérleteink során. A vizsgálatok során általánosan emelkedtek az OCR és ECAR értékek, az oxidatív foszforiláció gének expressziója (CytC, ATP5g1, NDUF5) és az energia metabolizmust szabályozó gének expressziója (FOXO1, PGC1- β , NRF1) és aktivitása *in vitro* és *in vivo* kísérleteinkben. Pulse-chase metabolomikai méréseink során a szukcinát/laktát és a citrát/laktát szintek emelkedést mutattak MCF7 és 4T1 sejtvonalakban. Ezek az eredmények együttesen a TCA ciklus és az oxidatív foszforiláció emelkedett aktivitását mutatják LCA kezelés során. Másszóval az LCA kezelés anti-Warburg hatást váltott ki az emlőtumor sejtekben, ami magyarázatot adhat a csökkent sejtproliferációra is.

Az LCA feltehetően több receptoron keresztül, több jelátviteli útvonalra is hatással van. A kísérleteink során megfigyelt hatások valószínűleg a TGR5 jelátviteli útvonal aktivitásának tulajdoníthatók, mivel a TGR5 receptor specifikus gátlásával az LCA specifikus hatások elmaradtak.

A mikroszkópos képek standardizált elemzése

Ebben a tanulmányban arra is törekedtünk, hogy standardizált és pontos módszert hozzunk létre sejtproliferáció és EMT mérésére változó körülmények között fluoreszcens mikroszkópia segítségével. Ennek érdekében hagyományos képelemzési és mélytanuláson alapuló technikákat alkalmaztunk.

A modell alapja egy úgy nevezett „VGG16 feature extraction” modell volt, ImageNet adatokon előtanított súlyokkal, amit egy U-Net szegmentáló modellel kapcsolunk össze. A VGG16 modellt széleskörűen alkalmazzák képek osztályozására és az előtanított súlyok készen elérhetők ehhez a modellhez. A U-Net egy általános felhasználású szegmentáló modell, gyakran használják a biológiai és orvosi képek elemzésére használt alkalmazásokban. Tanítást követően a finomhangolt modellünk >98% pontosságú teljesítményt mutatott a validáló adatokon. A kifejlesztett mélytanulással kapcsolt sejtmag számlálási módszer több, mint 60 000 képet elemzett emberi beavatkozás nélkül, és összehasonlítható a hagyományos sejtmagszámlálási módszerekkel, ahol paraméterbeállításokra volt szükség minden független adat értékeléséhez. Azonban a módszer jobban teljesít a hagyományos képelemzési módszereknél és az SRB esszénél is, mivel pontos

eredményt kapunk vissza extrém alacsony és magas sejtszámnál is (100 – 100 000 sejt/well).

Ezeket figyelembe véve a tanított neurális hálózat jól generalizált a 4T1 sejtmagok szegmentálási feladatára, és potenciálisan jól generalizált azokra a sejtvonalakra is, melyekből példát tartalmazott a tanítási adat. Ezek a sejtek azonban mutathatnak magi pleomorfizmust, ami könnyen megzavarhatja a finomhangolt képelemzési módszereket. Egy másik probléma a képalkotás és képelemzés idő- és erőforrásigényessége, ha összehasonlítjuk más, jól beállított kémiai alapú proliferációs vizsgálatokkal (mint az SRB assay). Előbbire egyszerű megoldást jelentene, ha kifejezetten pleomorfizmust mutató képeket is bevonnánk a mélytanulási szegmentációs modell tanítási adatkészletébe, hogy az amorf magokat is képes legyen szegmentálni. Utóbbira, sebesség növelésének érdekében, a kizárólag transzmissziós képek (fluoreszcens jelölés nélkül) használata drasztikusan csökkentheti a képalkotás/elemzés költségét és idejét jelentős pontosság elvesztése nélkül. Ezek az elvek szintén alkalmazhatók egy önálló módszer kifejlesztésére a mellrák EMT osztályozására, csökkentve az időt, költséget és javítva a pontosságot az itt bemutatott lineáris regressziós módszerhez képest.

A bakteriális metabolitok szerepe az emlőtumorban

Az eddig azonosított bakteriális metabolitok többsége antineoplasztikus tulajdonságokat mutatott, és az emlőrákos betegeknél ezen metabolitok bioszintéziséért felelős enzimek szintje csökkent a bél mikrobiomban a kontrollhoz mintákhoz képest.

Tanulmányunkban 9 bioaktív metabolitot fedeztünk fel, amelyek hatással voltak a sejtproliferációra és a morfológiára. Habár a formiát jelentősen csökkentette a sejtproliferációt, de fontos megjegyezni, hogy a tanulmányunkban használt koncentráció a fiziológiás koncentrációtartomány felső értéke feletti.

Egy friss kutatás feltárta, hogy az ileopátia előfordul különböző tumorokban, beleértve az emlőtumort is. A gasztrointesztinális traktusban a lassabb passzázs nem csak a mikrobiom összetételére van hatással, de valószínűleg a gasztrintesztinális traktus tartalmának redox egyensúlyára is. Ebből a megfigyelésből kiindulva a bakteriális metabolitokat redox párokban is vizsgáltuk. Több rövid-szénláncú zsírsav és poliolt között redox metabolit párokat azonosítottunk (pl. D-mannitol – D-mannóz, 1-butanol – butirát, etilén-glikol – glikolsav – oxálsav), ahol csak egy partner mutatott citosztatikus tulajdonságokat. Ezek a megállapítások arra utalnak, hogy a redox környezet befolyásolhatja a bakteriális metabolom/szekretom bioaktivitását.

Az általunk azonosított bakteriális metabolitok különböző kémiai csoportokhoz tartoznak, ami szükségessé teszi a vegyületek külön diszkutálását. A D-mannóz egy monoszacharid, míg a D-mannitol egy cukor-alkohol vagy poliol. Kísérleteinkben a D-mannitol szignifikánsan csökkentette a sejtproliferációt, míg redox párja, a D-mannóz nem volt hatással az emlőtumor sejtek proliferációjára. Szakirodalmi adatok alapján nefroprotektív hatása miatt a mannitol terápiás célpont a ciszplatinnal kezelt tumoros betegeknél, habár a tanulmányban alkalmazott koncentráció jóval magasabb (hózzávetőlegesen 16 mM), mint a kísérleteinkben alkalmazott legmagasabb koncentráció (128 μ M). Ezzel ellentmondásban más tanulmányok nefrotoxikus hatást tulajdonítanak a mannitolnak magas koncentrációban alkalmazva veseelégtelenségben szenvedő betegeknél. Jelenleg a D-mannitolt még nem vizsgálták más tumor vonatkozású tanulmányban.

Egy másik poliol, a 2,3-butándiol egyedi az általunk vizsgált bakteriális metabolitok között, mivel egyidejűleg gátolta a sejtproliferációt és az EMT-t. Érdeemes megjegyezni, hogy a 2,3-butándiol szintézisének képessége széleskörűen elterjedt a baktériumokban. Ezek alapján a 2,3-butándiol tűnik a legígéretesebb anti-neoplasztikus bakteriális metabolitnak a vizsgált anyagok közül.

Az oxálsav, glikolsav és etilén-glikol redox tengely tagjai közül eredményeink alapján kizárólag a glikolsav volt hatással az emlőtumor sejtekre. A rövid szénláncú zsírsavak közé tartozó glikolsav szignifikánsan csökkentette a sejtproliferációt. A D-mannitolhoz hasonlóan, a glikolsav még tumor vonatkozásában nem volt korábban vizsgálat tárgya. A fiziológias koncentráció tartományát leszámítva az elérhető információ alapján hámlasztó és akne elleni készítményekben alkalmaznak glikolsavat.

A butirát, szintén rövid szénláncú zsírsav, antiproliferatív tulajdonságot mutatott kísérleteinkben. A butirát az emlőtumor sejtekre több különböző mechanizmuson keresztül hat, inhibitora a hiszton deacetilázoknak (egy epigenetikai módosító), egy metabolikus szubsztrát, és ligandja a szabad zsírsav receptoroknak. Emlőtumoros betegek székletmintáiban a butirát szintje csökken.

A transz-ferulsav egy polifenol, mely csökkentette a sejtproliferációt. A szakirodalom alapján a ferulsav egy potenciálisan anti-tumor hatású mikrobiális metabolit, mely az emlőtumor sejtek proliferációját gátolja, apoptózist idéz elő, csökkentette a migrációs sebességét *in vitro* kísérletekben 10-100 μ M koncentrációtartományban. Friss tanulmányok feltételezik, hogy akár az emlőtumor kialakulását is gátolhatja. Fontos megjegyezni, hogy a kísérleteinkben vizsgált

molekula a ferulsav transz izoformája, ezért az eredményeinket is ennek függvényében szükséges értelmezni.

A 4-hidroxibenzoésavat a mikrobiom chorizmátból szintetizálja. Képes kötődni az ösztrogén receptorhoz, a peroxiszóma proliferátor aktivált receptorhoz (PPAR) γ és a G-fehérje kapcsolt receptor 40 (GPR40)-hez. A 4-hidroxibenzoésav elősegítette a sejtek proliferációját és gátolta az EMT-t.

A vanilinsav a benzoésavak kémiai osztályába tartozik. A transz-ferulsavval együtt megtalálható olyan baktérium vagy növény kivonatokban, melyeket antitumor potenciáljuk miatt korábban már teszteltek. Továbbá a vanilinsav pro-oxidánsként és sejtproliferáció gátlóként viselkedik.

Végezetül, a polifenolokhoz tartozó 3-hidroxifenilecetsav csökkentette a sejtproliferációt, továbbá a hidrocinnamonsav és a 3-hidroxifenilecetsav gátolta az EMT-t.

Olyan vegyületek, mint a hidrocinnamonsav, a 3-hidroxifenilecetsav és 4-hidroxifenilecetsav, egy aromás gyűrűt és egy poláris karboxil csoportot tartalmaznak. Kimutatták, hogy a hidrocinnamonsav a tejsavat termelő baktériumok terméke. Másrészt a 3-hidroxifenilecetsav egy flavonoid vegyület, mely kvercetin-származékok lebontásával keletkezik, amit részben Clostridiales baktériumok szintetizálnak az emberi mikrobiomban. Ezen túlmenően, a 3-hidroxifenilecetsavnak citoprotektív tulajdonságai vannak és képes kötődni a γ -hidroxibutirát receptorhoz.

A tanulmányban azonosított több metabolitnak, mint például a glikolsavnak, hidrocinnamonsavnak, 2,3-butándiolnak, 3-hidroxifenilecetsavnak és 4-hidroxifenilecetsavnak, antibakteriális aktivitását már kimutatták vagy részt vesznek quorum érzékelésben. Ez arra utal, hogy ezek a metabolitok nem csak az emlőtumor sejteket befolyásolják, hanem a mikrobiomra is hatással vannak.

A vanilinsav, 4-hidroxibenzoésav és 3-hidroxifenilecetsav bizonyos koncentrációkban támogatta a proliferációt, mutatva egy inverz V alakú dózis-válasz görbét. Ez a viselkedés hasonló bizonyos korábban azonosított daganatellenes bakteriális metabolitokhoz, mint például az indoxil-szulfát vagy indolpropionsav (mindkét esetben V alakú görbét láttunk). Egy inverz V alakú görbe olyan eseménysorozatot sugall, ahol egy receptor kezdetben stimulálódik, elősegítve a proliferációt alacsony koncentrációban, majd egy másik receptor aktiválódik, gátolva a proliferációt magasabb koncentrációban. Bár a toxicitás néha hasonló mintázatot mutathat magas

koncentrációkban, ebben a tanulmányban a vegyületeket az referencia koncentrációtartományon belül használtuk, csökkentve a toxikus hatás valószínűségét.

Ezen munka több aspektusa is lehetséges jövőbeli kutatási projekthez vezethet. Először is, a bakteriális metabolitok bizonyítottan módosítják az emlőtumor sejtek viselkedését *in vivo* és *in vitro*. A bakteriális metabolitok által módosított sejtfolyamatok értékes terápiás célpontként, valamint diagnosztikai eszközként is szolgálhatnak. Ez a munka már elkezdődött az LCA jelátviteli útvonalainak leírásával ebben a tanulmányban. Logikus folytatás lenne megvizsgálni, az LCA-t potenciálisan citosztatikus szerként alkalmazható-e a jelenleg rendelkezésre álló terápiás megközelítések kiegészítéseként.

Továbbá, a metabolit szűrővizsgálatokban azonosított bakteriális metabolitok azt mutatják, hogy az LCA mellett más bakteriális metabolitok is befolyásolhatják az emlőtumor sejtek anyagcseréjét. Tekintettel arra, hogy a diszbiózis korrelál az emlőtumorról, egy lehetséges diagnosztikai eszköz fejlesztésének kis szegmensét látjuk ezekből az eredményekből. Az első lépés ebben az irányban az lenne, hogy azonosítsuk azokat a bakteriális enzimeket, amelyek felelősek az azonosított bakteriális metabolitok szintéziséért.

Végül, mivel a jelenlegi munka kutatási módszer fejlesztésére is összpontosított, egy teljesen automatizált és olcsó kutatási eszközt lehet fejleszteni az emlőtumorban a képalkotási és elemzési eszközök finomhangolásával. Jelenlegi állapotában a tumor két ismertetőjegye – nevezetesen a sejtproliferáció és az EMT – mikroszkópiával követhető a 4T1 emlőtumor sejtmodellben. Azonban ezeket a módszereket általában alkalmazni lehet minden *in vitro* kísérletben, még a rákkutatáson túl is kisebb módosításokkal (pl. bementi és ground truth képek kicserélésével).

Összefoglalás

A mikrobiom és a gazdaszervezet között kétirányú kapcsolat áll fenn. A baktériumok – melyek az emberi szervezet különböző testüregeiben élnek – számos metabolitot termelnek, melyek befolyásolhatják a gazdaszervezet metabolizmusát és energia háztartását. Külső és belső tényezők (étrend, személyes higiénia, genetika, életkor) által a gazdaszervezet is befolyásolja a mikrobiom összetételét és működését. Számos betegség, köztük az emlődaganat is összefüggésbe hozható a mikrobiom összetételében és működésében bekövetkező változásokkal.

A litokólsav (LCA), egy másodlagos epesav, melyet a baiH ORF-et kódoló baktériumok állítanak elő. Az LCA a véráram útján a test távoli pontjaiba is eljut, így az emlődaganat szövetekhez is. Kísérleteinkben az LCA gátolta a sejtosztódást és a kolóniaformálási kapacitást MCF7, 4T1 és SKBR3 sejtekben, valamint gátolta az epithelialis-mesenchymalis tranzíciót, a sejt energia-anyagcseréjét az oxidatív foszforiláció irányába változtatta, tehát anti-Warburg hatást mutatott a sejt kultúrákban. Az LCA gátolta a sejt migrációt és elősegítette a sejt-sejt és sejt-felszín kapcsolatokat. Primer tumorokban LCA hatására a tumor-infiltráló limfociták száma megnőtt. A kísérletek azt mutatják, hogy az LCA ezen hatásait a TGR5 receptoron keresztül fejt ki, mivel a receptor gátlásával vagy csendesítésével az LCA-indukált EMT és az EMT-re jellemző gének kifejeződése (pACC, ATP5G1, NDUFB5) gátolt.

A tanulmányban továbbá megvizsgáltuk az általunk válogatott bakteriális metabolit könyvtár tagjainak hatását. Ezeknek a bakteriális metabolitoknak ismert a fiziológiás szérumban való koncentrációja. A könyvtárból kilenc metabolit bizonyult bioaktívnek. A butirát, glikolát, D-mannitol, 2,3-butándiol és transz-ferulát csökkentette, míg a 4-hidroxibenzoát, vanilinsav, 3-hidroxifenilacetát elősegítette a sejtproliferációt. A metabolitok közül a 4-hidroxibenzoát, 2,3-butándiol, hidrocinnamonsav és 3-hidroxifenilacetát szignifikánsan gátolta az EMT-t és nem találtunk olyan metabolitot, mely elősegítette volna.

Jelen disszertáció alapján az LCA gátolja az emlőtumoros sejtek főbb jellemzőit, potenciálisan befolyásolja a karcinogenezist. Továbbá, az újonnan felfedezett bioaktív metabolitoknak hasonló tulajdonságaik lehetnek. Azonban ez a terület további kutatásokat igényel, hogy igazoljuk ezeket a hatásokat.

Kulcsszavak

Litokólsav, emlőcarcinoma, bakteriális metabolitok, EMT, szemantikus szegmentálás



Nyilvántartási szám: DEENK/448/2023.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ujlaki Gyula

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ujlaki, G.**, Kovács, T., Vida, A., Kókai, E., Rauch, B., Schwarcz, S., Mikó, E., Janka, E. A., Sipos, A., Hegedűs, C., Uray, K., Nagy, P., Bai, P.: Identification of bacterial metabolites modulating breast cancer cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition.
Molecules. 28 (15), 1-18, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules28155898>
IF: 4.6 (2022)
2. 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

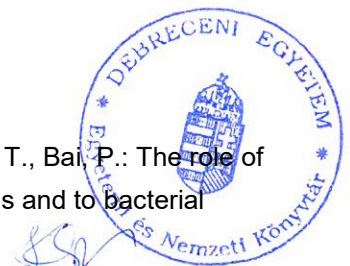
További közlemények

3. Skopál, A., **Ujlaki, G.**, Gerencsér, A., Bankó, C., Bacsó, Z., Ciruela, F., Virág, L., Haskó, G., Kókai, E.: Adenosine A2A Receptor Activation Regulates Niemann-Pick C1 Expression and Localization in Macrophages.
Curr. Issues Mol. Biol. 45 (6), 4948-4969, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cimb45060315>
IF: 3.1 (2022)
4. Antal, D., Pór, Á., Kovács, I., Dull, K., Pólska, S., **Ujlaki, G.**, Demény, M. Á., Szöllősi, A. G., Kiss, B. K., Szegedi, A., Bai, P., Szántó, M.: PARP2 promotes inflammation in psoriasis by modulating estradiol biosynthesis in keratinocytes.
J. Mol. Med. (Berl). 101 (8), 987-999, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00109-023-02338-z>
IF: 4.7 (2022)





5. Schwarcz, S., Kovács, P., Kovács, T., **Ujlaki, G.**, Nyerges, P., Uray, K., Bai, P., Mikó, E.: The pro- and antineoplastic effects of deoxycholic acid in pancreatic adenocarcinoma cell models.
Mol. Biol. Rep. 50 (6), 5273-5282, 2023.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11033-023-08453-x>
IF: 2.8 (2022)
6. Lénárt, K., Bankó, C., **Ujlaki, G.**, Póliska, S., Kis, G., Csősz, É., Antal, M., Bacsó, Z., Bai, P., Fésüs, L., Mádi, A.: Tissue Transglutaminase Knock-Out Preadipocytes and Beige Cells of Epididymal Fat Origin Possess Decreased Mitochondrial Functions Required for Thermogenesis.
Int. J. Mol. Sci. 23 (9), 5175, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23095175>
IF: 5.6
7. Kiss, B. K., Mikó, E., Sebő, É., Tóth, J., **Ujlaki, G.**, Szabó, J., Uray, K., Bai, P., Árkosy, P.: Onkobiózis és mikrobiális metabolikus jelátvitel pancreas-adenocarcinómában.
Cent. Eur. J. Gastro. Hepatol. 7 (2), 57-65, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.33570/CEUJGH.7.2.57>
8. Kacsir, I., Sipos, A., **Ujlaki, G.**, Buglyó, P., Somsák, L., Bai, P., Bokor, É.: Ruthenium half-sandwich type complexes with bidentate monosaccharide ligands show antineoplastic activity in ovarian cancer cell models through reactive oxygen species production.
Int. J. Mol. Sci. 221, 1-41, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms221910454>
IF: 6.208
9. Jankó, L., Kovács, T., Laczik, M., Sári, Z., **Ujlaki, G.**, Kis, G., Horváth, I., Antal, M., Vigh, L., Bálint, B. L., Uray, K., Bai, P.: Silencing of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-2 Induces Mitochondrial Reactive Species Production and Mitochondrial Fragmentation.
Cells. 10 (6), 1387, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells10061387>
IF: 7.666
10. Kovács, T., Mikó, E., **Ujlaki, G.**, Mustafa, H. Y. H., Csontos, V., Uray, K., Bai, P.: The involvement of oncobirosis and bacterial metabolite signaling in metastasis formation in breast cancer.
Cancer Metastasis Rev. 40, 1223-1249, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10555-021-10013-3>
IF: 9.237
11. Sipos, A., **Ujlaki, G.**, Mikó, E., Maka, E., Szabó, J., Uray, K., Krasznai, Z. T., Bai, P.: The role of the microbiome in ovarian cancer: mechanistic insights into oncobirosis and to bacterial metabolite signaling.
Mol. Med. 27 (1), 1-20, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/s10020-021-00295-2>
IF: 6.376





12. 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. K., 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: 6.639
13. 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: 6.639
14. Kiss, B. K., Mikó, E., Sebő, É., Tóth, J., **Ujlaki, G.**, Szabó, J., Uray, K., Bai, P., Árkosy, P.: Oncobiosis and microbial metabolite signaling in pancreatic adenocarcinoma.
Cancers (Basel). 12 (5), 1-34, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12051068>
IF: 6.639
15. 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)
16. Kovács, T., Mikó, E., Vida, A., Sebő, É., Tóth, J., Csonka, T., Boratkó, A., **Ujlaki, G.**, Lente, G., Kovács, P., Tóth, D., Árkosy, P., Kiss, B. K., Méhes, G., Goedert, J. J., Bai, P.: Cadaverine, a metabolite of the microbiome, reduces breast cancer aggressiveness through trace amino acid receptors.
Sci Rep. 9 (1), 1-14, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-37664-7>
IF: 3.998
17. 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.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11091255>
IF: 6.126





18. Mikó, E., Kovács, T., Sebő, É., Tóth, J., Csonka, T., **Ujlaki, G.**, Sipos, A., Szabó, J., Méhes, G., Bai, P.: Microbiome-Microbial Metabolome-Cancer Cell Interactions in Breast Cancer-Familiar, but Unexplored.
Cells. 8 (4), 1-33, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells8040293>
IF: 4.366
19. Nagy, L., Rauch, B., Balla, N., **Ujlaki, G.**, Kis, G., Omar, A. R., Kristóf, E., Sipos, A., Antal, M., Tóth, A., Debreceni, T., Horváth, A., Maros, T. M., Csizmadia, P., Szerafin, T., Bai, P.: Olaparib induces browning of in vitro cultures of human primary white adipocytes.
Biochem. Pharmacol. 167, 76-85, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.022>
IF: 4.96

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 94,095

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
9,041**

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, 2023.10.02.

