

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**MiRNS-ek biomarkerként való alkalmazhatóságának
vizsgálata a petefészekrák diagnosztikájában**

Márton Éva

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Bálint, egyetemi tanár



DEBRECENI EGYETEM
MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI
ISKOLA

Debrecen, 2021

MiRNS-ek biomarkerként való alkalmazhatóságának vizsgálata a petefészekrák diagnosztikájában

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

Írta: **Márton Éva**
okleveles biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt-és
Immunbiológia doktori iskolája keretében

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Bálint, Ph.D, D.Sc.

Az értekezés bírálói: Dr. Nagy Béla, PhD
Dr. Nagy Gyula Richárd, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Bácsi Attila, az MTA doktora
tagok: Dr. Nagy Béla, PhD
Dr. Nagy Gyula Richárd, PhD
Dr. Benkő Szilvia, PhD
Dr. Csire Márta, PhD

Az értekezés védésének (online formában) időpontja: 2022. 04. 27.
13:00 óra

A nyilvánosságot online módon biztosítjuk. Amennyiben a vitán részt kíván venni, úgy jelezze a marton.eva@med.unideb.hu email címre küldött üzenetben 2022.04.26. 16:00 óráig.

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

A petefészekrák a nőgyógyászati daganatok legsúlyosabb formája, amely évente több százezer nő halálát okozza (Sung és mtsai, 2021). Előfordulásának gyakorisága a fejlett országokban különösen magas, mely azzal is magyarázható, hogy a hajlamosító tényezők között szerepel a szülések alacsony száma, a különböző mutációk (*BRCA1*, *BRCA2*) megléte, továbbá az ösztrogén alapú hormonpótló terápiák hosszútávú alkalmazása is (Stewart és mtsai, 2019). A fiziológiás ösztrogén mellett a xenoösztrogéneknek [Zearalenon (ZEA)-mikotoxin; Bisphenol A (BPA)- műanyag adalékanyag] való nagyfokú kitettség is növeli a nőgyógyászati ráktípusok, köztük a petefészekrák kialakulásának a kockázatát (Rogowska és mtsai, 2019; Sang és mtsai, 2021).

A kifejezetten rossz túlélési esélyek fő oka, hogy a diagnózisra legtöbbször előrehaladott stádiumban kerül sor. A betegség diagnosztizálásakor mai napig a szövettani vizsgálat eredményét tekintik a legelfogadottabb eljárásnak, amely azonban invazív mintavételen alapuló eljárás és nem alkalmas a betegség nyomon követésére. Az ún. folyadék biopszia – amely a testfolyadékokban jelen lévő biomarkerek kimutatását célozza meg – ezzel szemben egy ígéretes, nem-inzavív diagnosztikai eljárás, mely alkalmazásakor a mintavétel könnyen kivitelezhető, ezáltal a diagnózis gyorsabban felállítható. További előnyei közé tartozik, hogy ismételtetősége miatt alkalmas a betegség és/vagy a kezelés hatékonyságának a nyomon követésére, továbbá a tumor egészéről

szolgáltat információt, így nem zavarja a tumorok esetében jellemző heterogenitás (Otsu és mtsai, 2019).

A vizsgált biomarkerek lehetnek szabad nukleinsavak, azaz genomi vagy mitokondriális DNS fragmentek, illetve nem kódoló RNS molekulák (pl. mikroRNS-ek) egyaránt (Szilágyi és mtsai, 2020). A miRNS-ek olyan kisméretű (~19-25nt hosszúak) nem-kódoló RNS-molekulák, amelyek fontos szerepet játszanak a gének poszt-transzkripcionális szabályozásában. Számos biológiai folyamatban vesznek részt, pl. a sejtproliferáció és az apoptózis megvalósulásában, így hozzájárulhatnak a tumorok keletkezéséhez, ill. inváziójához is. Ennek következtében a tumor sejtekre a normálistól eltérő miRNS mintázat a jellemző, ami az intracelluláris és a szabad miRNS szintekre egyaránt igaz, ebből adódóan ígéretes biomarkerekként tartják őket számon (Wang és mtsai, 2018; Szilágyi és mtsai, 2020). Alkalmazásuk előnyei közé tartozik nagyfokú specifitásuk mellett, hogy rendkívül stabilak és detektálásukat számos molekuláris biológiai módszer is lehetővé teszi (pl. qPCR).

2. Célkitűzések

A petefészekrák diagnosztizálásában ugyan rendelkezésre áll néhány biomarker (CA125 és HE4), azonban ezek nem hoztak lényeges javulást a hatékonyabb diagnosztizálása terén (Montagnana és mtsai, 2017). Munkánk során célul tűztük ki miRNS alapú biomarker jelöltek azonosítását, melyek jövőbeli alkalmazása hozzájárulhat a túlélési esélyek javulásához. Ennek érdekében az alábbi vizsgálatokat végeztük el:

- Biomarkernek alkalmas miRNS jelöltek keresését: petefészekrákban szenvedő és egészséges egyénektől származó vérminták miRNS profilját (miR-200 család, miR-34 család, miR-203a és miR-205) hasonlítottuk össze qPCR segítségével.
- A petefészekrák patofiziológiájában jelentősnek tűnő miRNS-ek vizsgálatát ovárium sejt kultúrákban: az előző pontban azonosított miR-200 család, miR-34 család, miR-203a és miR-205 biológiai relevanciájának vizsgálatát végeztük el ösztrogén érzékeny és nem érzékeny humán epiteliális ovárium sejt kultúrákon.

3. Anyagok és módszerek

A felhasznált vérplazmaminták

Munkánk során 28 rosszindulatú petefészek elváltozással rendelkező beteg, illetve 60 egészséges egyén vérplazma mintáit használtuk fel, melyek a DEKK, Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán kerültek begyűjtésre EDTA-csövekben. A vizsgálati protokollt az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT TUKEB) hagyta jóvá [30231-2/2016/EKU]. A vérplazmát kétlépéses centrifugálással választottuk el, majd feldolgozásukig -80°C-on tároltuk.

Felhasznált sejt vonalak és tenyésztésük

Vizsgálatainkhoz két humán epiteliális ovárium sejt vonalat alkalmaztunk, melyek az ösztrogén kezelésre érzékeny PEO1 (ER α ; ER β), illetve az ösztrogénekre nem érzékeny A2780 (ER β)

sejtvonalak voltak. Mindkét sejtvonal fenntartása RPMI1640 médiumban történt, amelyet 10% (PEO1), vagy 5% (A2780) FBS-el illetve 1% L-glutaminnal és 100 ug/ml sztreptomycin-100 U/ml penicillin elegyével egészítettünk ki (37°C, 5% CO₂). Kísérleteinket megelőzően a sejtvonalak Mycoplasma mentességéről a PCR Mycoplasma Test Kit I/C (Promokine) segítségével győződünk meg. Az E2, ZEA és BPA molekulákkal történő kezeléseket 24-, illetve 96-lyukú lemezekben végeztük. Ekkor a sejtek letapadását követően a fenntartó médiumot 5% DCC-FBS-el és 1% L-glutaminnal kiegészített PRF-RPMI1640-médiumra cseréltük, majd 24 órás inkubálást követően a sejteket E2, ZEA és BPA molekulákkal (1-1000 nM) kezeltük, és a mintavétel időpontjáig tovább inkubáltuk őket (37°C, 5% CO₂). Kontrollként minden esetben kezelésen át nem esett, de minden tekintetben ugyanolyan körülmények között tenyésztett sejteket alkalmaztunk.

Sejtvonalak fenotípusos vizsgálata

Az E2, ZEA és BPA molekulák sejtprolifерációra gyakorolt hatását sejtszámolással (Bürker-kamra felhasználásával), a migrációra gyakorolt hatását pedig Scratch assay segítségével határoztuk meg. A kezeléseket esetleges toxikus hatását az apoptózis (mitokondriális membránpotenciál meghatározása DilC1 (5) festék felhasználásával), illetve sejtlízis (LDH aktivitás meghatározása a sejtenyészetek felülúszójában, CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit; Thermo Fisher Scientific) jelenlétével határoztuk meg.

Ko-kultúrás vizsgálat

A ko-kultúrás vizsgálatok alkalmával a PEO-1 sejtvonalat a Millicell sejtenyésztő inzeretekbe (0,4 nm pórusméret, Merck Millipore) tapasztottuk, amit olyan 24-lyukú lemezre helyeztünk, ahova előzőleg az A2780 sejteket tapasztottunk. A transzkripciós vizsgálatokat 12, illetve 24h együtt tenyésztést követően végeztük el.

mRNS izolálás és qPCR

Az *ESR1* (ösztrogén receptor), *GREB1* (növekedési regulátor), a *CA12* (anhidráz), a *DEPTOR* (mTORC cél fehérje), az *RBBP8* (RB kötő fehérje 8), a *CDH1* (E-kadherin) és a *ZEB1* [epiteliális-mezenchimális átalakulás (EMT)-ban közreműködő transzkripciós faktor] gének expressziójának vizsgálata során a sejtenyészetekből az mRNS izolálása az RNeasy Mini Kit (Qiagen) segítségével történt. A gének expresszióját qPCR segítségével, a QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen) és a Lightcycler 96 PCR készülék felhasználásával végeztük. A kapott eredmények normalizálásakor a *GAPDH* gént alkalmaztuk referenciaként. A relatív expressziós szintek változását a ΔC_t módszerrel értékeltük ki.

Intracelluláris és szabad miRNS-ek izolálása és qPCR

A szabad miRNS szintek meghatározásakor a miRNS frakciót is tartalmazó totál RNS izolálása a vérplazma mintákból és a sejtkultúrák felülszójából a miRNeasy szérum/plazma kit (Qiagen) segítségével történt. Az intracelluláris miRNS szintek vizsgálatakor, a miRNS izolálás a sejtenyészetekből a miRNeasy Kit (Qiagen) felhasználásával történt. A miR-200a-3p, miR-200b-3p, miR-200c-

3p, miR-141-3p, miR-429-3p, miR-34a-5p, miR-34b-3p, miR-34c-3p, miR-203a-3p és miR-205-5p expressziójának vizsgálatakor a miScript rendszert alkalmaztuk (miScript Primer Assays; miScript II RT Kit, illetve miScript SYBR green PCR kit; Qiagen) a Lightcycler 96 PCR készülék felhasználásával. A kapott eredmények normalizálásakor a miR-103-3p-t alkalmaztuk referenciaként. A relatív expresszió meghatározását a ΔCt módszerrel végeztük.

miRNS-ek bioinformatikai elemzése

A miRNS-ek közötti funkcionális kapcsolatok megismerése érdekében a közös célgéneket a miRTargetLink adatbázis (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/multinet.php>; Hamberg és mtsai, 2016) segítségével, míg a közös célgének funkcionális annotációját a DAVID tools segítségével végeztük el (<https://david.ncifcrf.gov/summary.jsp>; Huang és mtsai, 2009).

Az eredmények statisztikai analízise

A tanulmány során kapott eredményeket a GraphPad Prism 8 és SPSS 25 statisztikai csomagok segítségével elemeztük. A vérplazma minták esetén a miRNS expresszióban megmutatkozó különbség szignifikanciáját Mann–Whitney U teszttel határoztuk meg. A miRNS expressziós szintek között fennálló korrelációt Spearman korrelációs koefficiens kiszámításával, a CA125 és HE4 markerekkel való egyezést Cohen kappa teszttel jellemeztük. Az egyes miRNS-ek diagnosztikai potenciálját a ROC-AUC, szenzitivitás, specificitás, pozitív és negatív prediktív értékek, valamint a diagnosztikai pontosság kiszámításával jellemeztük. A

sejttenyészetekkel való vizsgálataink eredményeinek elemzése One-way ANOVA (post-hoc analízis: Dunnett teszt) segítségével történt. Az expressziós adatok páronkénti összehasonlítását Student t-teszt segítségével végeztük, a ΔC_t értékek felhasználásával.

4. Eredmények

Biomarkernek alkalmas miRNS jelöltek keresése

Munkánk első szakaszában, szakirodalmi adatok alapján kiválogatott miRNS-ek (a miR-200, és miR-34 családba tartozó miRNS-ek, miR-203a és miR-205) expresszióját hasonlítottuk össze petefészekrákban szenvedő betegektől és egészséges egyénektől származó vérplazma mintákban. Eredményeink alapján a miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-34b, miR-203a ($p < 0,001$), miR-205 ($p < 0,01$) és a miR-34a ($p < 0,05$) relatív expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a petefészekrákban szenvedő egyének vérmintáiban, azonban a miR-34c expressziójában mutatott különbség nem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0,222$). A szignifikáns különbséget mutató miRNS-ek esetén meghatározott diagnosztikai paraméterek a miR-34a (ROC-AUC: 0,655) és miR-205 (ROC-AUC: 0,683) esetén voltak a legalacsonyabbak, azonban a többi miRNS esetében ígéretesnek bizonyultak. A ROC-AUC a miR-200c esetén volt a legnagyobb (0,861), a szenzitivitás a miR-200a, miR-141 és miR-429 (85,71%), a specificitás a miR-200b (90%), a diagnosztikai pontosság a miR-200b (82,95%) esetén bizonyult a legmagasabbnak. Meghatároztuk továbbá a vizsgált miRNS-eken alapuló tesztek egymással, illetve a hagyományosan alkalmazott CA125 és HE4

markerekkel való egyezést is, amelyhez Cohen kappa tesztet alkalmaztunk. Eredményeink alapján elmondható, hogy a legnagyobb egyezés a miR-200b és miR-200c-n alapuló tesztek között volt megfigyelhető ($\kappa=0,889$). Ugyan a miRNS-eken alapuló tesztek CA125-al való egyezése gyengének bizonyult, de a miR-200b és miR-200c HE4-el való egyezése közepesnek adódott ($\kappa=0,400$ és $\kappa=0,481$).

Eredményeink alapján a vizsgált miRNS-ek ígéretes biomarker jelöltek lehetnek a petefészekrák diagnosztikájában, ami jó összhangban van korábbi tanulmányok eredményeivel (Chen és mtsai, 2019; Maeda és mtsai, 2020). Feltételezzük továbbá, hogy ezek hatékonysága tovább növelhető többváltozós diagnosztikai tesztek alkalmazásával – pl. a miR-200b és miR-200c HE4-el való kombinálásával – ami számos alkalommal bizonyult hatékony alternatívának (Montagnana és mtsai, 2017).

A folytatásban megvizsgáltuk ezen miRNS-ek között fennálló funkcionális kapcsolatot is, az expressziójuk között fennálló korreláció mértéke (Spearman korreláció), illetve a közös célgénjeik száma alapján. Eredményeink alapján azon miRNS-ek expressziós szintjei erősebben korreláltak egymással, amelyek több közös célgénnel rendelkeztek. Ez a jelenség a miR-200b és miR-200c esetében volt a legszembetűnőbb, ahol az $r_s = 0,774$ -nek, a közös célgének száma pedig 43-nak adódott. A célgének bioinformatikai elemzése feltárta továbbá, hogy a vizsgált miRNS-ek célgénjei több, a transzkripcióhoz, sejtprolifерációhoz és migrációhoz köthető

folyamatban is dúsulást mutattak. Ezen felül a miR-200 család tagjai által közösen szabályozott célgének és a miR-203a szerepe egyaránt valószínűsíthető az ösztrogén válaszhoz köthető útvonal működésében is.

A petefészekrák patofiziológiájában jelentős miRNS-ek vizsgálata ovárium sejt kultúrákban

Munkánk folytatásaként megvizsgáltuk, hogy a miR-200 és miR-34 család tagjai, továbbá a miR-203a és miR-205 milyen mértékű biológiai relevanciával rendelkezhetnek ovárium sejtekben, illetve milyen szerepük lehet az ösztrogén hatásmechanizmusában. Ezen vizsgálatokhoz egy ösztrogén kezelésre érzékeny (PEO1: van ER α expresszió) és nem érzékeny (A2780: nincs ER α expresszió) ovárium sejt vonalat használtunk. Eredményeink alapján a miR-200 család tagjai, a miR-203a és a miR-205 erős alap expressziót mutattak a PEO1 sejt vonalban, melyek közül a miR-200b és miR-200c rendelkezett a legmagasabb expressziós szinttel. Ezzel szemben ezen miRNS-ek rendkívül alacsony expressziót mutattak az A2780 sejt vonalban. A miR-34a és miR-34b expressziója emellett mindkét sejt vonalban nehezen kimutathatónak bizonyult. Hasonló tendencia volt megfigyelhető, amikor ezen miRNS-ek expresszióját a sejttenyészetek felülszójában határoztuk meg (szabad miRNS expresszió). Ezen megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a miR-200, miR-203a és miR-205 feltehetőleg nagyobb biológiai relevanciával rendelkeznek az ösztrogén érzékeny sejtekben, ami nemcsak az intracelluláris, de a szabad miRNS molekulákra is ugyanúgy igaz lehet.

Ezen hipotézisünk tesztelése érdekében megvizsgáltuk a PEO1 és A2780 sejtvonalak fenotípusos, illetve gén és miRNS expresszióban megmutatkozó viselkedését E2, valamint ZEA és BPA kezelések hatására. A fenotípusos vizsgálatok alkalmával az E2, ZEA és BPA kezelések sejtproliferációra, migrációra és sejthalálra (apoptózis, sejtlízis) gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Eredményeink alapján az E2, a ZEA (1-100 nM) és a BPA (10-100 nM) jelentősen növelte a sejtek proliferációs képességét a PEO1 sejtvonalnál, mely hatás nem érvényesült az A2780 sejtvonal esetében. Hasonló jelenséget tapasztaltunk, amikor a sejtek migrációs képességét vizsgáltuk, ahol az E2, ZEA (10-100 nM) és BPA (10 nM) migrációt fokozó hatása csak a PEO1 sejtvonal esetében érvényesült. Érdemes ugyanakkor megemlíteni, hogy a kezelések ezen koncentráció tartományban való alkalmazása nem bizonyult toxikusnak a sejtvonalakra nézve, mivel sem az apoptózis, sem a sejtlízis jelenléte nem volt detektálható. Eredményeinkkel összhangban az E2, ZEA és BPA több sejtvonal esetében is a sejtproliferáció és migráció fokozódását idézte elő, mely hatás függött az ER α expressziójától (Ptak és mtsai, 2014; Andersen és mtsai, 2017; Kowalska és mtsai, 2018). Érdemes kiemelni továbbá, hogy ezen ösztrogén és xenoösztrogén molekulák már fiziológiailag releváns dózisban (1-10 nM) is hatást gyakoroltak a PEO1 sejtvonal esetében, valamint a ZEA hatása összeegyeztethető volt az E2 molekuláéval.

Az E2, ZEA és BPA hatását néhány, ösztrogén kezelésre különösen érzékeny gén expressziójának változásával is

megvizsgáltuk. Mind a *GREB1* (Fc=263,19), a *CA12* (Fc=37,01), a *DEPTOR* (Fc=5,39) és az *RBBP8* (Fc=9,58) is szignifikánsan magasabb expressziót mutattak az E2, ZEA és BPA kezelések hatására. Ezen eredményeink alapján is megállapítható, hogy a ZEA az E2-höz hasonló mértékű válasz megindítására volt képes, azonban a BPA esetén kisebb mértékű indukció volt megfigyelhető. Mivel a kezelések a migrációs képesség fokozódását idézték elő megvizsgáltuk az EMT folyamatában kulcsszereppel bíró *CDH1* és *ZEB1* gének expressziójának változását is a kezelések hatására. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására egyaránt a *CDH1* repressziója volt megfigyelhető (Fc=0,42). Ezáltal ezen gén represszációja nagymértékben hozzájárulhatott a sejtek migrációs képességének fokozódásához.

Az E2 kezelés miRNS expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálatok a miRNS szintek időfüggő változását tapasztaltuk. A kezeléseket 12 órát követően a miR-200a (Fc=1,52), miR-200b (Fc=2,9), miR-200c (Fc=3,28), miR-141 (Fc=3,32) és miR-203a (Fc=1,73) indukciója, míg 24 órával később a miR-200b (Fc=0,28) és miR-200c (Fc=0,43) repressziója volt megfigyelhető. Hasonló változásokat tapasztalunk a BPA kezelés hatására, azonban a ZEA kezelés kisebb mértékű hatást gyakorolt a miRNS expresszióra. Ezáltal ezen miRNS-ek fontosak lehetnek az ösztrogének kiváltotta válasz meghatározásában, ami különösen szembetűnő a migráció vonatkozásában. Ugyanis a miR-200 család tagjai a *ZEB1* expressziójára gyakorolt negatív hatásukon keresztül befolyásolják a sejtek *CDH1* expresszióját, ezáltal pedig azok migrációs képességét

(Koutsaki és mtsai, 2014). A PEO1 sejtvonal esetében a magasabb miR-200 expresszió alacsonyabb *ZEB1* és magasabb *CDH1* expresszióval párosult, ami alacsonyabb migrációs képességet eredményezett. Azonban az E2 kezelést 24 órával követő miR-200 represszió a *CDH1* expressziójának csökkenését eredményezte, ami pedig a migráció fokozódásához vezetett. Hasonló jelenséget már más sejtvonalak esetén is leírtak (Park és mtsai, 2008). Ezen felül a PEO1-ben tapasztalt magasabb miR-200 és miR-203a expresszió, valamint ezek E2 hatására bekövetkező indukciója feltételezi az ER α részvételét ezen miRNS-ek transzkripciójában. Ezt megerősíti azon megfigyelésünk, hogy az MPP adagolása visszaszorította az E2, ezen miRNS-ek expressziójára gyakorolt induktív hatását.

Eredményeink alapján elmondható továbbá, hogy a szabad miRNS szintek jó korrelációban vannak az intracelluláris miRNS szintekkel, ami alap expressziójuk egymáshoz viszonyított arányaira valamint a kezelésekre adott válaszukra egyaránt igaznak bizonyult. Ezen felül ko-kultúrás eredményeink alapján ezen szabad miRNS-ek képesek bejutni a környező sejtekbe, mivel a miR-200b és miR-200c expressziójának szignifikáns növekedése ($p < 0,01$) volt megfigyelhető a PEO1-el való együtt tenyésztés hatására. Ez bizonyítja ezen miRNS-ek szerepét a tumor mikrokörnyezetének befolyásolásában, amit már számos esetben bizonyítottak (Kogure és mtsai, 2019). Felveti továbbá annak lehetőségét, hogy a szabad miRNSek hatékony biomarkerek lehetnek a sejttenyészetek fiziológiájának tanulmányozásakor.

5. Összefoglalás

A petefészekrákban szenvedő nők körében meglehetősen magas a halálozási arány, melynek oka elsősorban arra vezethető vissza, hogy a betegséget előrehaladott állapotban diagnosztizálják, amikor a túlélési esélyek már meglehetősen alacsonyak. A miRNS-ek fontosak lehetnek a tumorok kialakulásában szerepet betöltő gének expressziójának poszt-transzkripcionális szabályozásában, testfolyadékokban való megjelenésük és stabilitásuk pedig a nem invazív diagnosztikában alkalmas biomarker jelöltekké teszi őket. Munkánk során célul tűztük ki olyan miRNS-ek azonosítását, amelyek ígéretes biomarker jelöltek lehetnek a petefészekrák hatékonyabb diagnosztikáját célzó tesztek kidolgozásakor.

Munkánk első szakaszában sikerült azonosítanunk kilenc miRNS-t, amelyek emelkedett expressziót mutattak a petefészekrákban szenvedő egyének vérmintáiban. Ezek közül hét (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-203a, miR-34b) ígéretes diagnosztikai paraméterekkel rendelkezett. Ezen miRNS-ek közül a miR-200b és miR-200c expressziója erős korrelációt mutatott egymással, illetve az ezen miRNS-eken alapuló diagnosztikai tesztek között jó egyezést tapasztaltunk. Ezen miRNS-ek közepes egyezést mutattak továbbá a HE4 markerrel, ezáltal ígéretes jelöltek lehetnek a jövőben többváltozós diagnosztikai tesztek kidolgozásánál. Megvizsgáltuk továbbá ezen miRNS-ek expresszióját humán ovárium sejtvonalakban is, mely alapján megállapítható, hogy a miRNS expresszió erősen függött az ovárium sejtek ösztrogén érzékenységtől. Feltehetőleg a legnagyobb

biológiai relevanciával a miR-200b és miR-200c rendelkezik ösztrogén érzékeny petefészek tumorokban, mely miRNS-ek extracelluláris formái képesek hatást gyakorolni a környező sejtek miRNS tartalmára is. Ösztrogénkezelésre mutatott érzékenyséjük, valamint az ER α transzkripciójukra gyakorolt feltehetőleges befolyása alapján jó markerei lehetnek az ovárium sejtek érzékenységeinek, ezáltal pedig segíthetik a petefészekrák megfelelő terápiájának kiválasztását. Fenotípusos és génexpressziós vizsgálataink alapján az E2 mellett a ZEA és BPA is képes ösztrogén válasz elindítására az ER α -val rendelkező sejtekben, már fiziológiailag releváns dózisokban is. Ezért mindenképp szükséges e molekulák hatásmechanizmusának alaposabb megismerése.

Munkánk jelentőségét növeli, hogy a miRNS expressziót sejt kultúrákban és vérmintákban egyaránt összeveti. Feltételezésünk szerint a sejt kultúrákkal végzett vizsgálatok alapját képezhetik alkalmas biomarkerek azonosítását végző kutatásoknak.

6. Értekezés új megállapításai

- A miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-34a, miR-34b, miR-203a és miR-205 relatív expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a petefészekrákban szenvedő betegek plazma mintáiban.
- A miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-34b és miR-203a ígéretes diagnosztikai paraméterekkel rendelkeztek.

- Az miR-200b és miR-200c expressziója jó korrelációt mutatott egymással és a HE4 markerekkel, ezáltal alkalmas jelöltek lehetnek többváltozós diagnosztikai tesztek kidolgozásában a jövőben.
- A miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-203a és miR-205 expressziója erősen függött az ovárium sejtek ösztrogén érzékenységétől sejt kultúrákkal végzett vizsgálataink alapján.
- A miR-200b és miR-200c magas alapexpressziót mutatott az ER α -val rendelkező PEO1 sejt vonalban, mely magas biológiai relevanciájukat feltételezi ösztrogén érzékeny sejtekben.
- A miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 és miR-203a expressziója időfüggő módon változást mutatott ösztrogén kezelés hatására a PEO1 sejt vonalban. Ezen hatás nem jelentkezett MPP adagolását követően, ami arra utal, hogy az ER α hatást gyakorolhat transzkripciójukra.
- A szabad miR-200b és miR-200c expressziós szintek magasnak adódtak a PEO1 sejt vonalban, illetve ko-kultúrák vizsgálatunk alkalmával képesek voltak a környező sejtekbe bejutni.
- Fenotípusos és génexpressziós vizsgálataink alapján az E2 mellett a ZEA és BPA is képes a sejt proliferáció és a

migráció elindítására az ER α -val rendelkező sejtekben, már fiziológiailag releváns dózisokban is.

7. Irodalomjegyzék

Andersen, C. L., Sikora, M. J., Boisen, M. M., Ma, T., Christie, A., Tseng, G., Park, Y., Luthra, S., Chandran, U., Haluska, P., Mantia- Saldone, G. M., Odunsi, K., McLean, K., V. Lee, A., Elishaev, E., Edwards, R. P., Oesterreich, S. (2017). Active estrogen receptor-alpha signaling in ovarian cancer models and clinical specimens. *Clinical Cancer Research*, 23(14), 3802-3812.

Chen, S. N., Chang, R., Lin, L. T., Chern, C. U., Tsai, H. W., Wen, Z. H., Li, Y. H., Li, C. J., Tsui, K. H. (2019). MicroRNA in ovarian cancer: biology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *International journal of environmental research and public health*, 16(9), 1510.

Hamberg, M., Backes, C., Fehlmann, T., Hart, M., Meder, B., Meese, E., Keller, A. (2016). MiRTargetLink—miRNAs, genes and interaction networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 564.

Huang, D. W., Sherman, B. T., Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 1-13.

Kogure, A., Kosaka, N., Ochiya, T. (2019). Cross-talk between cancer cells and their neighbors via miRNA in extracellular vesicles: an emerging player in cancer metastasis. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), 1-8.

Koutsaki, M., Spandidos, D. A., Zaravinos, A. (2014). Epithelial–mesenchymal transition-associated miRNAs in ovarian carcinoma, with highlight on the miR-200 family: Prognostic value and prospective role in ovarian cancer therapeutics. *Cancer Letters*, 351(2), 173-181.

Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., Urbanek, K. A., Domińska, K., Piastowska-Ciesielska, A. W. (2018). Estrogen receptor α is crucial in zearalenone-induced invasion and migration of prostate cancer cells. *Toxins*, 10(3), 98.

Maeda, K., Sasaki, H., Ueda, S., Miyamoto, S., Terada, S., Konishi, H., Kogata, Y., Ashihara, K., Fujiwara, S., Tanaka, Y., Tanaka, T., Hayashi, M.,

Ito, Y., Kondo, Y., Ochiya, T., Ohmichi, M. (2020). Serum exosomal microRNA-34a as a potential biomarker in epithelial ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 13, 1-9.

Montagnana, M., Benati, M., Danese, E. (2017). Circulating biomarkers in epithelial ovarian cancer diagnosis: from present to future perspective. *Annals of Translational Medicine*, 5(13).

Otandault, A., Anker, P., Al Amir Dache, Z., Guillaumon, V., Meddeb, R., Pastor, B., Pisareva, E., Sanchez, C., Tanos, R., Tousch, G., Schwarzenbach, H., Thierry, A. R. (2019). Recent advances in circulating nucleic acids in oncology. *Annals of Oncology*, 30(3), 374-384.

Park, S. M., Gaur, A. B., Lengyel, E., Peter, M. E. (2008). The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & Development*, 22(7), 894-907.

Ptak, A., Hoffmann, M., Gruca, I., Barć, J. (2014). Bisphenol A induce ovarian cancer cell migration via the MAPK and PI3K/Akt signalling pathways. *Toxicology Letters*, 229(2), 357-365.

Rogowska, A., Pomastowski, P., Sagandykova, G., Buszewski, B. (2019). Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. *Toxicon*, 162, 46-56.

Sang, C., Song, Y., Jin, T. W., Zhang, S., Fu, L., Zhao, Y., Xinxin, Z., Wang, Z., Gao, H., Liu, S. (2021). Bisphenol A induces ovarian cancer cell proliferation and metastasis through estrogen receptor- α pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-9.

Stewart, C., Ralyea, C., Lockwood, S. (2019). Ovarian cancer: an integrated review. In *Seminars in oncology nursing*, WB Saunders, 35 (2), 151-156.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*.

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

Wang, H., Peng, R., Wang, J., Qin, Z., Xue, L. (2018). Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clinical epigenetics*, 10(1), 1-10.

8. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek **Prof. Dr. Nagy Bálintnak**, amiért lehetővé tette és mindvégig segítette munkámat a Humángenetikai Tanszéken. Hálával tartozom **Dr. Szilágyi- Bónizs Melindának**, amiért az évek során mindvégig ösztönözte és szakmailag irányította munkámat. Hálával tartozom a Humángenetikai tanszék minden munkatársának. Külön köszönet illeti **Dr. Penyige Andrást**, **Dr. Széles Lajost**, **Hádáné Dr. Birkó Zsuzsannát** valamint **Dr. Soltész Beátát**, amiért segítetek ezen eredmények megszületésében. Hálásan köszönöm **Magyarné Trefán Katalinnak**, hogy mindig számíthattam pontos és precíz munkavégzésére. Köszönet illeti korábbi és jelenlegi TDK hallgatóimat **Diana Maricela Herrera Villarroel-t**, **Szabó Rékát**, **Kiss Grétát**, **Domoszlai Dórát**, és **Varga Alexandrát** lelkes segítségükért.

Szeretnék köszönetet mondani kooperációs partnereinknek, **Dr. Janka Eszter-nek** (DEKK, Bőrgyógyászati Klinika) a statisztikai vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségéért, **Prof. Dr. Póka Róbertnek** és **Dr. Lukács Jánosnak** (DEKK, Szülészeti és Nőgyógyászati Intézet) a vérminták rendelkezésünkre bocsátásáért, valamint **Dr. Markovics Arnoldnak** (DE, MÉK, Élelmiszertechnológiai Intézet) a sejtkultúrákkal végzett kísérletek lebonyolításában nyújtott segítségéért.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani családomnak és barátaimnak, amiért végig mellettem álltak és támogattak. Nélkülük nem jutottam volna el eddig.

9. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/312/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Márton Éva

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10067424

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Márton, É.**, Varga, A., Soltész, B., Penyige, A., Lukács, J., Póka, R., Nagy, B., Szilágyi, M.: Comparative Analysis of Cell-Free miR-205-5p, let-7f-5p, and miR-483-5p Expression in Ovarian Cell Cultures and Plasma Samples of Patients with Ovarian Cancer. *Appl. Sci.* 11 (4), 1-10, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/app11041735>
IF: 2.474 (2019)
2. **Márton, É.**, Varga, A., Széles, L., Göczi, L., Penyige, A., Nagy, B., Szilágyi, M.: The Cell-Free Expression of MiR200 Family Members Correlates with Estrogen Sensitivity in Human Epithelial Ovarian Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (24), 1-19, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21249725>
IF: 4.556 (2019)
3. **Márton, É.**, Lukács, J., Penyige, A., Janka, E. A., Hegedűs, L., Soltész, B., Méhes, G., Póka, R., Nagy, B., Szilágyi, M.: Circulating epithelial-mesenchymal transition-associated miRNAs are promising biomarkers in ovarian cancer. *J. Biotechnol.* 297, 58-65, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.003>
IF: 3.503

További közlemények

4. Szilágyi, M., Pös, O., **Márton, É.**, Buglyó, G., Soltész, B., Keserű, J., Penyige, A., Szemes, T., Nagy, B.: Circulating cell-free nucleic acids: main characteristics and clinical application. *Int. J. Mol. Sci.* 21 (18), 1-20, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21186827>
IF: 4.556 (2019)





5. Penyige, A., **Márton, É.**, Soltész, B., Szilágyi, M., Póka, R., Lukács, J., Széles, L., Nagy, B.:
Circulating miRNA Profiling in Plasma Samples of Ovarian Cancer Patients.
Int. J. Mol. Sci. 20 (18), E4533, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/jms20184533>
IF: 4.556
6. Keserű, J., Soltész, B., Lukács, J., **Márton, É.**, Szilágyi, M., Penyige, A., Póka, R., Nagy, B.:
Detection of cell-free, exosomal and whole blood mitochondrial DNA copy number in plasma
or whole blood of patients with serous epithelial ovarian cancer.
J. Biotechnol. 298, 76-81, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.015>
IF: 3.503
7. Soltész, B., Lukács, J., Szilágyi, E., **Márton, É.**, Szilágyi, M., Penyige, A., Póka, R., Nagy, B.:
Expression of CD24 in plasma, exosome and ovarian tissue samples of serous ovarian
cancer patients.
J. Biotechnol. 298, 16-20, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.018>
IF: 3.503
8. Soltész, B., Lukács, J., **Márton, É.**, Szilágyi, M., Penyige, A., Póka, R., Nagy, B.: A CD24 mRNS-
expresszió meghatározása kvantitatív valósídejű PCR-módszerrel alacsonyán differenciált
szerózus papilláris petefészekrákos szöveti mintákból.
Magyar Nőorv. L. 81 (5), 254-258, 2018.
9. Szilágyi, M., **Márton, É.**, Lukács, D., Hádáné Birkó, Z., Kele, Z., Biró, S.: Mutation in afsR Leads to
A-Factor Deficiency in *Streptomyces griseus* B2682.
J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 28 (5), 216-224, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000495410>
IF: 1.457

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,108

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,533**

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, 2021.05.18.

