

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Beke-Varga Alexandra Edit

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

DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2024

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

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

Beke-Varga Alexandra Edit

Témavezető: Szilágyi-Bónizs Melinda



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2024

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	
2. Bevezetés.....	1
3. Irodalmi áttekintés	2
3.1. Ösztrogének	2
3.1.1. <i>Az ösztrogének termelődése és fiziológiai jelentősége</i>	2
3.1.2. <i>Az ösztrogének hatásmechanizmusa, ösztrogén receptorok, ösztrogén jelátvitel</i>	6
3.2. Xenoösztrogének.....	11
3.2.1. <i>Bisfenol A</i>	11
3.2.2. <i>Zearalenon</i>	14
3.3. MiRNS-ek.....	16
3.3.1. <i>A miRNS-ek biogenezeise és funkciója</i>	16
3.3.2. <i>A miRNS-ek szerepe a tumorok kialakulásában</i>	19
3.3.3. <i>MiRNS-ek alkalmazása a klinikai gyakorlatban: biomarkerek és terápiás eszközök</i>	22
3.4. Petefészekrák	27
3.4.1. <i>A petefészekrák előfordulása, hajlamosító tényezők</i>	27
3.4.2. <i>A petefészekrák szövettani besorolása</i>	30
3.4.3. <i>A petefészekrák diagnosztikája és kezelése</i>	33
4. Célkitűzések	37
5. Anyag és módszer	38
5.1. Sejtenyésztés	38
5.2. Életképesség vizsgálata	39
5.3. Apoptózis vizsgálata	39
5.4. Sejtlízis vizsgálata.....	39
5.5. mRNS izolálás és kvantifikáció	40
5.6. miRNS izolálás és kvantifikáció	43
5.7. Transzfektálás miRNS mimikkel	45
5.8. Transzkriptomikai analízis RNS szekvenálással	46
5.9. Bioinformatikai analízis.....	46
5.10. Statisztikai elemzések.....	47
6. Eredmények	48
6.1. Fiziológiailag releváns dózisu E2, ZEA és BPA kezelések által kiváltott transzkriptomikai változások összehasonlítása	48
6.1.1. <i>Az E2, ZEA és BPA által kiváltott, mRNS expresszióban megmutatkozó változások</i>	48

6.1.2. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására indukálódott és represszáldott gének funkcionális géndúsulási analízise	51
6.1.3. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására megváltozott expressziót mutató miRNS-ek vizsgálata.....	57
6.1.4. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására megváltozott expressziójú miRNS-ek funkcionális analízise	60
6.2. Magas dózisu ösztrogén kezelések ovárium sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata ..	63
6.2.1. A nagy dózisu ösztrogén kezelés patofiziológiai jellemzőkre gyakorolt hatásának vizsgálata.....	63
6.2.2. A nagy dózisu ösztrogén kezelés génextpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata.....	67
6.2.3. Az ER α -mediált ösztrogén válasz jelentőségének vizsgálata a nagy dózisu ösztrogén kezelésre mutatott tolerancia meghatározásában.....	70
6.3. A miR-30 család jelentőségének vizsgálata az ovárium sejtek ösztrogén válaszában ...	71
6.3.1. A miR-30 család expressziójának analízise	71
6.3.2. A miR-30 család bioinformatikai analízise.....	73
6.3.3. A miR-30d-5p funkcionális vizsgálata a PEO1 és A2780 sejtvonalakban	77
6.3.4. A miR-30d-5p mimikkel való transzfektálás hatásának vizsgálata a nagy dózisu E2-vel szemben mutatott tolerancia alakulásában a PEO1 sejtvonalban	79
6.3.5. A miR-30d-5p mimikkel való transzfektálás hatásának vizsgálata a tamoxifénnel szemben mutatott érzékenység alakulására a PEO1 sejtvonalban	83
7. Diskusszió	85
7.1. Fiziológiailag releváns dózisu xenoösztrogén kezelések mRNS és miRNS expresszióra gyakorolt hatásának összehasonlítása az E2 által kiváltott hatásokkal	85
7.1.1. A mRNS expresszióban megfigyelhető változások	85
7.1.2. A mRNS expresszióban megfigyelhető változások alapján érintett biológiai folyamatok.....	86
7.1.3. Az azonosított gének expressziójának monitorozásában rejlő diagnosztikai lehetőségek	88
7.1.4. A miRNS expresszióban megfigyelhető változások és az érintett útvonalak	91
7.2. Magas dózisu xenoösztrogén és E2 kezelések ovárium sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata	92
7.2.1. Nagy dózisu E2 ovárium sejtekre gyakorolt hatása	92
7.2.2. Nagy dózisu xenoösztrogén kezelések ovárium sejtekre gyakorolt hatása.....	95
7.3. A miR-30 család jelentőségének vizsgálata az ovárium sejtek ösztrogén válaszában ...	96
7.3.1. A miR-30 molekulák expressziójának analízise.....	96
7.3.2. A miR-30d-5p transzfektálásának hatása	97
7.4. Eredményeink feltételezett klinikai alkalmazhatósága.....	98
8. Összefoglalás	100

9. Summary	101
10. Irodalomjegyzék.....	102
11. Tárgyszavak.....	116
12. Key words.....	117
13. Köszönetnyilvánítás.....	118
14. Saját közlemények jegyzéke	119

1. Rövidítések jegyzéke

AGO	argonauta fehérje
Akt	protein-kináz B
BPA	biszfenol A
cDNS	komplementer DNS
Ct	ciklusszám
DCC	dextránnal kezelt szén (dextran coated charcoal)
DNS	dezoxiribonukleinsav
E2	ösztadiol
EMT	epiteliális-mesenhymalis átalakulás
ERE	ösztrogén válaszadó elem
ER	ösztrogén receptor
FBS	magzati szarvasmarha szérum
FC	fold change
FDA	Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (U.S Food and Drug Administration)
GPER1	G-proteinhez kapcsolt receptor
HGSC	magas grádusú szerózus karcinóma
HRR	homológ rekombinációs repair
HRT	hormonpótló terápia
LBD	ligand- kötő domén
LDH	laktát dehidrogenáz
LGSC	alacsony grádusú szerózus karcinóma
MAPK	mitogén aktiválta protein kináz
miRNS	mikroRNS
MPP	methyl-piperidino-pyrazole
MRE	miRNS válaszadó elem
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- Diphenyltetrazolium Bromide
PARP	poli ADP-ribóz polimeráz
PBS	foszfáttal puffereelt sóoldat

PI3K	foszfatidil inozitol-3 kináz
PRF-RPMI1640	fenol red mentes-RPMI1640
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
RISC	RNS indukálta csendesítő komplex
ROMA	Risk of malignancy Algorithm
ROS	reaktív oxigén gyök
RT	szobahőmérséklet
UPR	endoplazmatikus retikulum stressz (unfolded protein response)
ZEA	zearalenon

2. Bevezetés

Az endogén ösztrogének olyan szteránvázas hormonok, amelyek kiemelkedő szerepet töltenek be a női reprodukív ciklus szabályozása mellett számos egyéb szervrendszer működésében. Ezzel magyarázható, hogy posztmenopauzában – amikor az ösztrogén szint jelentősen lecsökken – számos, időskori megbetegedés (pl. szívinfarktus, memóriazavar) megjelenése jellemző a nők körében. Ezek kockázata csökkenthető hormonpótló terápia (HRT) alkalmazásával, mely azonban növeli egyes ráktípusok, tk. a petefészekrák kialakulásának a kockázatát (Langer és mtsai, 2021; La Vecchia, 2017). Ugyancsak nagy egészségügyi kockázatot jelent a xenoösztrogéneknek való nagyfokú kitettség. Ezek olyan molekulák, amelyek képesek az endogén ösztrogének hatását utánozni, ezáltal a hormonrendszer működésének megzavarásán keresztül pl. korai pubertást, vagy reprodukív zavarokat okozni, de növelik számos ráktípus kialakulásának a kockázatát is (La Merrill és mtsai, 2020). Megkülönböztetünk természetes és mesterséges eredetű xenoösztrogéneket. Előbbiekhez tartozik a zearalenon (ZEA), amely a *Fusarium* fonalas gombák által termelt mikotoxin. Ezen gombák szántóföldi, ill. raktári kártevőkként gyakran fertőzik a gabonaféléket (pl. kukorica, zab, búza, rizs), így a ZEA jelen lehet a feldolgozott élelmiszerekben (Paterni és mtsai, 2017). A szintetikus xenoösztrogének közé sorolható a biszfenol A (BPA), amely a polikarbonát műanyagok és epoxi gyanták előállításánál alkalmazott adalékanyag. A műanyag termékekből kiszivároghat nemcsak az élelmiszerekben, de a környezetben is képes felhalmozódni (Urli és mtsai, 2023).

Az ösztrogének, ill. xenoösztrogének jelentette egészségügyi kockázat egyre nagyobb problémát képvisel. A várható életkor növekedésével ugyanis a nők egyre több időt töltenek posztmenopauzában, így egyre többen szorulhatnak HRT terápiára. További aggodalomra ad okot, hogy a környezet xenoösztrogén terheltsége is folyamatosan emelkedik. A klímaváltozás ugyanis kedvez a növényi kártevő fonalas gombák növekedésének és mikotoxin termelésének (Liew és Mohd-Redzwan, 2018). A környezetünkben előforduló műanyag hulladék mennyisége ugyancsak emelkedik, évente mintegy 22 megatonna mennyiségben, melyből a kioldódó vegyületek nemcsak a talajvizet, de szálló por formájában a levegőt is szennyezik (Landrigan és mtsai, 2023). Mindezek ellenére rendkívül hiányos a szakirodalom az ösztrogének, különösen a xenoösztrogének tumorok kialakulására, ill. terjedésére gyakorolt hatását illetően. Ezért munkánk során célul tűztük ki a ZEA és BPA molekulák hatásának összehasonlítását az endogén ösztradiol (E2) által kifejtett hatásokkal humán ovárium sejtenyészetekben.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Ösztrogének

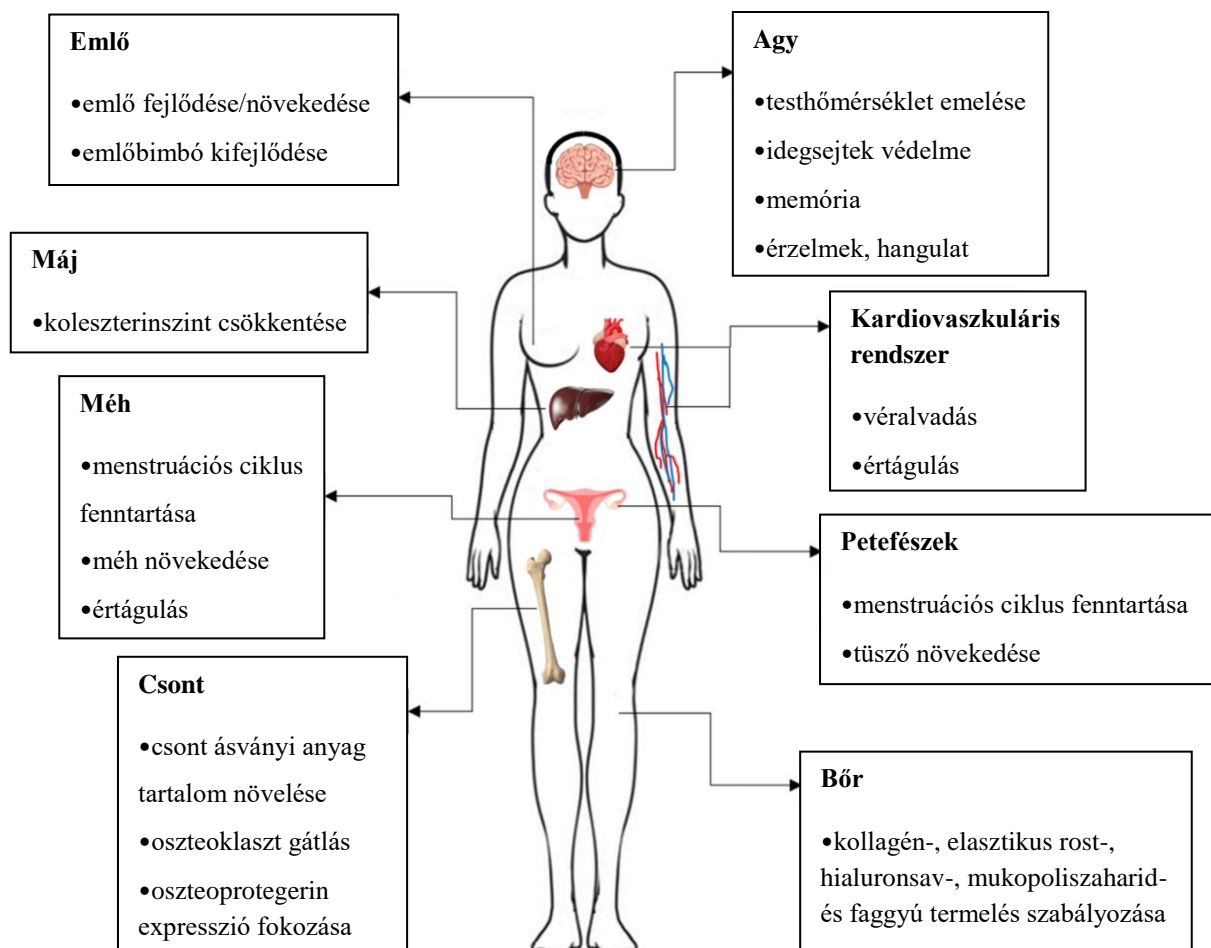
3.1.1. Az ösztrogének termelődése és fiziológiai jelentősége

Az endogén ösztrogének csoportjába négy molekula sorolható: az ösztron (E1), az ösztradiol (E2), az ösztriol (E3) és az ösztetrol (E4) (Fuentes és Silveyra, 2019). Ezek közül az E2 rendelkezik fiziológiai értelemben a legnagyobb jelentőséggel. Az E3 és E4 megnövekedett koncentrációja terhesség alatt mérhető, míg menopauza idején az E1 dominál (Fuentes és Silveyra, 2019). Az E2 elsődleges termelődési helyei a petefészkek granulóza sejtjei, valamint a sárgatest. Az E4 kizárólagos termelődési helye a magzati máj, ahonnan a placentán át jut az anyai vérkeringésbe. Az E1 szintézise az extragonadális szervekben (pl. a zsírszövetben) történik (Fuentes és Silveyra, 2019).

Az ösztrogének szintézisében az alacsony denzitású lipoprotein (LDL) a kiindulási molekula. A szteroidogenezis első lépésében a koleszterol transzlokálódik a mitokondrium belső membránjára a STARD1 (szteroidogén akut regulátor protein) nevű inga fehérje segítségével, ami a szteroid hormon szintézis sebesség meghatározó lépése. Itt megtörténik a koleszterol pregnenolonná való átalakulása a koleszterin oldallánc eltávolító P450_{scc} enzim segítségével. A pregnenolon ezután a CYP17A1 (szteroid 17- α -hidroxiláz/17,20-liáz) és a 3 β -HSD (3 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz/ Δ^{5-4} izomeráz) enzimek katalizálta reakciókban DHEA-ná (dehidro-epiandroszteron) alakul, amit a 3 β -HSD enzim androszténdionná alakít tovább. Az androszténdiont a CYP19A1, vagy más néven aromatáz enzim, E1-ná alakítja. Az E1 ezután a 17 β -HSD (17 β -hidroxiszteroid dehidrogenáz) által katalizált reakcióban E2-vé alakul (Fuentes és Silveyra, 2019).

A petefészkek granulóza sejtjeinek ösztrogén termelése a hipotalamusz-agyalapimirigy-petefészkek (HPO) tengelyen keresztül szabályozódik. A hipotalamusz gonadotropin-felszabadító hormon (GnRH) felszabadulására az agyalpi mirigy elülső lebenye luteinizáló - (LH) és follikuláris stimuláló hormon (FSH) termeléssel válaszol (Liang és Shang, 2013). Az LH az androgéntermelés stimulálásáért, az FSH, pedig az aromatizációért felelős, ami az ösztrogén szintézis, végső, sebesség meghatározó lépése (Liang és Shang, 2013). Az ösztrogén szint a menstruációs ciklus során széles koncentrációtartományban, 0,11 nM és 2,2 nM között ingadozik (Vrtačnik és mtsai, 2014). A menopauza beállta után a keringő ösztrogén mennyisége nagymértékben lecsökken, 0,04 nM körüli értékre, egyúttal az ösztrogén termelését a perifériás szövetek veszik át (pl. zsírszövet) (Liang és Shang, 2013; Vrtačnik és mtsai, 2014).

Az ösztrogének elsődleges szerepe a női reproduktív rendszer szabályozása, valamint a másodlagos nemi jellegek kialakítása a nők esetében (Fuentes és Silveyra, 2019). Emellett számos egyéb jelentőséggel is rendelkeznek. Többek között hatást gyakorolnak az agy, a szív, az érrendszer, a csontok, a vázizomzat, az emlők és a zsírszövet normál működésére (Santen és Simpson, 2019) (1. ábra). Ez alapján nem meglepő, hogy az ösztrogén metabolizmus zavara miatt fellépő alacsony, vagy magas ösztrogén szint számos megbetegedés hátterében állhat (Faltas és mtsai, 2020). A szervezet csökkent ösztrogén termelését okozhatják fiziológiás folyamatok, mint a menopauza, vagy egyéb hormontermelést gátló vegyületek hatása. Bizonyos antidepresszánsok, vérnyomáscsökkentő szerek, véralvadásgátlók, immunszuppresszánsok, aromataz inhibitorok, valamint maguk a külső forrásból bevitt ösztrogének is képesek visszaszorítani az ösztrogének termelését (Patel és mtsai, 2018).



1. ábra. Az ösztrogének hatása a különböző szervrendszerek működésére a nők esetében (Farkas és mtsai, 2022).

Az ösztrogének kiemelkedő szerepét jelzi az idegrendszer normál működésében, hogy az agy képes ösztrogén szintézisére az androgének aromatizációjával, ill. az agy nagy

mennyiségben expresszáll ösztrogén receptorokat (ER) (1. ábra). Korrelációt mutattak ki a nők szorongásos tünetei és kedély ingadozásai, valamint a ciklusosan változó E2 koncentráció között (Nicholson és mtsai, 2020). Emellett a menopauza beálltával felszaporodnak a nőket érintő neurológiai betegségek, mint pl. az Alzheimer betegség (AD). Az AD kialakulásának az oka a tau fehérjék hiperfoszforillációját követő β -amiloid plakk lerakódások megjelenése a hippokampuszban. *In vitro* végzett tanulmányok szerint az E2 képes elősegíteni az amiloid plakkok degradációját, valamint szolubilis formába történő átalakulását metalloproteinázok, és neprilisin enzimek aktiválásával (Russell és mtsai, 2019). Emellett az E2 adagolása csökkentette a tau fehérjék hiperfoszforilálását, ami végső soron a betegség súlyosságának csökkenését eredményezte (Russell és mtsai, 2019). Ezen kívül a Parkinson kór és a skizofrénia is az ösztrogén szint csökkenéssel gyakrabban megjelenő megbetegedések. A posztmenopauza idején jellemző továbbá a hőháztartás felborulása miatti hőhullámok jelentkezése, valamint az alvás zavarok (Faltas és mtsai, 2020; Patel és mtsai, 2018).

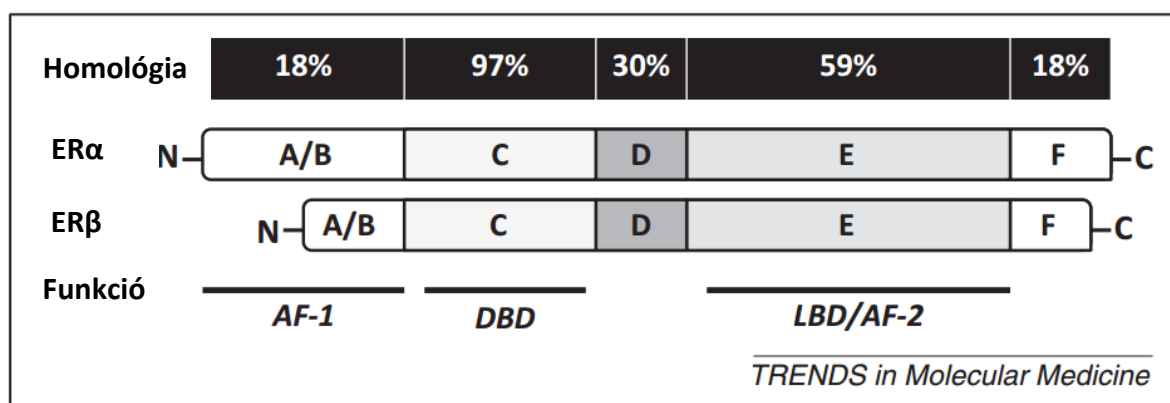
Szintén az ösztrogén szint csökkenésével magyarázható továbbá, hogy a posztmenopauzában lévő nők körében nagyobb gyakorisággal fordulnak elő olyan a szív-, és érrendszert érintő betegségek, mint a magas vérnyomás, érlemeszesedés, myocardialis eltérések, kamrai hipertrófia/szívizom megnagyobbodás, szívinfarktus, valamint szív vérellátási zavarok (Xiang és mtsai, 2021). A szervezet ösztrogén szintjének csökkenésével egyidejűleg ugyanis a NADPH (nikotinamid dinukleotid foszfát) és egyéb antioxidáns képességű molekulák koncentrációja is lecsökken. Ezen folyamatok végső soron reaktív oxigén gyök (ROS) felhalmozódáshoz és sejthalálhoz vezetnek, amelyek pedig kedveznek a különböző kardiovaszkuláris rendellenességek kialakulásának (Xiang és mtsai, 2021). Ezen felül premenopauzában a magas plazma koncentrációt mutató nitrogén-monoxid (NO) ROS-al szembeni szív- és simaizom védő hatása sem érvényesül. Emellett a csökkent ösztrogén koncentrációval megemelkedik a vér szabad zsírsav koncentrációja, ami szintén emeli a kardiovaszkuláris rendellenességek előfordulásának kockázatát (Faltas és mtsai, 2020; Xiang és mtsai, 2021). Az ösztrogének képesek továbbá visszaszorítani az érlemeszesedéssel járó megbetegedések előfordulását azáltal, hogy csökkentik a gyulladásért felelős kemokinek, valamint a sejtadhéziós molekulák koncentrációját. Ezenkívül stabilizálják az ateroszklerotikus plakkokat a mátrix metalloproteináz expresszió gátlásával és a PAI-1 (plazminogén aktivátor inhibitor-1) termelésének indukálásával. Mindemellett a magas ösztrogén szint támogatja az erek dilatációját, a prosztaciklin termelés, a kalcium csatorna blokkolás, valamint az érösszehúzó hatású endothelin szintézis gátlásával (Xiang és mtsai, 2021) (1. ábra).

A posztmenopauzában gyakrabban figyelhetőek meg továbbá a csontrendszert érintő zavarok is, mint az osteoporosis, az ízületi fájdalom és merevség, valamint a funkcióvesztés (Patel és mtsai, 2018). Az ER-ok nagy mennyiségben expresszálódnak az oszteoblasztok (csontállomány építői), oszteoklasztok (csontállomány lebontói) és az oszteociták (csontsejtek) sejtfelszínén. Az E2 közvetlenül segíti az oszteoblasztok működését a TGF β (transzformáló növekedési faktor β)- és a Wnt/ β -katenin szignál útvonalak fokozásával. Ezenkívül az E2 stimulálja az IGF1 (inzulinszerű növekedési faktor) expresszióját is, ami szintén a csontképződésnek kedvez (Cheng és mtsai, 2022). Az oszteoklasztok differenciációja és aktivitása az NF- $\kappa\beta$ (nukleáris faktor- $\kappa\beta$) útvonalon a receptor RANKL (nukleáris faktor- $\kappa\beta$ ligand) ligandján keresztül fokozódik, míg az OPG (oszteoprotegerin) kötődését követően gátlódik. Az E2 a RANKL és az OPG expresszióját is szabályozza, míg az elsőt gátolja, addig az utóbbit fokozza (Cheng és mtsai, 2022) (1. ábra).

A posztmenopauzában, a csökkent ösztrogén szinthez köthető betegségek megelőzésére és kezelésére megoldást jelent a HRT. A HRT azonban csak a 60 évesnél fiatalabb, kevesebb, mint 10 éve posztmenopauzában lévő nőknél alkalmazható biztonságosan (Flores és mtsai, 2021). Ennek oka, hogy ezen kezelések nem teljesen veszélytelenek, ugyanis hozzájárulhat az stroke és a mélyvénás trombózis kialakulásához (Flores és mtsai, 2021; Kohn és mtsai, 2019; Langer és mtsai, 2021). Emellett számolni kell bizonyos hormonfüggő daganatok pl. mellrák, endometrium rák kialakulásának emelkedett esélyével, valamint szerepe lehet a petefészek-, prosztata-, tüdő- és vastagbél daganatok kialakulásában is (Liang és Shang, 2013). Az ösztrogének tumorkeltő hatása mitogén képességükkel hozható összefüggésbe. Az ösztrogének szabályozzák a G1-S átmenetet, a c-Myc és ciklin D1 molekulák expressziójának fokozásán keresztül. Az ösztrogén ezenkívül képes az apoptózis gátlására az anti-apoptotikus Bcl-2 és Bcl-X_L molekulák képződésének indukálásával. Ezenfelül az ösztrogén-ER α komplex az c-Src-ral kapcsoltságba lépve együtt aktiválja a MAPK (mitogén aktivált protein kináz) és PI3K/Akt (foszfatidil inozitol-3 kináz/protein kináz B) útvonalakat, amelyek a sejtek túlélését segítik elő. A tumorok gyors ütemű növekedéséhez szükséges megnövekedett vér- és tápanyagellátást az angiogenezis biztosítja, amelyet szintén segíthetnek az ösztrogének az IL-8 (interleukin 8) és VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor) szekrécióján keresztül. Az ösztrogén jelátvitel képes gátolni továbbá az NF- κB szintézisét, ami represszálja az E-kadherin expresszióját, így a tumorsejtek migrációs és inváziós képességéhez is nagyban hozzájárul (Liang és Shang, 2013).

3.1.2. Az ösztrogének hatásmechanizmusa, ösztrogén receptorok, ösztrogén jelátvitel

Az ösztrogén molekulák a biológiai hatásukat elsősorban a nukleáris ER-okhoz való kötődésükön keresztül képesek kifejteni. Kétféle ER-t különböztetünk meg, az ER α -t és az ER β -t (Cui és mtsai, 2013; Saczko és mtsai, 2017). Az ER α egy 595 aminosavból álló 66 kDa tömegű fehérje, amit a 6-os kromoszóma 6q25.1 lókusznál elhelyezkedő *ESR1* gén kódol. Az ER-ok másik formája, az ER β , melyet 530 aminosav alkot, 59 kDa tömegű és rövidebb N-terminális véggel rendelkezik, mint az ER α . Az ER β -t a 14-es kromoszóma 14q23-24 lókusznál található *ESR2* gén kódolja (Fuentes és Silveyra, 2019; Vrtačnik és mtsai, 2014) (2. ábra). Az ER α és az ER β is több funkcionális és strukturális doménra osztható (Fuentes és Silveyra, 2019). Az 5 fő domén a következő: a transzkripció aktiváló régió-1 (AF-1), a DNS-kötő domén, a ligand- kötő domén (LBD), a hinge régió és a transzkripció aktiváló régió 2 (AF-2). Minden domén meghatározott funkcióval rendelkezik (Xiang és mtsai, 2021) (2. ábra). Az A/B régió tartalmazza a cink-ujj motívumot, ami a target szekvenciához való kötődést segíti, ezáltal végső soron elindítja az adott gén transzkripcióját. A DBD (DNS-kötő domén) hozzájárul az ER dimerizációjához, majd a specifikus kromatin szekvenciához való kötődéshez. Ezeket a repetitív szekvenciákat nevezzük az ösztrogén válaszadó elemeknek (ERE) is. A D domén, vagy hinge régió célja a C és az E régiók összekötése, ezenkívül képes chaperon fehérjék megkötésére is. A D régió tartalmazza ezenkívül a nukleáris transzlokációs szignált, ami lehetővé teszi a receptor-ligand komplex sejtmagba való transzlokációját (Xiang és mtsai, 2021) (2. ábra).



2. ábra. Az ER α és ER β szerkezetének sematikus ábrázolása. Mindkét receptor 5 funkcionális doménból áll: az N-terminálison az A/B domén a fehérje-fehérje interakciók kialakításáért és a transzkripció aktiválásáért felel a célgének esetében. A C domén a DBD. A D domén hordozza a nukleáris transzlokációs szignált. A C terminálison elhelyezkedő E és F domén foglalja magában az LBD-t és az AF-2, ligand-függő aktivációs egységet (Cui és mtsai, 2013).

Az E és az F régiók tartalmazzák az LBD-t, ami az ösztrogén molekula kötőhelyeként szolgál, valamint a koaktiváló és korepresszor molekulák kötőhelyeit. Továbbá két ösztrogén receptor transzkripciós aktivátor domén, az AF1 és AF2 is helyet foglal az NTD (amino-terminális domén) és az LBD doméneken. Az ER-ok általi transzkripció szabályozáshoz szükséges az AF1 és az AF2 domének együttes hatása, azonban az AF2-vel ellentétben, az AF1 aktiválódásához nem szükséges hormon vagy szteroid molekula kötődése (Fuentes és Silveyra, 2019) (2. ábra).

Érdeemes megemlíteni, hogy az ER α -nak léteznek rövidebb (36 és 46 kDa) izoformái is az alternatív start kodonoknak és az alternatív splicing-nak köszönhetően. Ezek közül számos izoforma nem rendelkezik NTD és/vagy AF1 doménnel, így nem képesek a transzkripció aktiválására. Ezzel szemben képesek heterodimer kialakítására a teljes hosszúságú ER α -val, ezáltal pedig gátolni az AF1 és AF2 domének transzkripciós aktiváló képességét (Fuentes és Silveyra, 2019) (2. ábra). Az ER β -nak öt izoformája ismert, amelyek között a fő különbség az LBD szekvencia hosszában van. Bár az ER β izoformák nem rendelkeznek transzkripció aktiváló képességgel, ezek is képesek az ER α -val dimert képezni és így gátolni azok hatását (Fuentes és Silveyra, 2019; Vrtačnik és mtsai, 2014) (2. ábra).

Az ER α és az ER β eltérő expressziót mutatnak a különböző sejttípusokon (Cui és mtsai, 2013; Russell és mtsai, 2019). Nagy mennyiségű ER α expresszió figyelhető meg nőknél a méhben, az emlőkben és a petefészkekben, férfiaknál a mellékherékben, a herékben és a prosztatában. Ezen kívül nemtől függetlenül a fehér zsírszövetben, a csontrendszerben, az agyalapi mirigyben, a vesékben és mellékvesékben, valamint alacsonyabb mennyiségben a központi idegrendszeren belül a talamuszban és a hipotalamuszban (Russell és mtsai, 2019; Vrtačnik és mtsai, 2014). Ezzel szemben az ER β legnagyobb mennyiségben nőknél a petefészkekben, míg férfiaknál a prosztatában detektálható. Alacsonyabb ER β expressziós szintek mérhetőek a férfiak heréiben és a nők méhében, a húgyhólyagban és a tüdőben. Valamint egészen alacsony szinten expresszálódik még ER β az agyalapi mirigyben, a csecsemőmirigyben, az agyban, a gerincvelőben és a férfiak mellékheréjében (Russell és mtsai, 2019).

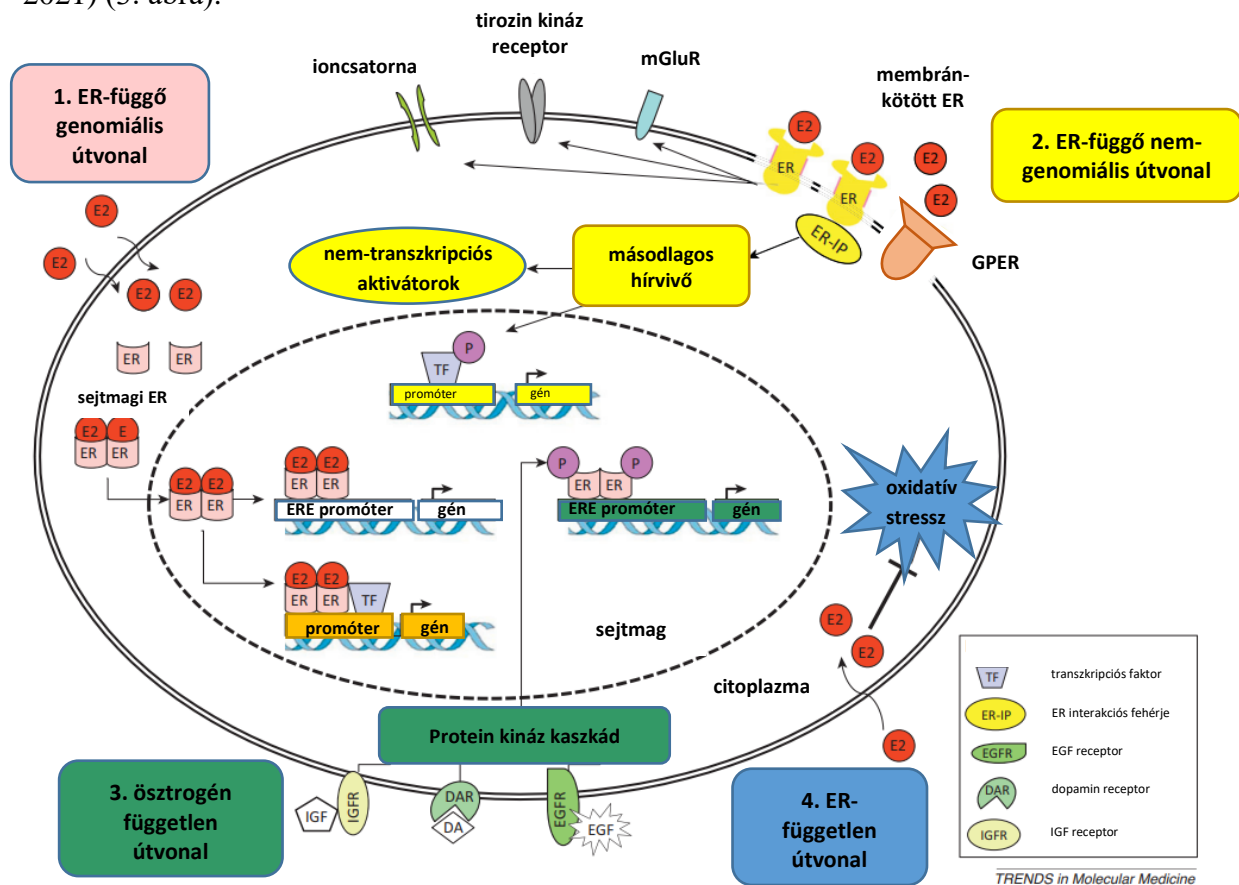
A GPER1 (vagy GPER, GPR30) egy sejtmembránba integrált G-proteinhez kapcsolt receptor, ami 7 transzmembrán α -helikális régióból, 4 extracelluláris szegmensből és 4 citoszólikus szegmensből áll. A GPER1-et kódoló gén a 7-es kromoszóma 7p22.3 lókuszában található és 375 aminosav építi fel. A GPER1 nem mutat strukturális hasonlóságot sem az ER α -val sem az ER β -val, valamint az ösztrogén molekulákhoz való affinitása is jóval kisebb (Cui és mtsai, 2013; Fuentes és Silveyra, 2019). Azonban a GPER fontos szerepet tölt be olyan

intracelluláris kaszkád útvonalak aktiválásában, mint pl. a receptor $G\alpha$ alegységhez köthető cAMP (ciklikus AMP) és kalcium felszabadulás, valamint $G\beta\gamma$ alegységek által transzaktivált EGRF (epidermális növekedési faktor receptor) regulálta PI3K vagy MAPK szignál útvonalak (Tirado-Garibay és mtsai, 2023). A GPER1 receptor megtalálható a központi- és a perifériás idegrendszerben, a méhben, a petefészkekben, emlőkben, a herékben, a gasztrointesztinális rendszerben, a hasnyálmirigyben, vesékben, májban, a mellékvesében, az agyalapi mirigyben, a csontszövetben, a kardiovaszkuláris rendszerben és az immunsejtek felszínén is (Vrtačnik és mtsai, 2014).

Az ösztrogén jelátvitel megvalósulhat ER-függő genomiális- és nem genomiális, ER-független, valamint ösztrogén-független útvonalakon keresztül is (3. ábra) (Fuentes és Silveyra, 2019). Az E2 genomi jelátviteli útvonal kezdő lépéseként az ösztrogén hozzákötődik a célsejtek citoplazmájában lévő ER α -hoz vagy ER β -hoz. A kötődést követően az ER-okról disszociál a HSP90 (hősokk fehérje), ami ezidáig a receptor inhibitoraként funkcionált. Ezután megtörténik a receptorok foszforilációja és homo- (ER α /ER α ; ER β /ER β) vagy heterodimerizációja (ER α /ER β). Ezután az ER/E2 komplex a sejtmagba transzlokálódik, ahol direkt vagy indirekt módon képes befolyásolni a célgének transzkripcióját (Faltas és mtsai, 2020; Vrtačnik és mtsai, 2014). Az ER/E2 komplex egyrészt direkt módon képes hozzákötődni a target gén promóterében vagy annak közelében elhelyezkedő ERE-hez. Másrészt ez a kötődés indirekt módon, transzkripciós faktorok (Sp-1), NF- κ B, ATF-2, c-jun, nukleáris transzkripciós faktor-Y közreműködésével is megvalósulhat (Fuentes és Silveyra, 2019). A humán gének kb. egy harmadának promóterében vagy regulátor régiójában megtalálható az ERE motívum. Így nem meglepő, hogy számos folyamat szabályozásában van központi szerepe a genomiális ösztrogén jelátviteli útvonalnak. Befolyásolja tk. az autofágia, a proliferáció, az apoptózis, a túlélés, a differenciáció és az értágulás folyamatában részt vevő gének transzkripcióját (Faltas és mtsai, 2020; Fuentes és Silveyra, 2019; Vrtačnik és mtsai, 2014) (3. ábra).

A nem-genomiális jelátviteli útvonal az E2, a sejtmembránhoz kötött GPER, az ER α 36, az ER α 46 splice variáns és az ER β (1-5 izoforma) receptorhoz való bekötődésével aktiválódik (Faltas és mtsai, 2020; Fuentes és Silveyra, 2019; Thiebaut és mtsai, 2021). A ligand GPER-hez való kötődését követően másodlagos hírvivő molekulák (kalcium, cAMP) felszabadulása zajlik le, ami a protein kináz kaszkád útvonalak aktiválásához vezet (Fuentes és Silveyra, 2019; Vrtačnik és mtsai, 2014). Indukálódnak tk. a cAMP/PKA (protein kináz A) -, a Ras/Raf/MAPK -, a PLC/PKC (foszfolipáz C/protein kináz C) vagy a PIK3/Akt- útvonalak (Fuentes és Silveyra, 2019). Ezen protein kináz útvonalak transzkripciós faktorok [CREB (cAMP válaszadó elem kötő fehérje), NF- κ B, STAT (szignál transzducer és transzkripciós

aktivátor)] foszforilálásával képesek befolyásolni a génexpressziót. A membránhoz kötött ER α 36, ER α 46 és ER β izoformák ezen kívül képesek interakcióba lépni más, membránhoz kötött receptorokkal, mint pl. a tirozin kináz-, az IGFR (inzulinszerű növekedési faktor receptor), vagy az EGFR (epidermális növekedési faktor) receptorokkal (Fuentes és Silveyra, 2019). A nem-genomiális jelátviteli szabályozás alá számos és rendkívül változatos molekuláris mechanizmus tartozik, mint pl. az apoptózis, az angiogenezis, a migráció, a DNS javító mechanizmusok, ill. a sejtek túlélése és proliferációs készsége (Ranganathan és mtsai, 2019; Thiebaut és mtsai, 2021) (3. ábra).



3. ábra. Genomiális és nem-genomiális ösztrogén jelátviteli útvonalak. 1) Direkt genomiális jelátvitel esetében az ösztrogén az ER-hoz kötődik. A dimerizálódott komplex transzlokálódik a sejtmagba, ahol az ösztrogén-válaszadó gének transzkripcióját szabályozza. 2) Indirekt genomiális jelátvitel: a membránhoz kötött receptorok által aktiválódó jelátviteli útvonalak másodlagos hírvívő molekulák közvetítésével végső soron transzkripció faktorok működésére hatnak. 3) Ösztrogén független jelátviteli útvonal: az ER-ok ösztrogén jelenléte nélküli aktiválódásán keresztül hat. 4) ER-független jelátvitel: az ösztrogének, ER-tól függetlenül érvényesülő antioxidáns hatása. (Cui és mtsai, 2013).

Meg kell jegyezni azonban, hogy az ER-függő genomiális és nem genomiális jelátviteli útvonalak nem tekinthetők teljes egészében független útvonalaknak (Fuentes és Silveyra, 2019). Ugyanis ahhoz, hogy a genomiális útvonalon dimerizálódott és a sejtmagba transzlokált

receptor-ligand komplex indirekt módon az ERE szekvenciákhoz tudjon kötődni, szükségesek a nem-genomiális útvonalon aktivált protein kináz kaszkád útvonalakon foszforilált transzkripciós faktorok. Így végső soron a két útvonal egy ponton összekapcsolódik (Fuentes és Silveyra, 2019) (3. ábra).

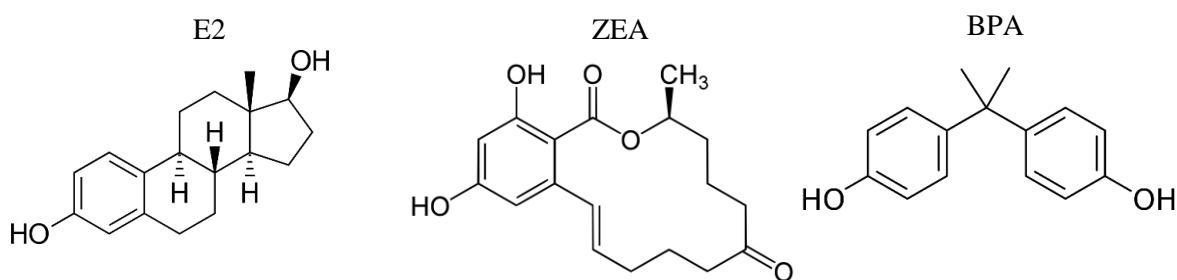
A genomiális- és a nem- genomiális útvonalakon kívül az ER-ok képesek ösztrogének jelenléte nélkül is aktiválódni a ligand független jelátviteli útvonalon keresztül. Az ER-ok aktiválódása létrejöhet extra- vagy intracelluláris stimulusok hatására egyaránt. Ez leggyakrabban a receptor szerin vagy tirozin oldalláncainak foszforilálásán, valamint az SRC-1 (szteroid receptor koaktivátor 1) kötődése során valósul meg (Bennesch és Picard, 2015). Számos olyan faktor ismeretes, ami képes kiváltani az ER-ok ligand független aktiválódását. Ilyen tk. az EGF (epidermális növekedési faktor), az IGF-1, a dopamin neurotranszmitter, az interleukin-6, a TNF α (tumor nekrozis faktor α), az ATP (adenozin trifoszfát), a kalcium, a PI3K, a PKA és az Akt fehérjék is (Bennesch és Picard, 2015). Az ezen faktorok által foszforilált ER α és/vagy ER β receptorok ezután képesek ligand bekötődése nélkül is dimerizálódni az AF-1 doménjükön keresztül (lásd 2. ábra). Ezután a receptor a sejtmagba bejutva az ERE motívumot hordozó DNS szekvenciához kötődik, ahol transzkripciós faktorokkal komplexet képezve vagy azok nélkül, szabályozza a gének átíródását (Saha és mtsai, 2019) (3. ábra).

Az ösztrogének képesek az ER-független útvonalon keresztül antioxidáns hatás kifejtésére is. Az ösztrogén molekulák gyűrűs szerkezetének köszönhetően képesek hatástalanítani a sérült mitokondriumokból nagy mennyiségben felszabaduló ROS molekulákat. Ezenkívül az ösztrogének képesek az oxidatív stressz mérséklésére azáltal, hogy befolyásolják a redox egyensúlyban részt vevő enzimek aktivitását (Cui és mtsai, 2013). Az E2 ugyanis csökkenti a NAD(P)H oxidáz expressziós szintjét, ami a ROS generálás egyik fő forrása. Ugyanakkor az E2 a ROS eliminálásában részt vevő SOD, GPx1 és GPx4 antioxidáns enzimek expresszióját is fokozza (Arias-Loza és mtsai, 2013) (3. ábra).

Érdemes megemlíteni, hogy az ösztrogén jelátvitelre az ún. mikroRNS-ek (miRNS) (lásd 3.3 *Mikro-RNS-ek* fejezet) is hatást gyakorolhatnak. Ez az alábbi módokon keresztül valósulhat meg: i) az ER α kölcsönhatást gyakorol a miRNS-ek érésében fontos Drosha és Dicer enzimekre, ii) a miRNS-ek szabályozhatják az ER-ok expresszióját, iii) az ösztrogének befolyásolhatják egyes miRNS-ek expresszióját (Howard és Yang, 2018; Klinge, 2012; Vrtačnik és mtsai, 2014).

3.2. Xenoösztrogének

A xenoösztrogéneknek való nagyfokú kitettség komoly egészségügyi kockázatot képvisel, ami nagyrészt azzal hozható összefüggésbe, hogy szerkezeti hasonlóságuk miatt az endogén ösztrogénekhez hasonlóan a xenoösztrogének szintén képesek az ER-hoz és a GPER-hez kötődni, majd ezeken keresztül hatást gyakorolni az ösztrogén molekulák által modulált gének expressziójára (Wang és mtsai, 2021/a) (4. ábra). Ezenkívül számos egyéb mechanizmus által is képesek megzavarni az endokrin rendszer működését. Többek között a xenoösztrogének képesek (i) befolyásolni a hormon receptorok (ösztrogén-, oxitocin-, vazopresszin-) expresszióját; (ii) fokozni, vagy elnyomni bizonyos epigenetikai mechanizmusokat [DNS metiltransferáz expresszió, nem-kódoló RNS (miRNS) expresszió]; (iii) befolyásolhatják a hormonok szintézisét, transzportját és metabolizmusát (La Merrill és mtsai, 2020; Zheng és mtsai, 2019) (5. ábra). Ezek alapján a xenoösztrogéneket endokrin diszruptorként tartják számon. Ezen felül a xenoösztrogéneknek való nagyfokú kitettség összefüggésbe hozható számos hormonfüggő daganat kialakulásával (La Merrill és mtsai, 2020; Zheng és mtsai, 2019).

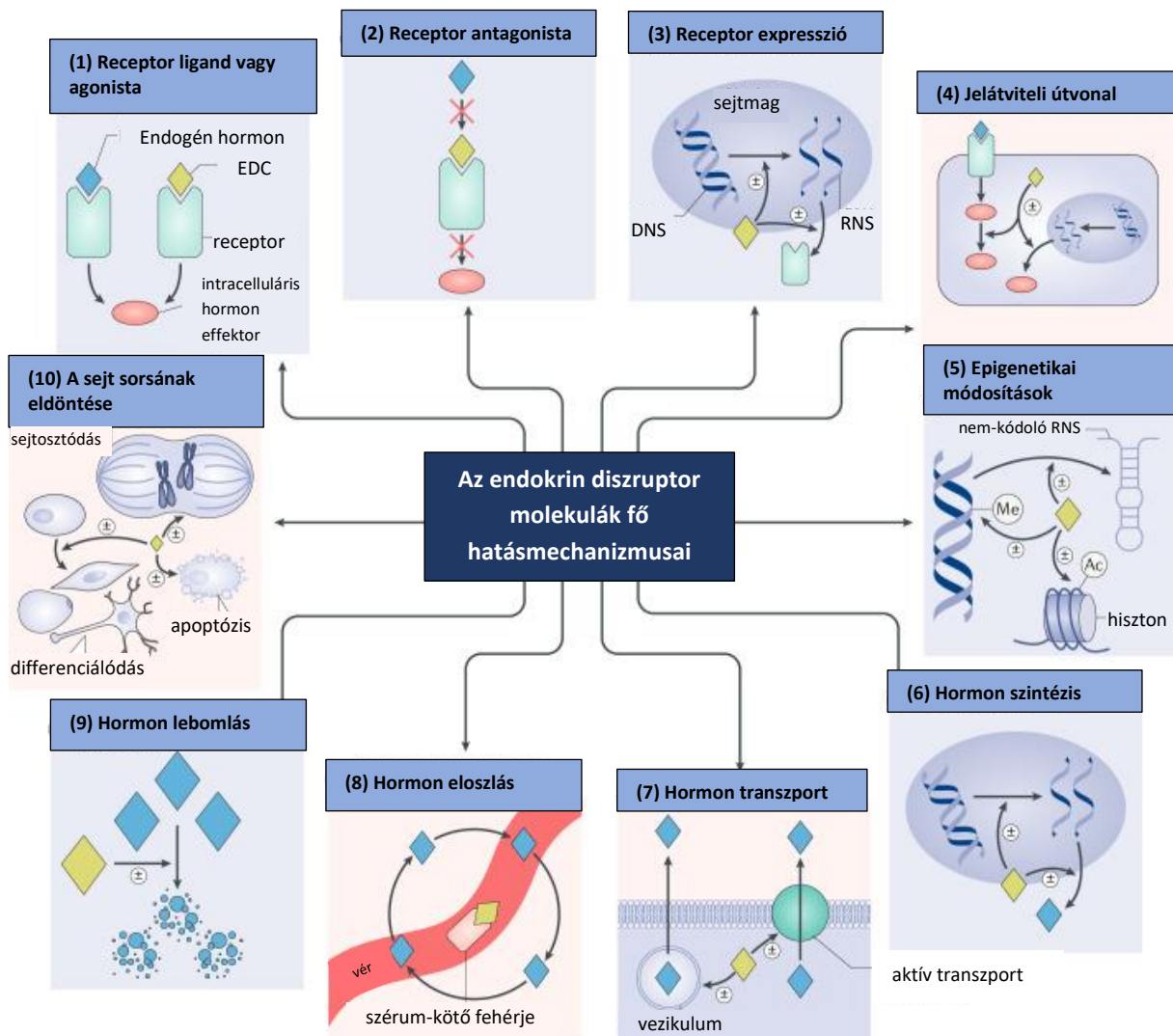


4. ábra. Az E2, a ZEA és a BPA molekulák szerkezete (Loi és mtsai, 2017; Michalowicz, 2014).

3.2.1. Biszfenol A

A biszfenol A (BPA) az egyik legnagyobb mennyiségben előállított szintetikus molekula, ami a polikarbonát műanyagok egyik alapanyaga. 2015-ben a BPA éves előállítási mennyisége 7,7 millió tonna, volt, ami 2022-ben már elérte a 10,6 millió tonnát (Michalowicz, 2014; Sonavane és Gassman, 2019). A BPA számos hétköznapi eszközünkben is megtalálható, mint pl. élelmiszer csomagolásokban, fogászati tömőanyagokban, hőpapírban, egészségügyi eszközökben (pl. kontaktlencsék, protézisek, intravénás kanülök, katéterek, koraszülött inkubátorok és dializáló készülékek), konzervdobozok belső bevonatában, valamint újszülötteknek és gyermekeknek szánt műanyag eszközökben. A BPA az emberre, valamint az állatvilágra egyaránt veszélyt jelent. A műanyagokból detergenssek, ill. hő hatására BPA monomerek képesek kioldódni, ezáltal kontaminálva az ezen eszközökben tárolt termékeket.

Ezen kívül nagy a környezet BPA terheltsége is, hiszen a műanyag hulladékból kikerülve folyóinkat, állóvizeinket és végső soron az ivóvizeinket is beszennyezi (Sonavane és Gassman, 2019; Torres-García és mtsai, 2022).



5. ábra. Az endokrin diszruptor molekulák (EDC) endokrin rendszer működésére gyakorolt hatása. (1) Képesek interakcióba lépni a hormon receptorokkal ezáltal aktiválni azokat. (2) Képesek gátolni a receptorok működését. (3) Képesek befolyásolni a hormon receptorok expresszióját. (4) Befolyásolhatják a jelátviteli folyamatokat (a fehérje és RNS expressziót, a poszttranszlációs módosításokat, és az ion áramlást) a hormon-függő sejtekben. (5) Epigenetikai módosításokat indukálhatnak a hormon termelő és hormon-szenzitív sejtekben. (6) Befolyásolhatják a hormonok szintézisét. (7) Befolyásolhatják a sejtmembránon keresztül zajló hormon transzport folyamatokat. (8) Befolyásolhatják a hormon eloszlását, valamint a keringő hormon mennyiségét. (9) EDC módosíthatja a hormon metabolizmust. (10) Befolyásolhatják a hormon termelő vagy hormon-szenzitív sejtek élettartamát. Az EDC hatás lehet fokozás és gátlás egyaránt, amiket a ± szimbólum jelöl. Ac: acetyl csoport; Me: metil csoport (La Merrill és mtsai, 2020).

A BPA-val való expozíció három fő forrása a táplálkozás, a bőrön keresztüli felszívódás és az inhaláció. A leggyakrabban fogyasztott élelmiszereink, mint pl. a zöldségek és gyümölcsök, halak, húsok, bébiételek, és egyéb konzerv élelmiszerek, 0,2 ng/kg és 0,14 mg/kg koncentrációjú BPA-t is tartalmazhatnak (Torres-García és mtsai, 2022). Becslések szerint az emésztőcsatornán keresztül naponta mintegy 0,48-1,6 µg/testkilogramm BPA szívódik fel (Michalowicz, 2014). Az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA=U.S Food and Drug Administration) és az Amerikai Környezetvédelmi Hivatal (US EPA=United States Environmental Protection Agency) úgy ítélte, hogy napi 50 µg/testkilogramm BPA még nem jelent egészségügyi kockázatot (Sonavane és Gassman, 2019). Azonban számos tanulmány azt bizonyítja, hogy a várandósság és a szoptatási időszakban elszenvedett 50 µg/testkilogramm vagy ennél kisebb mennyiségű BPA-nak való kitettség is negatív következményekkel járhat (Sonavane és Gassman, 2019). Az emberi testfolyadékokban, pl. a vizeletben 28-120 nM, míg a szérumban akár 80-430 nM-os koncentrációban ugyancsak kimutatható a BPA (Colorado-Yohar és mtsai, 2021; Dias és mtsai, 2022). Ennél magasabb értékek is mérhetőek az iparosodott országok lakói esetében. A BPA általi környezeti terheltség is eltér az egyes földrajzi régiók tekintetében. Mexikóban a gabona termények öntözésére szánt vízben 148-9340 ng/L koncentrációban volt mérhető a BPA. Indiában 835-1950 ng/L, Kínában pedig 12,3-755,6 ng/L volt a felszíni vizek mérhető BPA koncentrációja (Torres-García és mtsai, 2022). A termőföldben kimutatható BPA mennyisége Kínában 72,5-198.000 ng/g, Koreában 0,5-25.600 ng/g, Norvégiában és az Egyesült Királyságban pedig 200 ng/g alatt volt (Torres-García és mtsai, 2022). A BPA legfőbb akkumulációs helye a talaj, ugyanis itt a vegyület felezési ideje 75 nap, szemben a vízzel, ahol ez 37,5 nap, ill. a levegővel, ahol ez 0,13 nap (Torres-García és mtsai, 2022). Amerikai polikarbonát gyárakban végzett mérések alapján a zárt térben a levegő BPA koncentrációja 0,012-920 µg/m³-nek adódott. Ugyanakkor Új-Zéland és Finnország felett az atmoszférikus levegő is 0,004-1,34 µg/m³ mennyiségben tartalmazott BPA-t (Torres-García és mtsai, 2022). A nagy környezeti terheltség, és a potenciális egészségkárosító hatása miatt az US Environmental Protection Agency (EPA)=Amerikai Környezetvédelmi Ügynökség a BPA molekulát szociális, környezeti és globális ügynek nyilvánította (Shafei és mtsai, 2018).

A BPA 10.000-100.000-szer gyengébb ösztrogenikus hatással rendelkezik a fiziológiás ösztrogénhez képest. A BPA képes mindkét ER-hoz hozzákötődni, bár az ER β iránt 10-szer nagyobb affinitást mutat, mint az ER α irányában. A nem-nukleáris ER-okhoz a fiziológiás ösztrogénekkal megegyező affinitással kötődik (Michalowicz, 2014). Ezek mellett a BPA

potenciális aktivátora lehet más, nem klasszikus ER-oknak is, mint a GPER-nek, és az ösztrogén-függő receptor α -nak (ERR α), valamint az androgén receptoroknak, de a pajzsmirigy hormon agonistájaként és antagonistájaként is funkcionálhat (Sonavane és Gassman, 2019). A BPA számos reprodukciót nehezítő rendellenességgel hozható összefüggésbe, mint a policisztás ovárium szindróma (PCOS), az ismétlődő vetélések, az endometrium hyperplasia, valamint a terméketlenség előfordulásával. Megfigyelések alapján a nők vizeletében mérhető magas BPA koncentráció negatívan befolyásolta az in vitro megtermékenyítések sikerét (Dumitrascu és mtsai, 2020; Shafei és mtsai, 2018). A korai életkorban elszennvedett BPA expozíció korai pubertáshoz, idő előtti emlő növekedéshez is vezethet. Felnőtt nőkben a BPA csökkenti a primer petesejtek számát, valamint a férfiak hímivarsejtjeinek számát és mobilitását. Várandós nők esetén a BPA növeli az inzulinrezisztencia és a 2-es típusú diabétesz kialakulásának esélyét, a magzatnál pedig nagyobb eséllyel alakul ki magas vérnyomás (Wang és mtsai, 2021/a). Ezenkívül szerepe lehet még a kardiovaszkuláris- és az immunrendszer rendellenességeinek, az elhízás és a diabétesz kialakulásában (Wang és mtsai, 2021/a). Emellett a BPA-nak való kitettség összefüggésbe hozható a mellrák, a prosztatarák, a méhnyakrák, a tüdőrák és a petefészekrák kialakulásával. Ez egyrészt ösztrogén hatásának köszönhetően a proliferáció fokozásával, másrészt DNS károsító hatásával hozható összefüggésbe. A BPA lipofil természetének köszönhetően, már a nanomoláris dózisu BPA is képes akkumulálódni a sejtek mitokondriumaiban, ami a mitokondriumok diszfunkcióját és a ROS szint megemelkedését eredményezi (Sonavane és Gassman, 2019).

3.2.2. Zearalenon

A mikotoxinok (pl. aflatoxin, ochratoxin, fumonizin, trichotekán és a zearalenon) a fonalas gombák (pl. *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Fusarium sp.*) által termelt szekunder metabolitok. Mivel ezen gombákat szántóföldi, ill. raktári kártevőkként tartják számon, ezért az általuk termelt metabolitok – így a mikotoxinok is – megtalálhatóak a feldolgozott, gabona eredetű élelmiszerekben. A ZEA-t a *Fusarium* nemzetséghez tartozó, *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. crookwellense*, *F. semitectum* és a *F. equiseti* termelik. Ezen fonalas gombák leggyakrabban a búzát, kukoricát, zabot, árpát és a rizset kontaminálják. A ZEA kémiai szerkezetének köszönhetően 150 °C-ig hőstabil, ezért a takarmány és az élelmiszer feldolgozási folyamataiban sem bomlik le, így jelentős lehet ezen élelmiszerek ZEA kontaminációja (Rai és mtsai, 2020). Ez eltérhet a világ különböző pontjain, mivel a 25 °C fölötti hőmérséklet és a 16 %-os páratartalom kedvez a fonalas gombák növekedésének és mikotoxin termelő képességének, ezáltal a fejlődő országokban kiemelt problémát képvisel. Az Európai Unióban a kontamináló

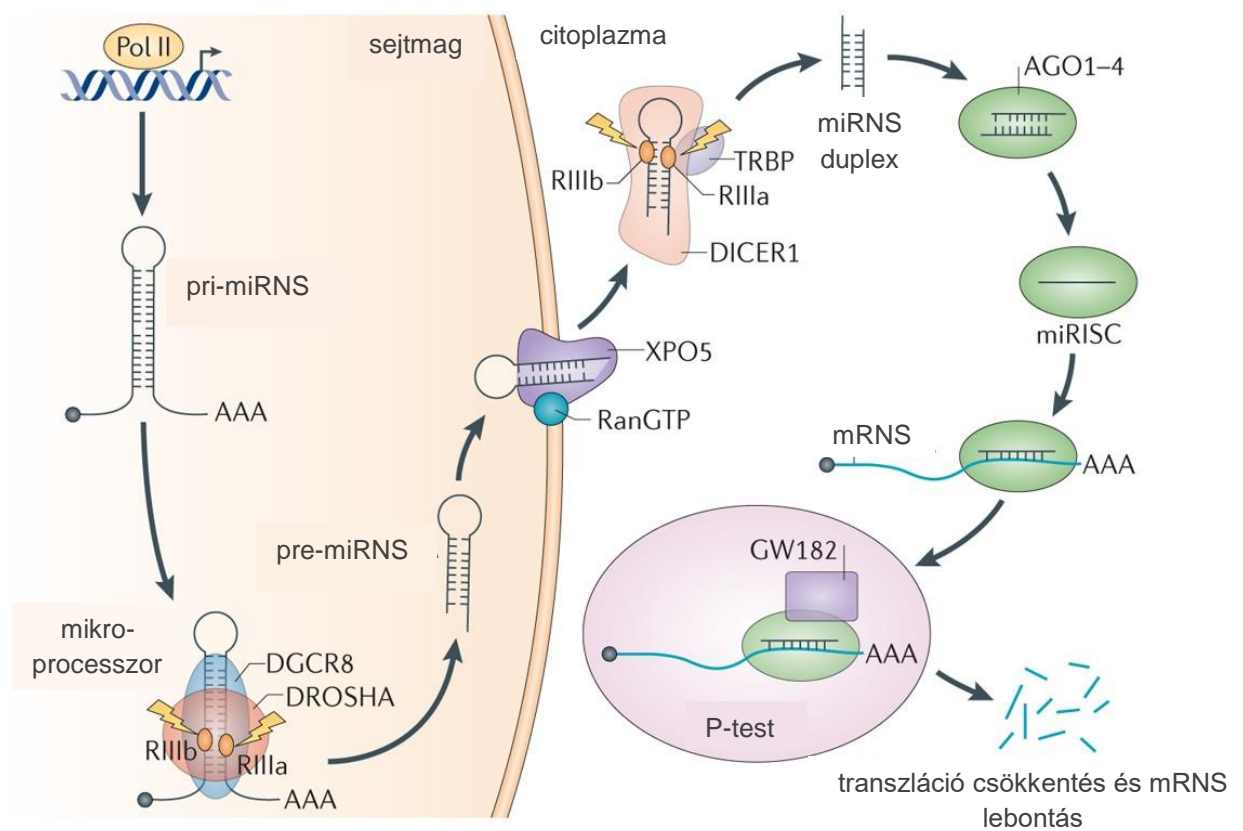
ZEA maximális mennyisége feldolgozatlan gabonákban 100-200 $\mu\text{g}/\text{kg}$, feldolgozott gabonákban 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$, gabonából készült snack-ekben pedig 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -ban jellemző (Rai és mtsai, 2020). Az Európai Élelmiszer Biztonsági Hatóság (EFSA) a napi tolerálható bevitelt (TDI) a ZEA esetében 0,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -nak állapította meg testsúly kilogrammonként (Rai és mtsai, 2020).

Érdemes megemlíteni továbbá, hogy a mikotoxinok, így a ZEA előfordulása magasabb lehet a takarmányokban, így az azt elfogyasztó haszonállatok húsán, tején és tojásán keresztül ugyancsak kölcsönhatásba kerül vele az emberi szervezet (Zhang és mtsai, 2018). A fiatal sertések 80-85 %-ának a táplálkozás útján történő ZEA bevétele elérheti akár a napi 10 mg/kg -ot testsúly kilogrammonként (Zhang és mtsai, 2018). A ZEA az $\text{ER}\alpha$ irányában nagyobb affinitással rendelkezik, mint az $\text{ER}\beta$ iránt. A ZEA képes aktiválni az ösztrogének szabályozása alá tartozó gének transzkripcióját, ezáltal hiper-ösztrogén szindrómát kialakítani. Megfigyelések szerint a kukoricában gazdag étrendű gyerekek hajlamosabbak a korai pubertásra, mivel ők halmozottan ki vannak téve a ZEA kontaminációnak. Ezen kívül idiopátiás pubertásban szenvedő gyerekek esetében magas ZEA koncentráció volt mérhető a szérumban, valamint reproduktív problémákkal küzdő nők endometriuma is detektálható mennyiségű ZEA-t tartalmazott. A ZEA-nak ezek mellett más kedvezőtlen hatása is lehet, mint a megváltozott progeszteron szint, csökkent tesztoszteron szint és sperma szám, valamint infertilitás (Kowalska és mtsai, 2016; Rai és mtsai, 2020). Ezenfelül nőstény egereken végzett kísérletek alapján, a ZEA megzavarja a petesejtek termelődését és érését, valamint csökkentette a méh tömegét és a még éretlen tüszők számát patkányok petefészkében (Kowalska és mtsai, 2016; Rai és mtsai, 2020). A haszonállatok közül a fiatal nőstény sertésekben a ZEA toxikus hatásának következtében gyakran alakul ki vulváris hipertrófia, petefészek sorvadás, ovuláció elmaradás, álvemhesség és sterilitás. A magas koncentrációjú (30-120 mM) ZEA dózisfüggő mértékben indukálta a sertések granulosa sejtjeinek apoptózist, valamint gátolta azok proliferációját (Zhang és mtsai, 2018). Mindezek mellett az $\text{ER}\alpha$ -hoz kötődve a ZEA sejtproliferációt volt képes indukálni prosztata rákos sejtvonalakban, malacokon végzett kísérletekben pedig a ZEA az ovárium tüszők növekedését idézte elő az ER függő Wnt-1/ β útvonal aktiválásán keresztül (Dumitrascu és mtsai, 2020; Rai és mtsai, 2020).

3.3. MiRNS-ek

3.3.1. A miRNS-ek biogenezise és funkciója

A miRNS-ek olyan kisméretű (~18-22 nt), egyszálú, nem-kódoló RNS molekulák, amelyek a poszttranszkripcionális szabályozásban működnek közre. Ez a hírvivő RNS-ekhez (mRNS) való, szekvencia specifikus kötődésükön keresztül valósul meg (Gadducci és mtsai, 2014; Klinge, 2012; Vishnoi és Rani, 2016). Becslések szerint a humán genom által kódolt gének 1-5 %-a valamilyen miRNS-t kódol, ami hozzávetőleg 2300 miRNS-t jelent. Valamint az emlősök fehérje kódoló génjeinek kb. 60 %-ában azonosítható legalább egy konzervált miRNS kötőhely (Alles és mtsai, 2019; Ha és Kim, 2014; Klinge, 2015; Vishnoi és Rani, 2016).



Nature Reviews | Cancer

6. ábra. A miRNS-ek biogenezise és funkciója. A sejtmagban a miRNS-t kódoló génekről az RNS polimeráz II (Pol II) átírja a pri-miRNS-t. A hosszú pri-miRNS-eket a Mikroprocesszor komplex (DROSHA és DGCR8) hasítja, ami a 60–70-nukleotid hosszúságú pre-miRNS-t eredményezi. Ezután a pre-miRNS az XPO5 transzporterrel keresztül a citoplazmába jut. Itt a DICER1 [ribonukleáz III (RIII)] enzim érett miRNS-é alakítja. A duplaszálú, érett miRNS vezető szála betöltődik a miRISC komplexbe (miRNS-indukálta csendesítő komplex), amit a DICER1 és az AGO fehérje épít fel. A miRISC hozzákötődik a miRNS szekvenciájával komplementer mRNS-hez, ezáltal mRNS degradációt vagy transzláció gátlást vált ki a processing testekben (P-test). TRBP (transzaktiváció-válaszadó RNS-kötő protein) (Lin és Gregory, 2015).

A miRNS-ek és targetjeik közötti bázispárosodás a miRNS 5' végén található 2-7 bázispárból álló, ún. seed szekvencia és a cél mRNS 3' UTR-ban (3' nem transzlálódó régió) található miRNS válaszadó elem (MRE) között megy végbe, a szabályozás módja pedig a komplementaritás mértékétől függ. Míg alacsony fokú komplementaritás esetén a transzláció gátlása, addig magas fokú komplementaritás mellett az mRNS degradációja figyelhető meg (Ghini és mtsai, 2018). Az alacsony fokú komplementaritással való kötődés lehetőségének következtében egy miRNS számos mRNS-el is képes kölcsönhatásba lépni, valamint egy mRNS is targetje lehet többféle miRNS-nek, így miRNS-mRNS hálózatok jönnek létre (Ghini és mtsai, 2018; Vishnoi és Rani, 2016). A miRNet adatbázis (<https://www.mirnet.ca>) alapján pl. a miR-30d-5p és 3p ~ 2430, a miR-21-5p és 3p ~ 3100, a miR-1-5p és 3p pedig ~ 7230 targettel rendelkezik.

A miRNS-ek biogenezeise során a sejtmagban a miRNS-eket kódoló génekről többnyire az RNS polimeráz II írja át a primer-miRNS-nek (pri-miRNS) nevezett transzkripteket (Vishnoi és Rani, 2016) (6. ábra). A miRNS-ek rendelkezhetnek több transzkripció startshellyel is, ezen kívül nem ritkák a policisztronos elhelyezkedésű, proximálisan egymás mögött elhelyezkedő miRNS-ek sem. Ezek az ún. klaszterekben elhelyezkedő miRNS-ek egyszerre íródnak át. A transzkripciót követően a pri-miRNS több érési lépésen megy keresztül. A pri-miRNS egy hozzávetőlegesen 1 kb hosszúságú molekula, ami 33-35 bp törzs szekvenciából, egy terminális hurokból, valamint egyszálú RNS szegmensekből áll a 3' és az 5' végeken (6. ábra). A pri-miRNS-t a Mikroprocesszor komplex vágja [RNáz III endonukleáz aktivitással rendelkező Drosha, és a DGCR8 (DiGeorge szindróma kritikus régió 8, másnéven Pasha) komplexe] 60-70 nukleotid hosszúságú, hajtű formájú pre-miRNS (prekursor miRNS) molekulára, ami a 3' végén túlnyúló egyszálú véggel rendelkezik. Érdemes megemlíteni, hogy neuroblasztóma és petefészek daganatok esetében a Drosha és a Dicer enzimek csökkent expressziója figyelhető meg, valamint a DGCR8 nagymértékű expressziója összefüggést mutat a daganatok progressziójával és a rosszabb klinikai kimenetellel (Annese és mtsai, 2020). Ezen megfigyelések jól szemléltetik a Drosha és a DGCR8 enzimek esszenciális szerepén keresztül a miRNS-ek jelentőségét a normál élettani folyamatokban (Ha és mtsai, 2014; Vishnoi és Rani, 2016) (6. ábra).

A pre-miRNS ezután a citoplazmába transzportálódik az XPO5 fehérjéből és a RAN•GTP-ből (GTP-kötő nukleáris protein) álló transzport komplexen keresztül (6. ábra). A pre-miRNS-ek érési folyamatát ezután az RNáz III típusú endonukleáz, a Dicer enzim folytatja. A Dicernek a pre-miRNS felismerését és ahhoz való kötődését a Drosha által kialakított 3' végén lévő 2 nukleotidos túlnyúló vég segíti. Az emlősökben megtalálható Dicer enzim fix helyen hasítja

el a miRNS-t, a 3' végtől 21-25, míg az 5' végtől számított 22 nukleotid távolságra. A pre-miRNS-ről a terminális hurok lehasítása egy rövid miRNS: miRNS* duplexet eredményez. A miRNS: miRNS* duplaszálú struktúra miRNS szála az érett miRNS, míg a miRNS* egy 3' túlnyúló véggel rendelkező komplementer szekvencia (Ha és mtsai, 2014; Vishnoi és Rani, 2016). Ez a kis duplaszálú miRNS molekula ezután hozzákötődik az argonauta (AGO) fehérjéhez, így létrehozva az RNS indukálta csendesítő komplexet (RISC) (6. ábra). A RISC összeszerelődése két lépésből áll: az RNS duplex bekötődéséből, majd az utas szál letekeredéséből (Ha és mtsai, 2014). A vezető miRNS szál kiválasztása a betöltődés fázisában történik. A miRNS: miRNS* duplex két szála közül általában a termodinamikailag instabilabb 5' véggel rendelkező szál lesz a vezető szál. Mindezek mellett meghatározó tényező lehet a miRNS szál első nukleotidja, ugyanis az AGO fehérje nagyobb valószínűséggel választja ki azt vezető szálként, amelynek az első pozíciójában uracil található (Ha és mtsai, 2014). A vezető szál kiválasztása azonban nem teljesen szigorú folyamat, időnként az alternatív szál szelekciója is megtörténik, melynek eredményeként ugyanazon miRNS különböző izoformái dominálhatnak a különböző sejttípusokban. Attól függően, hogy az érett miRNS a prekursor miRNS 5' vagy 3' végéből vágódik-e ki -5p vagy -3p jelölést kap. Például a miR-142-5p jellemzően a petefészekben, a herékben és az agyban expresszálódik, ezzel szemben a miR-142-3p nagyobb mennyiségben detektálható embrionális vagy újszülött szövetekben (Ha és mtsai, 2014; Mitra és mtsai, 2015).

A RISC komplex katalitikus aktivitása az AGO2 fehérje működésén keresztül valósul meg. Emellett az AGO fehérjék befolyásolják a miRNS-ek stabilitását is, azáltal, hogy védik őket az exonukleázok általi degradációtól. Az AGO fehérje és a hozzá kötődő érett vezető miRNS szál (miRISC komplex) többféle módon is képes befolyásolni a génexpressziót. A leggyakoribb mechanizmus szerint a miRISC a target mRNS 3' UTR régiójához kötődik és a komplementaritás mértékétől függően a mRNS-ről folyó transzláció blokkolását vagy a molekula degradációját idézi elő. Amennyiben teljes a komplementaritás a miRNS és a mRNS-en megtalálható MRE szekvenciái között, az AGO2 fehérje endonukleáz aktivitása indukálódik, ami így lebontja a target mRNS-t. Ezenkívül ez az interakció destabilizálja az AGO fehérje és a miRNS 3' vége közötti kapcsolatot, ami a miRNS degradációját is kiváltja. Az állati sejtek többségében a miRNS-MRE szekvenciák nem teljesen komplementerek, így az RNS interferáló hatása jobban érvényesül (O'Brien és mtsai, 2018). Az érett miRNS-eket tartalmazó miRISC komplex képes továbbá visszajutni a sejtmagba az importin-8 vagy exportin-1 ingafehérjéken keresztül. A sejtmagban lokalizált miRISC ezután szabályozhatja a

mRNS transzkripció rátáját. Ezen kívül a sejtmagban a miRISC képes interakcióba lépni a sejtmagban található mRNS-ekkel és azok degradációját kiváltani (O'Brien és mtsai, 2018).

Érdemes megemlíteni továbbá, hogy a P-testek (az eukarióta sejtek evolúciósan konzervált dinamikus, membrán nélküli granulái/szervecskéi/szemcséi) is részt vesznek a miRNS-ek általi géncsendesítés szabályozásában, ugyanis nagymértékben tartalmaznak GW182, AGO fehérjéket. Ezen kívül képesek az mRNS-ek tárolására és stressz hatására bekövetkező lebontására is (Niaz és Hussain, 2018; Nsengimana és mtsai, 2022) (6. ábra).

3.3.2. A miRNS-ek szerepe a tumorok kialakulásában

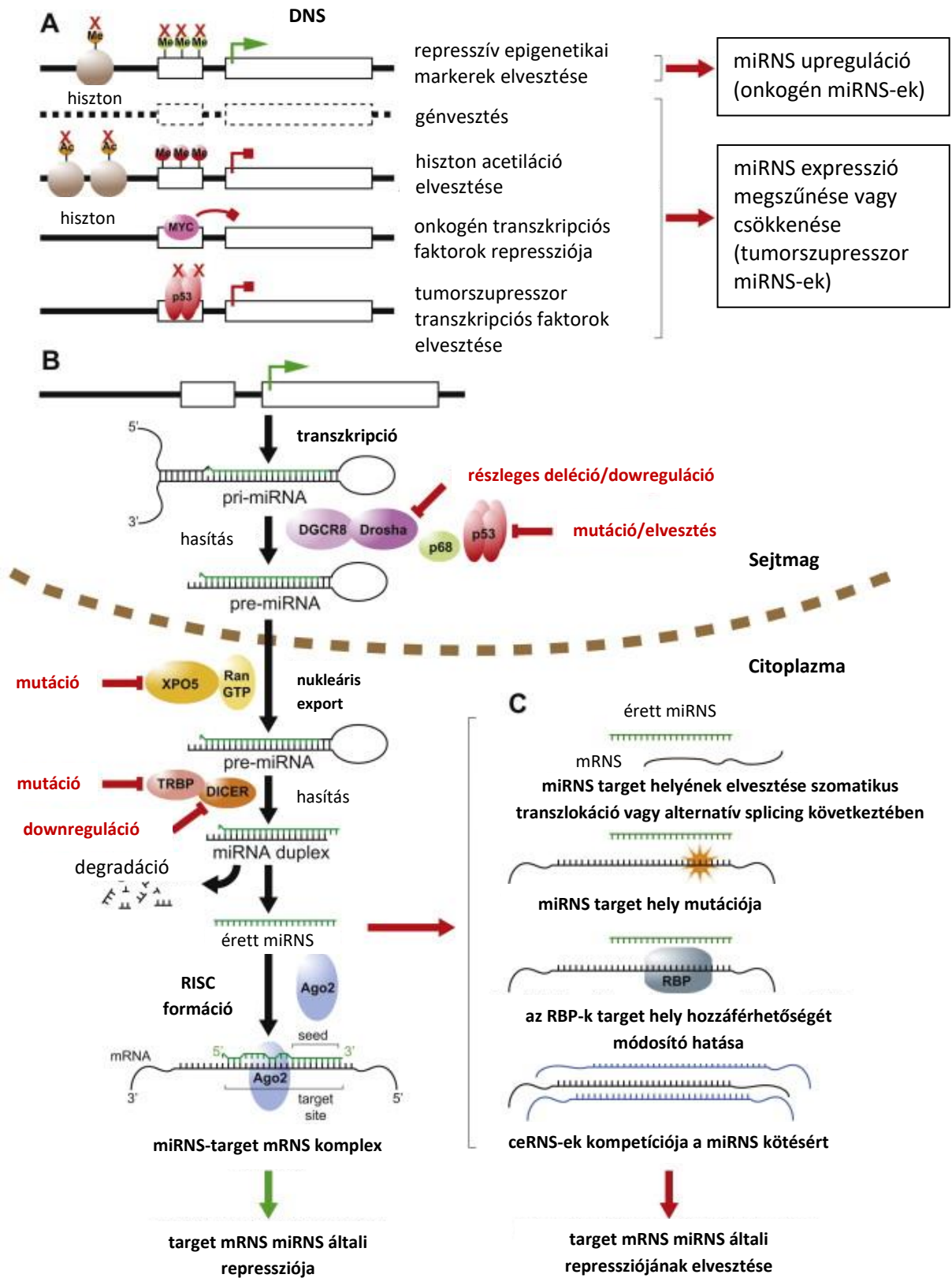
A miRNS-ek felfedezését követően nagy érdeklődés övezte az emberi megbetegedésekben betöltött esetleges szerepüket. A miRNS-ek normál működésük mellett fontos szabályozói az immunválasznak, az inzulin szekréciónak, a neurotranszmitter szintézisnek, sőt még a cirkadián ritmusra is hatást gyakorolnak (Vishnoi és Rani, 2016). Hamar felismerésre került, hogy a miRNS-ek expressziójában bekövetkező diszreguláció fontos szerepet tölt be számos betegség kialakulásában, tk. neurodegeneratív kórképek, kardiovaszkuláris rendellenességek, a retinát érintő megbetegedések, valamint a daganatos megbetegedések esetén. A miRNS-ek képesek kihatni a malignus elváltozásokhoz szükséges mind a 6 tényezőre. Ezek nevezetesen 1) a növekedési szignáloktól való függetlenedés (pl. let-7 család), 2) az anti-növekedési szignálokkal szembeni érzéketlenség (pl. miR-17-92 klaszter), 3) az apoptózis elkerülése (pl. miR-34a), 4) a korlátlan replikációs képesség (pl. miR-373/373 klaszter), 5) az angiogenezis elősegítése (pl. miR-210), valamint 6) a tumor inváziós és metasztázis képző képessége (pl. miR-10b) (Di Leva és mtsai, 2014).

Funkciójuk alapján a következő csoportokba sorolhatjuk őket: onkogének (onko-miR), tumorszupresszorok (TS-miR), metasztázist elősegítő vagy szupresszálo (metasztá-miR), angiogenezist elősegítő (angio-miR) vagy az immunrendszer működésére ható (immuno-miR) miRNS-ek (Muthamilselvan és mtsai, 2023, Vishnoi és Rani, 2016). Az onko-miR-ek targetjei tumorszupresszor hatású gének, így overexpressziójuk a tumorszupresszor funkcióval rendelkező fehérje képződésének gátlásán keresztül kedvez a daganatok kialakulásának. Ide sorolható pl. a miR-21, amelynek túltermelődése jellemző colorectalis- és emlő daganatokban, és a PDCD4 (programozott sejthalál 4) tumorszupresszor downregulációját vonja maga után. A TS-miR-ek onkogén hatású génekről átíródó fehérjék mennyiségét csökkentik, ezáltal ezen miRNS-ek alacsony szintje kedvez a malignus elváltozások kialakulásának. Pl. a miR-15 és miR-16 molekulák csökkent expressziója kedvez az anti-apoptotikus *BCL2*, *CDC2* és *ETS1* molekulák szintézisének (Muthamilselvan és mtsai, 2023). A metasztá-miR-ek képesek negatív

és pozitív irányba is befolyásolni a tumorok metasztázisához szükséges olyan folyamatokat, mint pl. az epitheliális-mesenchymalis átalakulást (EMT). Az EMT folyamatában a sejtek elveszítik epitheliális karakterüket (E-kadherin expresszió csökkenése vagy elvesztése) és mesenchymalis jegyeket szereznek (vimentin expresszió). Daganatok esetén az EMT-ra utaló jelek rossz prognózissal társulnak, ugyanis ilyen esetekben a tumorok megnövekedett inváziós képességre és kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztenciára is szert tehetnek (Pastushenko és Blanpain, 2019). A miR-200-as családba tartozó miRNS-ekről ismert, hogy a *ZEB1* gén expressziójának csökkentésével gátolják az E-kadherin szintézisét, így elősegítve az EMT-t (Márton és mtsai, 2020). Az angiogenezis a daganatok növekedését támogató érképződést jelenti. Számos miRNS ismert, amelyeknek kiemelt szerepe van ezen folyamat szabályozásában. A miR-126 mellrákban gyakran overexpresszált angio-miR molekula, ami elősegíti a daganat érhálózatának kiépítését és fenntartását (Annese és mtsai, 2020; Muthamilselvan és mtsai, 2023). Az immuno-miR-ek csoportjába tartozó miRNS-ek képesek a T-sejtek érési-, differenciációs- és aktivációs folyamataira hatni. Ezáltal elősegíthetik a tumoros sejtek immunválasz elkerülő folyamatait. A miR-155 az epitheliális (pl. vastagbél, végbél, mell), valamint a nyirokrendszer eredetű (pl. B-sejtes limfóma) daganatokhoz köthető, ugyanis fontos szerepe van az immunsejtek érésében és a gyulladási folyamatok szabályozásában (Muthamilselvan és mtsai, 2023).

A miRNS-ek eltérő expressziós szintje mögött gyakran mutációk állnak. A miRNS kódoló régiókat is magába foglaló kromoszóma átrendeződések, amplifikációk, deléciók és mutációk mind befolyásolják a sejtre jellemző miRNS készletet (7. ábra). Pl. humán krónikus limfoid leukémiában (CLL) leggyakrabban a 13q14.3 szegmens deléciója írható le, ami egyúttal a miR-15a/16-1 miRNS klaszter helyét is magában foglalja (Di Leva és mtsai, 2014). A CLL-el diagnosztizált betegek többségében kimutatható a miR-15a/16-1 miRNS klaszter jelentős down-regulációja (Annese és mtsai, 2020). A miRNS-eket kódoló gének átírása szintén zavart szenvedhet (7. ábra). Például a tumorszupresszor hatásúként számontartott miR-34-es miRNS család transzkripcióját képes a p53 indukálni. Így a p53 mutációja esetén a miR-34-es család miRNS-einek tumorszupresszor hatása sem érvényesül. A p53 mutáns epitheliális ovárium tumorok közel 100 %-ában csökkent a miR-34a, míg 72 %-ában a miR34b/c expressziója (Di Leva és mtsai, 2014). A miRNS-eket kódoló régiók epigenetikai módosítása is hozzájárulhat a tumorok kialakulásához. A tumorszupresszor miRNS-eket kódoló régiók hipermetilációja előidézhetheti az onkogén targetjeik overexpresszióját. Például a miR-127 tumorszupresszor miRNS repressziója figyelhető meg DNS metiláció, vagy hiszton módosítások következtében, ami a *BCL6* proto-onkogén expresszióját gátolja prosztata tumorokban. Hasonlóképpen a miR-

124a hipermetilációja detektálható vastagbél rákban, ami kedvez az onkogén CDK6 (ciklin dependens kináz 6) upregulációjának (Di Leva és mtsai, 2014).



7. ábra. Eltérő miRNS expresszióhoz-, ill. funkcióhoz vezető folyamatok daganatsejtekben. (A) A miRNS-eket kódoló gének transzkripciójának zavara daganatokban kialakulhat genetikai, epigenetikai és transzkripcionális zavarok következtében. Me: metiláció; Ac: acetiláció. (B) A miRNS biogenezis és processzálas folyamataiban bekövetkező zavarok sematikus ábrázolása. (C) A mRNS molekulák, miRNS-ek általi szabályozása alól való kikerülését lehetővé tevő mechanizmusok. RBP (RNS kötő fehérje); ceRNS (versengő endogén RNS), kék színnel jelölve (Jansson és Lund, 2012).

Azonban a miRNS szintekre a biogenezisben részt vevő enzimek mennyisége is hatással lehet (7. ábra). A petefészek daganatos betegek 39 %-ában a Dicer és Drosha enzimek mRNS szintjének 60 %,-al ill. 51 %-al való csökkenését tapasztalták, ami alacsonyabb miRNS szinthez vezetett. Érdeemes továbbá megemlíteni, hogy a Dicer egy haploinsufficiens tumor szupresszornak tekinthető, vagyis már az egyik allél elvesztése is elegendő a mutáns fenotípus kialakításához (Di Leva és mtsai, 2014). Továbbá a miRNS előalakok transzportjában fontos XPO5 transzmembrán receptort kódoló génben bekövetkező mutáció – amely gyakran előfordul prosztata-, emlő-, húgyhólyag-, és petefészek daganatokban - a citoplazmába kijutó pre-miRNS-ek csökkent számát eredményezi, amely következtében kevesebb lesz a sejten rendelkezésre álló érett miRNS szintje (7. ábra) (Annese és mtsai, 2020).

3.3.3. *MiRNS-ek alkalmazása a klinikai gyakorlatban: biomarkerek és terápiás eszközök*

A miRNS-ek a diagnosztika ígéretes eszközeivé válhatnak a jövőben, amelynek alapja, hogy a különböző sejttípusok egyedi miRNS repertoárral rendelkeznek. Ebből következően a különböző tumorsejtek is specifikus miRNS profillal rendelkeznek. Diagnosztikában való alkalmazhatóságuk előnye, hogy nagy stabilitás jellemző rájuk, - kellően stabilak maradnak akár formalinban fixált szövetmintákban is - valamint relatíve könnyen és gyorsan végezhetőek rájuk rutin kvantifikációs vizsgálatok (Ho és mtsai, 2022; Jansson és Lund, 2012). A szövetminták miRNS profilozása mellett nagy előnyük, hogy sejten kívül is jelen vannak, ami azzal a ténnyel van összefüggésben, hogy részt vesznek a sejtek közötti kommunikációban és a tumor mikrokozonyzatának a kialakításában. Ezen fómájukat nevezzük szabad miRNS-eknek, melyek megtalálhatóak tk. a plazmában, a szérumban, a vizeletben, a könnyben, a nyálban, a cerebrospinális folyadékban, a mellkasi folyadék gyülemében, az anyatejben, a hüvelyváladékban, és a spermában is (Muthamilselvan és mtsai, 2023; Silva és mtsai, 2015; Szilágyi és mtsai, 2020). Ezen miRNS-ek kb. 90 %-a fehérjével alkotott komplexben van jelen, ami lehet az AGO2, Nukleofoszmin1 (NPM1), vagy magas-denzitású lipoprotein (HDL). További 10 %-uk exoszómákba (30-150 nm átmérőjű, gömb alakú, dupla lipid membránnal körülvett partikulum) csomagolva exportálódik ki a sejtekből (Li és mtsai, 2021/a). Az

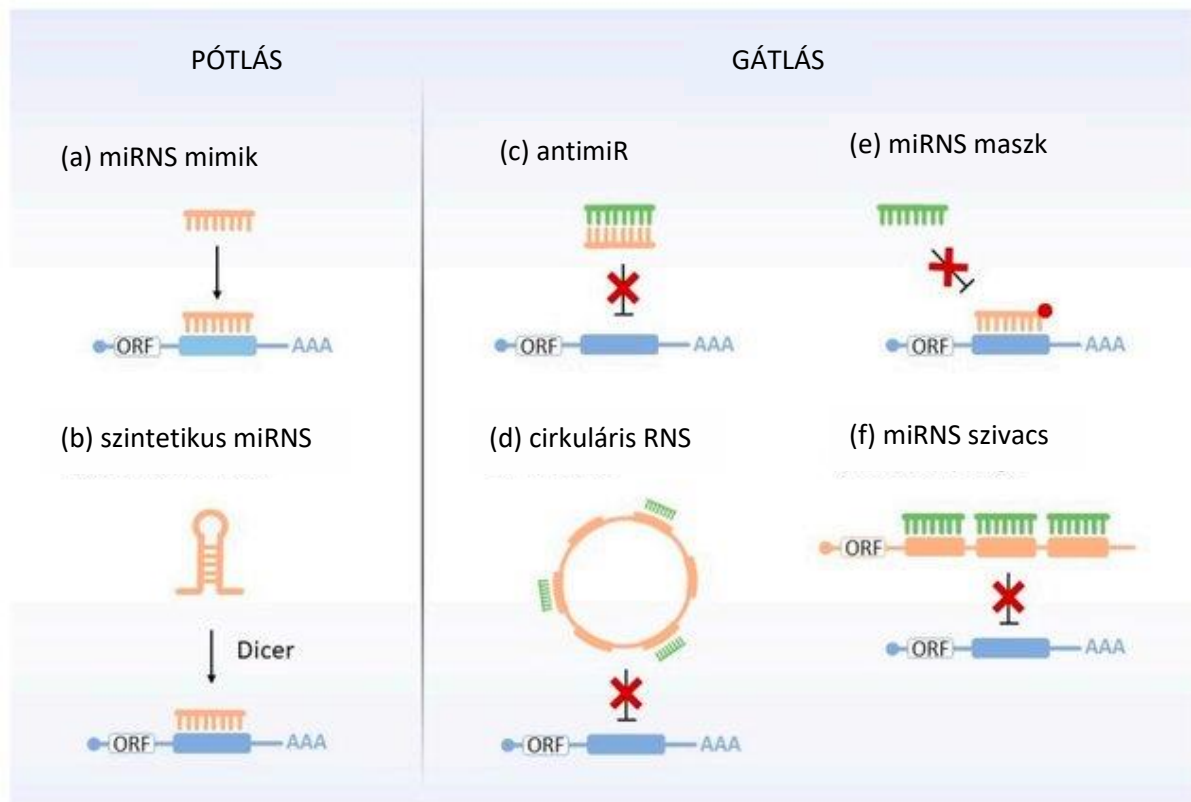
exoszómák által a miRNS-ek ellenállnak az RNáz-ok lebontó hatásával szemben, ezzel magyarázható nagy stabilitásuk. Az exoszómákba csomagolt miRNS-ek képesek a szövetközi folyadékok útján távolabbi sejtekhez eljutva endocitózis, membrán fúzió vagy specifikus sejtfelszíni receptorok útján bejutni a sejtekbe, ahol befolyásolják a távolabbi célsejtek mRNS expresszióját is (Ho és mtsai, 2022).

Testfolyadékokban való jelenlétük lehetővé teszi a folyadék biopsziás eljárásokban való alkalmazhatóságukat, amely a testfolyadékokban jelenlévő biomarkerek monitorozásán alapul. Ezen eljárás előnyei közé tartozik a hagyományos biopsziás mintavételi eljárásokkal szemben, hogy kevésbé invazív eljárás lévén minimális terhet jelent a betegek számára, így akár a rutin szűrővizsgálatok alapját is képezhetik. Emellett segíthet a tumor stádiumának, lokalizációjának, valamint a metasztázis meglétének meghatározásában is. Az ismételt mintavételi lehetőségeknek köszönhetően pedig lehetővé válik a terápia nyomon követése, a rezisztencia kialakulásának gyors diagnosztizálása, valamint a betegség progressziójának a monitorozása (Muthamilselvan és mtsai, 2023).

Számos miRNS-t tartanak számon, mint ígéretes biomarker jelöltet. Petefészek daganatos betegek szérumban a miR-21, miR-92, miR-93, miR-126 és miR-29a miRNS-ek emelkedett szintet, míg a miR-155, miR-127 és miR-99b miRNS-ek csökkent expressziót mutatott az egészséges kontroll mintákhoz viszonyítva. Emellett a magas miR-23a, miR-27a, miR-24-2 és miR-21 kedvezőtlen kimenetellel társultak ovárium tumoros betegeknél. Ezzel szemben a magas miR-449, miR-200a/c, miR-141, valamint a miR-30d-5p expresszió jó prognózissal és hosszabb progresszió-mentes túlélési eséllyel társult (Ghafouri-Fard és mtsai, 2020). Hasnyálmirigy daganat esetén a miR-221, miR-301, miR-376a és miR-21, tüdőráknál pedig a let-7a-2 és a miR-155 miRNS-ek tekinthetők ígéretes biomarker jelölteknek (Muthamilselvan és mtsai, 2023). A miR-221-3p, miR-378c-3p és miR-744-5p miRNS panel szérumban mérhető koncentrációjának változása képes megjósolni a gyomorrák kialakulását, akár 5 évvel a klinikai tünetek megjelenése előtt. A plazma minták miR-21-5p expressziója 90 %-os szenzitivitással és specificitással képes differenciálni az egészséges és a colorectalis daganatban szenvedő egyéneket. Ugyancsak ígéretes szűrő módszer az Alzheimer kórra való hajlam kimutatására alkalmazható 7 miRNS-ből álló szett (miR-545-3p, miR-301a-3p, miR-191-5p, miR-142-3p, miR-15b-5p, let-7g-5p, let-7d-5p), ami 95 %-os pontossággal képes kiszűrni a még tünetmentes betegeket (Ho és mtsai, 2022).

A gondosan kiválasztott miRNS-ek segítségével lehetséges olyan mRNS-ek expresszióját befolyásolni, amelyek valamilyen betegség kialakulásához köthetőek, ezáltal a miRNS-ek a terápiában is alkalmazhatóak lehetnek. A miRNS alapú terápiás eljárások két csoportba

oszthatóak: a miRNS-ek hatását utánzó (miRNS mimik) és ezek funkcióját gátló (antimiR) eljárásokra (8. ábra). A miRNS mimik molekulák mesterségesen szintetizált dupla szálú, rövid RNS molekulák, amelyeknek a szekvenciája megegyezik annak a miRNS-nek a szekvenciájával, amit pótolni kíván. Akkor alkalmazhatóak, ha a betegség hátterében egy miRNS expressziójának a csökkenése áll (pl. daganatok esetén a tumorszupresszor hatású miRNS-ek) (Contiliani és mtsai, 2021; Hill és Tran, 2021; Rupaimoole és mtsai, 2017).



8. ábra. MiRNS funkciót helyettesítő és gátló terápiás eljárások. A miRNS pótlás stratégiái: (a) kémiai szintetizált, miRNS mimik, amely a komplementer mRNA expresszióját befolyásolja; (b) szintetikus hairpin formájú miRNS, amely hasítást követően képes a cél-mRNA-hez kötődni, és kiváltani annak degradációját vagy transzlációs blokkolását. A miRNS gátló stratégiák: (c) antimiR, amely a cél-miRNS-hez kötődik, és meggátolja annak a cél-mRNA-sel való kölcsönhatását; (d) cirkuláris RNS, amely megköti és ezáltal távol tartja a miRNS-t a cél-mRNA-ektől; (e) miRNS maszk, amely blokkolja a miRNS működését azáltal, hogy lefedi a cél-mRNA kötőhelyét; (f) miRNS-szivacs, amely gátolja a miRNS-ek cél-mRNA-ekhez való kötődését azáltal, hogy „csapdaként” szolgálva megköti azokat. A narancsszín a terápiás molekulát, a kék a cél mRNA-t, a zöld a miRNS-t jelöli (Contiliani és mtsai, 2021).

A túlsúlyban lévő, onkogén hatású miRNS-ek hatásának a csökkentésére is több stratégia létezik. Ilyen az antimiR-ek, a cirkuláris RNS-ek, a miRNS maszk, vagy a miRNS szivacs technikák alkalmazása (8. ábra) (Contiliani és mtsai, 2021; Hill és Tran, 2021; Rupaimoole és mtsai, 2017). Ezek olyan egyszálú vagy cirkuláris oligonukleotid molekulák, amik a komplementer miRNS megkötésével vagy a target mRNA kötőhelyének elfoglalásával

csökkentik az eredeti miRNS hatását. Ha az antimir-ek 2'-O-metoximetil csoporttal egészülnek ki, akkor antagomiR-nek nevezzük őket. Ezzel a kémiai módosítással az antagomiR molekula képes erős kötést kialakítani a komplementer miRNS-sel, amivel a funkcionális gátlását idézi elő (Rupaimoole és mtsai, 2017) (8. ábra).

A miRNS terápia hatékonyságát limitáló tényezők közé sorolható az RNázok általi lebontás, a természetes immunválasz kiváltása a Toll-like receptorokon keresztül (TLR), valamint a cél mRNS-en kívül egyéb mRNS-ek translációjára gyakorolt, nem specifikus, ún. off-target hatás. A szintetikus miRNS-ek kémiai módosításával azonban csökkenthetőek ezek a nem kívánatos hatások. A ribóz molekula 2'-OH csoportja számos nukleáznak a támadáspontja, ezért ezen pozícióban 2'-O- metil molekulára való módosítás csökkenti a miRNS degradáció mértékét. Ezenkívül 1-2 foszfodiészter kötés foszfotionát kötésre cserélése a molekula stabilitásának növelése mellett, képes csökkenteni a természetes immunválaszt kiváltó hatását (Ho és mtsai, 2022). A miRNS mimik kísérő szála által kiváltott off target hatás csökkenthető azzal, ha a kísérő szál kettő- vagy három kisebb szálból tevődik össze. Ezáltal a miRNS darabok túl rövidek lesznek ahhoz, hogy kölcsönhatásba léphessenek a komplementer mRNS-ekkel (8. ábra) (Ho és mtsai, 2022).

A terápiás miRNS-ek szervezetbe való bejuttatása többféle módszerrel is megvalósulhat. Kezdetben a csupasz miRNS-ek szisztémás keringésbe vagy közvetlenül a célszövetbe injektálása nem hozott nagy sikert, az RNázok általi degradáció és az alacsony célba jutási ráta miatt (Rupaimoole és mtsai, 2017). A miRNS-ek célba juttatására nagy hatásfokkal alkalmazhatóak a virális vektorok. Ugyanis a vírusok természetüknél fogva képesek az emlős sejtek fertőzése által a genetikai anyag nagy hatékonyságú célba juttatására (Savenkova és mtsai, 2022). Virális vektor alapú rendszerek kidolgozására alkalmasak az adenovírusok (pl. miR-122, miR-181, miR-142-3p), adeno-asszociált vírusok (pl. miR-122, miR-1, miR-124, miR-204, miR-181c, miR142-3p, miR-206, miR-208a), és a lentivírusok (pl. miR-128, miR-126, miR-130a, miR-150, miR-181a, miR-223, miR-155, miR-302a) (Geisler és Fechner, 2016). A nem virális vektor alapú RNS szállító rendszerek közé tartoznak a lipid- és a polimer alapú rendszerek. Ezeknek nagy előnye a virális vektorokkal szemben, hogy nem váltanak ki jelentős immunválaszt. Hátrányaik közé tartozik azonban, hogy a vírusoknál kisebb hatásfokkal képesek a célsejtek transzfektálására (Ban és mtsai, 2019). De a nanopartikulumok mérete, alakja és akár töltése is személyre szabható a hatékonyság fokozása érdekében (Li és mtsai, 2018). A miRNS terápiában jelenleg a legnagyobb hatásfokkal alkalmazható szállító rendszerek a következők: poli(lakton-glikolsav) partikulum (PLGA), természetes lipid emulzió (NLE), szintetikus polietilénimin (PEI), dendrimerek, ciklodextrin alapú hordozó rendszerek,

poli(etilén)glikol) (PEG), citozánok, valamint az N-acetil-D-galaktózamin (GalNAc) (Rupaimoole és mtsai, 2017). A nanohordozó rendszerek specifikus receptor ligandokkal is elláthatóak a pontos célba juttatás érdekében. Ezek a ligandok lehetnek fehérjék, antitestek, vagy egyéb, kismolekulák, amelyek specifikusan képesek megkötődni a célsejt felszínén. Limfóma kezelésében pl. CD20 antitestekkel konjugált PLGA-t vagy kis-interferáló RNS-t (siRNS), míg akut mieloid leukémia esetében folát receptorral ellátott siRNS-t alkalmaznak (Yan és mtsai, 2022).

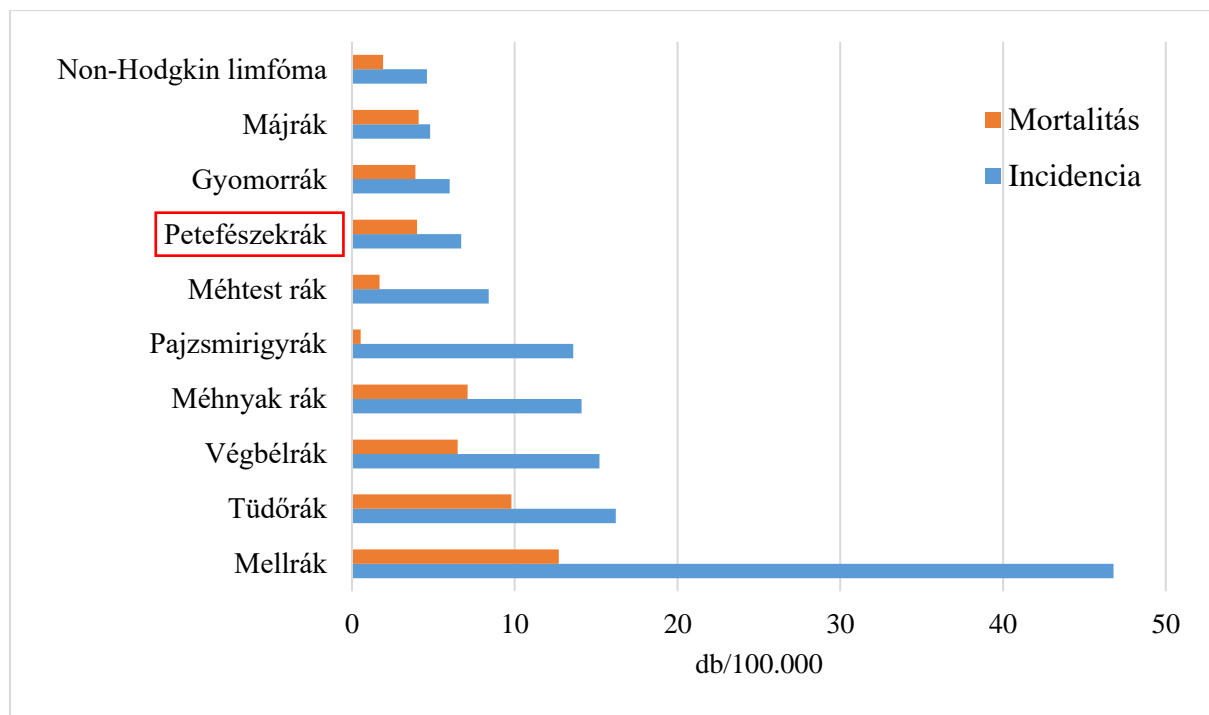
Számos kutatás zajlik jelenleg is miRNS alapú terápiás stratégiák kidolgozásával kapcsolatban, melyek közül már több a klinikai fázisban tart. A miR-122, miR-34, miR-16, miR-155 és miR-10b a legaktívabban kutatott miRNS-ek közé sorolhatóak. Az LNA-antagomiR-122, vagy más néven Miravirsén a hepatitisz C vírus infekció ígéretes terápiás opciója. A Miravirsén egy módosított 15 nukleotidos oligonukleotid, ami a miR-122 hatását gátolja. A SantarisPharma cég által végzett kutatások biztonságosnak és hatásosnak bizonyultak, így a 2. klinikai fázis is lezártnak tekinthető (Ho és mtsai, 2022; Menon és mtsai, 2022). Az MRX34, a miRNA Therapeutics Inc. által gyártott duplaszálú, liposzómális miR-34a mimik molekula (8. ábra). A miR-34a a legtöbb daganatban repressziót mutató tumorszupresszor funkciójú miRNS. Az 1-es klinikai fázis biztató eredményei után, sajnos a 2. fázis 2016-ban felfüggesztésre került súlyos immunreakció miatt (Hong és mtsai, 2020; Menon és mtsai, 2022). A miR-16 szintén egy fontos tumorszupresszor molekula, amely expressziójának csökkenése számos daganat típusban megfigyelhető. A miR-16 szint miRNS mimikkal történő növelése csökkentette a pleurális mesothelioma tumorsejtek proliferációját (8. ábra) (van Zandwijk és mtsai, 2017). 2014-ben az EnGeneIC vállalat kifejlesztette a MesomiR-1-et, ami a miR-16 miRNS pótlását célozza mesotheliomában és tüdődaganatban szenvedő betegek terápiájában. A szer intravénás adagolása során az 1-es klinikai fázisban jó eredményeket mutatott, így a 2-es fázis előkészületei is kezdetét vehették (Menon és mtsai, 2022). A MiRagen Therapeutics vállalat 2016-ban kifejlesztette a miR-155 gátlót, a Cobomarsen-t (MRG-106), mivel a miR-155 jelenléte limfóma sejtekben a tumorsejtek növekedésével és túlélésével hozható párhuzamba. A Cobomarsen alkalmazása biztonságosnak és jól tolerálhatónak bizonyult cutan T sejt limfóma, krónikus limfoid leukémia, diffúz B sejt limfóma és felnőttkori T sejt leukémia kezelésében. A 2018-ban folytatódott 2-es klinikai fázisban szintén jó eredményeket értek el, azonban 2020-ban üzleti megfontolásra hivatkozva felfüggesztették a további kísérleteket (Menon és mtsai, 2022; Witten és Slack, 2020). Ezenfelül a TransCode Therapeutics Inc. kifejlesztette az anti-miR-10b nanopartikulum formulázott TTX-MC138 készítményt emlődaganat kezelésére, mivel a miR-10b számos

daganat esetében központi szerepet tölt be az invázió és a metasztázis képzés szabályozásában. Ezenkívül 2019-ben egy új, miR-10b ellenes oligonukleotid, a RGLS5579 is kifejlesztésre került a glioblasztóma kezelésében. Mindkét említett terápiás szer esetében jelenleg a klinikai vizsgálatok elkezdéséhez szükséges előkísérletek zajlanak (Ghosh és mtsai, 2018; Menon és mtsai, 2022). Érdeemes továbbá megemlíteni, hogy a miRNS-ek kemoterápiás vagy radioterápiás kezelésekkel való kombinációja további lehetőségeket nyújthat a személyre szabottabb daganat terápia kifejlesztésében (Ho és mtsai, 2022; Menon és mtsai, 2022).

3.4. Petefészekrák

3.4.1. A petefészekrák előfordulása, hajlamosító tényezők

A petefészekrák a legnagyobb halálozással és a legrosszabb túlélési statisztikákkal rendelkező nőgyógyászati rendellenesség. A GLOBOCAN (Global Cancer Observatory) adatbázis (<https://gco.iarc.who.int>) 2024.02.28-ai adatai alapján a petefészekrák a 7. leggyakoribb daganatos megbetegedésre visszavezethető halálozási ok a nők körében (Sung és mtsai, 2021).



9. ábra. A nők körében világszerte előforduló leggyakoribb daganatos megbetegedések incidencia és moratlitás értékei. Az ábra a Globocan 2022 (1.1 verzió) adatbázis 2024.02.08.-ai adatai alapján készült <https://gco.iarc.who.int>.

2022-ben az újonnan diagnosztizált petefészekrákos esetek száma 324.603-nak adódott, valamint 206.956 nő haláláért volt felelős a betegség világszerte (9. ábra). Ezen számok jelzik

a betegség igen rossz túlélési arányát, ami 5 éves intervallumot tekintve csupán 47,7 % (Stewart és mtsai, 2019). Amint az a 9. ábráról is látszik a nők körében az emlőrák a leggyakrabban diagnosztizált daganatos megbetegedés, ami azonban a petefészekráknál lényegesen jobb túlélési statisztikákkal rendelkezik - az 5 éves túlélési aránya elérheti a 89 %-ot (Rojas és Stuckey, 2016).

A petefészekrák geográfiai eloszlását illetően, a legmagasabb előfordulás a világ fejlődő régióiban jellemző, mint Közép- és Kelet Afrika, az Indonéz szigetvilág, és India, de magas gyakoriság jellemző a Közép- és Észak Európai országokban is. Magyarországot tekintve a GLOBOCAN adatbázis alapján a 2022-es évben 1.012 új petefészekrákos eset került felismerésre, valamint 702 nő halálának az okaként jelölték meg ezt a betegséget (<https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/348-hungary-fact-sheet.pdf>). A legrosszabb halálozási statisztikák Grúziából, Irakból, Litvániából, Malajziából és Bahreintől származnak. Az etnikai hovatartozás tekintetében a fehér népcsoportban a legmagasabb, míg a fekete és az ázsiai nők körében a legalacsonyabb a betegség előfordulása (Siegel és mtsai, 2020; Reid és mtsai, 2017; Sung és mtsai, 2021 forrás: WHO; gco.iarc.fr).

A betegség kialakulására több tényező is hatást gyakorol. Régi megfigyelés, hogy a multiparitás csökkenti ezen malignitás megjelenésének kockázatát, míg a nulliparitás fokozza azt (Matulonis és mtsai, 2016). Ezt az ún. ovulációs, ill. a retrográd menstruációs hipotézisekkel magyarázzák. Az ovulációs hipotézis szerint egy nő termékeny időszakában lezajlott ovulációk számával egyenes arányban emelkedik a petefészekrák kialakulásának az esélye. Ezért a szünetelő ovulációk miatt, a kihordott várandósság(ok) 50 %-kal, míg a szoptatási periódusban eltöltött minden 5 hónap további 8 %-kal képes csökkenteni a betegség kockázatát (La Vecchia, 2017). Feltételezhetően ezzel magyarázható az ovulációt gátló orális fogamzásgátlók petefészekrák kialakulására gyakorolt preventív hatása is, melyek használatának az idejével arányosan, minden 5 év használat után ~20 %-kal csökken a petefészekrák kialakulásának az esélye (La Vecchia, 2017; Matulonis és mtsai, 2016; Reid és mtsai, 2017). Az ovuláció ilyen hangsúlyos szerepe azzal hozható összefüggésbe, hogy az ovuláció során a petefészek felszíni epitéliuma sérülést szenved. Az évek során ezen hámsérülések megnövelik az esélyét a mutációk kialakulásának (La Vecchia, 2017). Ezenkívül a hámsérülések regenerációja közben gyulladási mediátorok és ROS felhalmozódása is történik, melyek DNS lánc töréseket és bázis oxidációt okozhatnak, melyek szintén hozzájárulhatnak a karcinogenezishez (Xu és mtsai, 2018). A retrográd menstruációs hipotézis szerint a menstruáció során a méhfalról leváló endometrium szövetdarabkái a menstruációs vérrel együtt retrográd módon képesek a petevezetéken át a kismedencébe áramlani. Ezek megtapadását követően endometriózis

alakulhat ki (Bulun és mtsai, 2019; Stewart és mtsai, 2019). Abban az esetben, ha ezek az endometrioid szövetdarabok egy ovárium cisztában telepednek meg, endometrióma képződhet. Emellett a retrográd irányba áramló menstruációs vér miatt a peritóneális térben felgyülemelő vörösvérsejtek bomlásából felszabaduló vas, ROS és reaktív nitrogén gyök képződést indít el, ami oxidatív stressz kialakulásához vezet, mely végső soron kedvez a daganatképződésnek (Savant és mtsai, 2018). A medence egyéb, az endometriumot, petefészkeket, vagy petevezetékét érintő gyulladásos megbetegedései szintén hajlamosíthatnak a petefészkekrák kialakulására - különösen a borderline/átmeneti típusokra (Reid és mtsai, 2017).

Fontos tényező továbbá az életvitel. A fizikailag aktív életmód és a gyümölcsökben, zöldségekben, teljes kiőrlésű gabonákból származó elemi rostokban gazdag étrend fordított, míg, a szénhidrátban, zsírokban és magas glikémiás indexsel rendelkező élelmiszerekben gazdag étrend egyenes arányosságban áll a petefészkekrák kialakulásának rizikójával (Biller és mtsai, 2021; La Vecchia, 2017; Matulonis és mtsai, 2016; Reid és mtsai, 2017; Stewart és mtsai, 2019). Azonban a D-vitamin bevitel is meghatározó a daganatsejtek proliferációját gátló, valamint apoptózist indukáló hatásának köszönhetően (Reid és mtsai, 2017). Mindemellett az elhízás is jelentősen növeli a petefészkekrák, valamint más hormon-függő daganatok (pl. endometrium-, mell daganat) kialakulásának az esélyét, ami különösen a posztmenopauzában lévő, túlsúlyos betegek esetén szembetűnő (La Vecchia, 2017; Matulonis és mtsai, 2016; Reid és mtsai, 2017; Stewart és mtsai, 2019). Emellett a posztmenopauza tüneteinek kezelésére alkalmazott HRT legalább 5 éven át tartó alkalmazása 50 %-os esély gyarapodást jelent a petefészkekrák kialakulására (La Vecchia, 2017).

Érdeemes megemlíteni továbbá, hogy számos mutációról ismert, hogy befolyásolja a petefészkekrák kialakulásának esélyét. A legismertebbek a *BRCA1* és *BRCA2* (breast cancer antigen 1/2) tumorszupresszor géneket érintő mutációk, melyek 40-60 %, ill. 11-27 % -al emelik a betegség előfordulásának kockázatát (Lhereux és mtsai, 2019). A petefészkekrákos betegek több mint 17 %-ában legalább az egyik *BRCA* gén mutációja megfigyelhető (Matulonis és mtsai, 2016). A *BRCA1/2* gének központi szerepet töltenek be a DNS kettős lánc-törését követő homológ rekombinációs repair (HRR) helyreállító folyamataiban, így ezen gének mutációi fokozhatják a genom instabilitását. A HRR mellett a *BRCA1/2* gének szerepet játszanak még tk. a centroszóma rendeződésében, a kromoszómák szegregációjában és a citokinézis folyamataiban is (Yoshida, 2021). A *BRCA1/2* gének mutációja növelheti más daganatos megbetegedések, mint pl. a mell-, hasnyálmirigy-, prosztatatarák és a melanoma előfordulását is (Matulonis és mtsai, 2016).

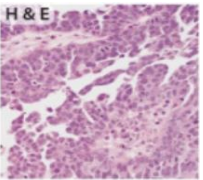
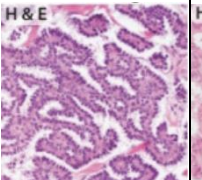
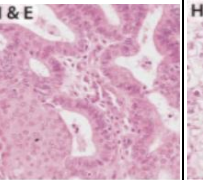
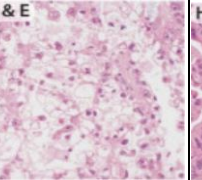
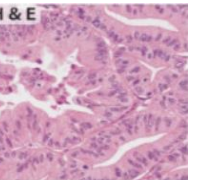
Egyéb örökletes génmutációk is hozzájárulhatnak a petefészekrák kialakulásához, mint pl. a *PALB2*, *ATM*, *RAD51C/D*, *BRIP1* vagy a *TP53* (Matulonis és mtsai, 2016; Samuel és mtsai, 2022). A p53 tumorszupresszor fehérjének fontos szerepe van a DNS hibajavító mechanizmusok, a sejtosztódás, a sejt hemosztázis, az immunválasz, a sejtmetabolizmus és a normál sejtöregedés folyamatainak a fenntartásában (Gargallo és mtsai, 2020). Nem meglepő tehát, hogy a humán daganatok több mint 50 %-ában azonosítható a *TP53* gén mutációja. A Li-Fraumeni szindróma egy ritka, a *TP53* gén autoszómális domináns módon öröklődő mutációja miatt kialakuló betegség, ami számos daganat (pl. lágyszöveti sarcoma, osteosarcoma, mell-daganat, agydaganat, petefészek daganat) kialakulására hajlamosít (Gargallo és mtsai, 2020). Ezen betegek körében valamely daganatos megbetegedés megjelenésének az esélye 30 éves kor előtt 50 %, míg 70 éves kor elérésekor közel 100 %-ra becsülhető (Gargallo és mtsai, 2020). Meg kell említeni továbbá a Lynch szindrómát, mint örökletes rendellenességet, ami a DNS mismatch repair (MMR) folyamatában részt vevő gének (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2*, *MSH6*) különböző mértékű mutációin alapszik. A Lynch szindróma nemcsak a petefészekrák kialakulására mutat emelkedett kockázatot, hanem a végbél-, endometrium-, húgyúti-, gyomor, vékonybél- és epevezeték daganatok megjelenésére is. A Lynch szindrómához köthető petefészek daganatok átlagosan a 48. életkor környékén jelentkeznek, ami az átlag populációban átlagosan 68 év körül mozog (Matulonis és mtsai, 2016).

3.4.2. A petefészekrák szövettani besorolása

A benignus és malignus ovárium tumorok szinte mindegyike három sejttípus egyikéből eredeztethető, ezek az epiteliális-, sztróma- és a csíra sejtek. Az epiteliális eredetű daganatok a leggyakoribbak, az összes eset 95 %-áért felelősek (Lhereux és mtsai, 2019). Az epiteliális ovárium daganatok 5 alcsoportba sorolhatóak, melyek az endometrioid (~10 %), világos sejt (~5-10 %), mucinózus (~2-3 %) és a szerózus daganatok (~70-80 %). A szerózus epiteliális petefészek daganatok további 2 alcsoportja: a magas grádusú szerózus karcinómák (HGSC, ~70-80 %) és az alacsony grádusú szerózus karcinómák (LGSC, <5 %) (Reid és mtsai, 2017; Stewart és mtsai, 2019) (1. táblázat). Az epiteliális ovárium karcinómák malignitásuk alapján I-es és II-es típusú tumorokra oszthatóak. Az I-es típusú tumorokhoz tartoznak a LGSC, a mucinózus, az endometrioid és a világossejt karcinómák. Ezen tumortípusok leggyakrabban korai stádiumban kerülnek felismerésre és lassabb ütemben növekednek, éppen ezért jobb prognózisúak. Ezzel szemben a II-es típusba tartozó HGSC gyors lefolyású, agresszív tumor, amely leggyakrabban a petevezeték hámból származtatható. A II-es típusú daganatok

jellemzően későn, előrehaladott stádiumban kerülnek felismerésre és gyakran hordoznak *BRCA* vagy *TP53* mutációt (Kroeger és Drapkin, 2017; Stewart és mtsai, 2019) (1. táblázat).

1. táblázat. Az epitheliális petefészek daganatok genetikai, hisztológiai és patofiziológiai jellemzése. HE: hematoxilin-eozin (Kossai és mtsai, 2018; Köbel és Kang, 2022; Lheureux és mtsai, 2019)

	Epitheliális petefészek daganatok				
	HGSC	LGSC	endometrioid	világos sejtes	mucinózus
Hisztológiai megjelenés (HE festés)					
Előfordulás	70-80 %	<5 %	10 %	5-10 %	2-3 %
Mutációk	<i>TP53</i> , <i>BRCA1/2</i>	<i>KRAS</i> , <i>BRAF</i>	<i>ARIDIA</i> , <i>PTEN</i>	<i>ARIDIA</i> , <i>PIK3CA</i>	<i>KRAS</i> , <i>HER2</i>
Prognózis	rossz	közepes	kedvező	közepes	jó
Platina-alapú kemoterápia	érzékeny	relatív rezisztens	érzékeny	relatív rezisztens	relatív rezisztens
PARP inhibitorok	alkalmazható	-	nagy sikerrel alkalmazható	-	-
ER pozitivitás	80 %	87 %	76 %	19 %	20 %

A szerózus petefészekrák két alcsoportja a LGSC és a HGSC különböző molekuláris profillal, klinikai megjelenéssel és prognózissal rendelkeznek. Citogenetikai szempontból a LGSC minimális sejtmagi eltéréseket és gyenge osztódási hajlamot, a HGSC viszont jelentős nukleáris eltéréseket és magas mitotikus aktivitást mutat (Zamwar és Anjankar, 2022) (10. ábra). A LGSC gyakran fiatal(abb) korban kerül diagnosztizálásra és jobb prognózissal társul. A LGSC legtöbbször a petefészek epitheliájából eredeztethető, a HGSC viszont jellemzően a petevezetékekből. A HGSC az esetek 85 %-ban kései stádiumban kerül felismerésre, ami miatt a betegség prognózisa is sokkal kedvezőtlenebb. Statisztikák alapján a HGSC-val diagnosztizált betegek 70 %-a 10 éven belül belehal a betegségbe (Kossai és mtsai, 2018; Stewart és mtsai, 2019) (1. táblázat).

Az endometrioid karcinóma az összes petefészek daganatos eset kb. 10 %-át teszi ki. A betegség várható prognózisa jó, ami annak köszönhető, hogy legtöbbször a korai 1-es vagy 2-es stádiumban kerül felismerésre, valamint jól reagál a terápiára. Az endometrioid tumorok kialakulása összefüggésbe hozható az endometriózis fennállásával – a betegek 25-80 %-ának az anamnézisében szerepel az endometriózis. Továbbá az endometrioid karcinóma gyakran társul Lynch szindrómához (Chen és mtsai, 2021; Kossai és mtsai, 2018; Stewart és mtsai, 2019) (1. táblázat).

A világos sejtes karcinóma előfordulási gyakorisága és az endometriózisra való visszavezethetősége tekintetében hasonlít az endometrioid típushoz. Jellemzően fiatal korban kerül felismerésre és ritka a kétoldali ovárium érintettség. A tumor gyakran társul tromboembóliás szövődémmel és hypercalcemia-val. Képes nagy medencei tömeget és nyirokcsomó áttéteket képezni (Kossai és mtsai, 2018) (1. táblázat).

A mucinózus karcinóma az összes petefészek daganat mindössze 2-3 %-át teszi ki. A betegség legtöbbször a korai stádiumban kerül diagnosztizálásra, valamint kifejezetten jó túlélés jellemzi. Gyakran a gasztrointesztinális traktusból kiinduló metasztatikus eredetű és csak az egyik oldali petefészeket érinti (Stewart és mtsai, 2019) (1. táblázat).

A csírasejt eredetű petefészek daganatok nagyon ritkák, az összes eset csupán 3 %-át teszik ki. Jellemzőjük, hogy gyermek vagy fiatal felnőtt korban, 10 és 30 év között jelentkeznek. Ezért ezen típusnál kiemelten fontos a termékenység megőrzést szem előtt tartó terápiás terv kidolgozása (Stewart és mtsai, 2019).

A petefészek daganatok sztrómasejt eredetű típusa a legritkább, mindössze <2 %-ban diagnosztizálják. A petefészek daganatok ezen típusa átlagosan 50 éves korban jelentkeznek és csak ritkán rosszindulatúak. Ez a típus az afroamerikai nők között gyakoribb és a dohányzás fokozhatja a kialakulásának kockázatát (Stewart és mtsai, 2019).

Az ovárium tumorok stádiumok szerinti besorolása a FIGO (Nemzetközi Nőgyógyászati és Szülészeti Szövetség=International Federation of Gynecology and Obstetrics) rendszer szerint történik. Ez alapján a petefészekrák 4 stádiumát különböztetik meg (Gaona-Luviano és mtsai, 2020). Az I. stádium IA és IB alstádiumaiban csak az egyik vagy mindkét petefészek érintett, a tumor ekkor még nem terjedt ki a petefészek felszínére. Azonban az IC2 stádiumban már a petefészek felszínén, IC3 stádiumban pedig már a hasüregi folyadékban is megtalálhatóak a tumoros sejtek. II. stádiumban a méhre, a petevezetésekre (IIA stádium), valamint egyéb, hashártyán belül elhelyezkedő hasüregi szervre is áttért a primer daganat (IIB stádium). III. stádium esetén a retroperitoneális nyirokcsomók is érintettek lehetnek (IIIA stádium), ezenkívül a hashártyán túl, a medencén kívüli térben is megfigyelhetőek metasztázisok (IIIB/C stádium).

IV. stádiumban a tumoros sejtek megjelenhetnek a mellüregi folyadék gyülemében (IVA stádium), ill. távoli metasztázisok is képződhetnek pl. a májban vagy a lépben (IVB stádium). A petefészekrák stádiuma az idő előrehaladtával gyors ütemben változik (Gaona-Luviano és mtsai, 2020).

3.4.3. A petefészekrák diagnosztikája és kezelése

A petefészekrák klinikai megnyilvánulása a korai stádiumokban nem specifikus, ezért nehezen felismerhető a betegség. Gyakran csak kései stádiumban kerül diagnosztizálásra, innen ered a „csendes gyilkos” elnevezés. A legáltalánosabb, jellemzően a III. és IV. stádiumban jelentkező tünetek: a has teltségérzete, puffadás, émelygés, a hastérfogat megnagyobbodása, korai jóllakottságérzet, kimerültség, a bélműködés megváltozása, vizelési problémák, hátfájdalom, fájdalmas közösülés és súlycsökkenés. Ezekenkívül a hasüregben lévő nagytömegű daganat és az ezzel társuló hasüregi folyadékgyülem légzési nehézségeket is okozhat (Matulonis és mtsai, 2016; Zamwar és Anjankar, 2022).

A petefészekrák diagnosztikájának hagyományos módszere a fizikális- és radiográfias képalkotó vizsgálat (Matulonis és mtsai, 2016). A fizikális vizsgálattal egybekötött transzvaginális ultrasonográfia segítségével felismerhető az esetleges folyadék gyülem és /vagy térfoglalások, valamint megvizsgálható a petefészek mérete, lokalizációjuk, vaszkularizációjuk és struktúrájuk (Doubeni és mtsai, 2016; Zamwar és Anjankar, 2022). A mellkas, a medence és a hasüreg területein végezett CT (komputer tomográfia), MRI (mágneses rezonancia képalkotás) és PET-CT (pozitron emissziós tomográfia) vizsgálatok segíthetnek felmérni a hashártya érintettségét, valamint a tumor kiterjedését, ami a petefészekdaganat megerősítése mellett segíthet a stádium besorolásban is (Orr és Edwards, 2018; Zamwar és Anjankar, 2022).

A betegség előrehaladottságáról információt szolgáltathatnak a testfolyadékokban előforduló biomarkerek monitorozásán alapuló folyadék biopsziás eljárások is. Petefészekrák esetén a CA125 (cancer antigen 125), valamint a HE4 (humán mellékhere protein 4) biomarkerek mérése jellemző a klinikai gyakorlatban. A CA125 a Müllerián epitélium által szekretált glikoprotein. Szintje az epiteliális petefészekrákos esetek összességét nézve 80 %-ban emelkedett szintet mutat. Azonban az alkalmazhatóságát jelentősen limitáló tényező, hogy a betegség korai stádiumában alacsony szenzitivitású (50 %) (Aslan és mtsai, 2020; Doubeni és mtsai, 2016; Stewart és mtsai, 2019; Zamwar és Anjankar, 2022). Ezenkívül a CA125 emelkedett szintje mérhető egyéb állapotok fennállásakor is, mint pl. várandósság, endometriózis, posztmenopauza vagy a hashártya gyulladással megbetegedései esetén (Doubeni

és mtsai, 2016; Stewart és mtsai, 2019; Zamwar és Anjankar, 2022). De emelkedett CA125 szint figyelhető meg a mell-, a gyomor-, a hasnyálmirigy-, a máj-, és a vastagbél daganatos megbetegedései mellett is (Zhang és mtsai, 2022/a). A HE4, a mellékhere epitéliuma által termelt peptid proteáz inhibitor. A HE4 alapesetben nem található meg a petefészkek felszíni epitéliumán, ezt a molekulát csak a tumorossá vált petefészkek kezdi nagy mennyiségben szekretálni. A petefészekrák diagnosztikájában a HE4 specificitása 96 %, szenzitivitása pedig 67 %. Azonban emelkedett szintet mutathat endometriumrák, tüdő adenokarcinóma, és emlő adenokarcinóma esetén is. Továbbá a HE4 szint függ a menopauzális állapottól, valamint az életkortól (Zhang és mtsai, 2022/a). A CA125 és a HE4 markerek felhasználásával, valamint a menopauzális státusz figyelembevételével a ROMA (Risk of malignancy Algorithm) index került bevezetésre. Segítségével nagyobb bizonyossággal különíthető el a petefészekrák más, benignus vagy malignus elváltozásoktól (Aslan és mtsai, 2020; Dochez és mtsai, 2019). A ROMA index számításával 84,2 %-os szenzitivitás, valamint 75,3 %-os specificitás érhető el (Aslan és mtsai, 2020).

Érdeemes megemlíteni továbbá, hogy a testfolyadékokban jelenlévő szabad nukleinsavak ígéretes biomarkerek jelölteknek tekinthetők jövőbeli diagnosztikai tesztek kidolgozásakor. Ide tartoznak a cirkuláló tumor DNS, mitokondriális DNS, valamint a cirkuláló nem-kódoló RNS molekulák, mint pl. a miRNS-ek, a hosszú nem-kódoló RNS-ek, vagy a cirkuláris RNS-ek. A szabad tumor DNS mennyiségének meghatározása a betegség stádiumáról, míg szekvenciájának ismerete a tumorban jelenlévő mutációkról adhat információt, de az epigenetikai módosítások (pl. metilációs mintázat) vizsgálata is segíthet a tumor lokalizálásában. A nem kódoló RNS molekulák monitorozása szintén segítheti a pontosabb diagnózis felállítását a tumor lokalizálásán, a betegség előrehaladottságán vagy a stádium meghatározásán keresztül. Emellett vizsgálatuk segíti a betegség nyomon követését (pl. a betegség újbóli megjelenésének gyors diagnózisát) és a terápiára adott válasz monitorozását (pl. rezisztencia kialakulásának kimutatása) (Deb és mtsai, 2018, Szilágyi és mtsai, 2020).

A daganat felismerését követően a sebészi úton való eltávolítás a terápia alappilléret képezi. A betegség előrehaladottságától függően ekkor megtörténhet a petefész(k)ek mellett a méh és a petevezetékek eltávolítása is. Ezt követően sor kerül a daganatosnak ítélt szövet szövettani vizsgálatára, ami megerősíti a diagnózist (Lheureux és mtsai, 2019; Orr és Edwards, 2018). Az elsővonalbeli kemoterápiás kezelés a platina alapú szerek (ciszplatin, karboplatin) és a taxán származékok (docetaxel, paclitaxel) együttes alkalmazásán alapul. Ez leggyakrabban a karboplatin és a paclitaxel párosítása. A ciszplatin a copper1 transzporterrel keresztül bejut a daganatsejtekbe, ahol a platina csoport hozzákötődik a DNS-hez, intra- és intermolekuláris

keresztkötéseket létrehozva, leggyakrabban az N7-es pozíciójú guaninon keresztül. A DNS szerkezetének megváltozása DNS károsodással jár együtt, ami megakadályozza a sejtosztódást, így apoptózist indukál a gyorsan osztódó sejtekben (Zhang és mtsai, 2022/b). Azonban a ciszplatin hosszú távú alkalmazása súlyos mellékhatásokkal járhat (pl. vese-, ideg-, fül-, és csontvelő károsodás). A karboplatin jobban tolerálható, mivel nem jellemző rá olyan súlyos szisztémás toxicitás (Zhang és mtsai, 2022/b).

A taxán származékokat (paclitaxel, docetaxel) platina alapú szerekkel együtt, kombinációs terápia részeként, vagy monoterápiás szerként is alkalmazhatják. A paclitaxel (Taxol®) hatásmechanizmusa abban áll, hogy hiperstabilizálja a sejtek mikrotubulus hálózatát azáltal, hogy hozzákötődik a mikrotubulus molekulák β -tubulin alegységéhez, meggátolva annak polimerizációját, ezáltal a sejtosztódás folyamatát (Abu Samaan és mtsai, 2019). A paclitaxel alkalmazhatóságát szintén számos, igen súlyos mellékhatás megjelenése korlátozza (pl. hyperszenzitivitási reakció, perifériás neuropátia) (Abu Samaan és mtsai, 2019).

A *BRCA1/2* mutációkat hordozó tumorok esetén alkalmazhatóak a poli ADP-ribóz polimeráz (PARP) inhibitorok. A *BRCA1/2* mutáció következtében ugyanis a DNS hibajavítása közben homológ rekombinációs deficiencia lép fel. Ha ezeket a sejteket PARP – mely enzimek a DNS hibajavításában vesznek részt - inhibitorokkal kezeljük, akkor a tumorsejtek nem képesek a DNS károsodások javítására, ami a tumorsejt halálához vezet. Hasonló daganatellenes hatás várható még az *ATM*, *ATR*, *RAD51* génmutációk megléte esetén is. A PARP inhibitor készítmények közé tartozik az olaparib, niraparib, valiparib, talazoparib és a rucaparib (Cortez és mtsai, 2018).

A bevacicumab (Avastin®) hatását az angiogenezis gátlásán keresztül fejt ki, azáltal, hogy megakadályozza a VEGF-A VEGFR-hez való kötődését (Cortez és mtsai, 2018; Garcia és mtsai, 2020; Lheureux és mtsai, 2019). A VEGF-A a szolid tumorok vérellátásának fokozásával a tumor növekedésének kedvez, valamint immunszupresszor hatása is ismert, ugyanis gátolja a vérésejtképződést, a dendritikus sejtek és a T-sejtek funkcióját, valamint aktiválja az immunszupresszor hatású regulátor T-sejtek működését (Garcia és mtsai, 2020).

Az endokrin terápia alkalmazása a hormonfüggő daganattípusok terápiájában jellemző (Langdon és mtsai, 2017). Ide tartozik a tamoxifen, ami egy szelektív ösztrogén receptor modulátor (SERM), valamint a fulvestrant, ami egy szelektív ösztrogén receptor downregulátor (SERD) (Paleari és DeCensi, 2018). Mivel az epiteliális petefészek daganatok jelentős hányada expresszál ER-okat (1. táblázat), ezek az ER pozitív mellrákhoz hasonlóan, a petefészekrák kezelésében is alkalmazhatóak (Langdon és mtsai, 2017). Az ER α jelenléte erős asszociációt mutat az endokrin terápiára mutatott érzékenységgel. Az ER β szerepe azonban ennél

komplexebb. Ugyanis ezen receptor emelkedett expressziója figyelhető meg az egészséges petefészek epitéliumban, azonban a daganatos és metasztatikus daganatokban csökkent szintje jellemző (Langdon és mtsai, 2017). A hormonszenzitív petefészekrákban szenvedő betegek kiegészítő terápiás opciója továbbá az ösztrogén szintézis gátlása, ugyanis a petefészek daganatok 33-81 %-a expresszálja az aromatáz enzimet. Az aromatáz inhibitorok (letrozole, anastrozole, exemestane) megakadályozzák az androgének ösztrogénné történő átalakulását az aromatizáció lépésén keresztül (Langdon és mtsai, 2017; Paleari és DeCensi, 2018).

Petefészekrák esetén a magas halálozási arány a kései felismerhetőség mellett a kezeléssel szemben gyakran megjelenő rezisztenciára vezethető vissza. Az előrehaladott stádiumban lévő petefészek daganatok > 80 %-a jellemzően újból kiújul. Ezeket platina-szenzitív és platina-rezisztens csoportokba sorolhatjuk (Matulonis és mtsai, 2016). A platina-szenzitív daganatok 50 %-a reagál az újbóli platina kezelésekre, ami lehet paclitaxel és karboplatin, karboplatin és pegilált liposzómába csomagolt doxorubicin, vagy karboplatin és gemcitabin párosítása (Matulonis és mtsai, 2016). A platina-rezisztens rekurrens petefészek daganatok kezelésére elsősorban a bevacizumab alkalmazandó, amit paclitaxel, pegilált liposzómába csomagolt doxorubicin vagy topotekán adagolásával egészítenek ki (Matulonis és mtsai, 2016).

4. Célkitűzések

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

Ennek érdekében az alábbi vizsgálatokat végeztük el:

- Alacsony dózisu E2, ZEA és BPA kezelések által kiváltott transzkriptomikai változások összehasonlító vizsgálatát RNS szekvenálás segítségével. Ez magában foglalta a mRNS és miRNS expresszióban megmutató változások monitorozását, valamint az eredmények részletes bioinformatikai elemzését. Vizsgálatainkat a korábban alkalmazott PEO1 (ER α +) sejtvonalon végeztük.
- Magas dózisu E2, ZEA, ill. BPA kezelések ovárium sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatát. Monitoroztuk a sejtek fenotípusos válaszát (életképesség, apoptózis, sejtlízis), valamint néhány kulcsgén expresszióját. Ezen hatásokat a PEO1 (ER α +) és az A2780 (ER α -) sejtvonalakon végeztük el.
- A miR-30 családba tartozó miRNS-ek szerepének vizsgálatát az ovárium sejtek ösztrogén válaszában. Ekkor monitoroztuk expressziójukat ösztrogén kezelés hatására a PEO1 és A2780 sejtvonalakban, majd a miR-30d-5p szerepét részletesebben is megvizsgáltuk az ovárium sejtek életképességére, ill. az ösztrogén jelátvitelre gyakorolt hatásának vonatkozásában.

5. Anyag és módszer

5.1. Sejttenyésztés

Kísérleteink kivitelezéséhez két humán epiteliális ovárium sejtvonalat alkalmaztunk. A PEO1 sejtvonalat (Merck KGaA), ami korábbi eredmények alapján magasan expresszálja az ER α -t, és az ösztrogén kezelés a proliferáció és a migráció fokozódását idézte elő (Andersen és mtsai, 2017; Márton és mtsai, 2020). Ezen kívül az A2780 sejtvonalat, melyet Kormosné Dr. Goda Katalin bocsátott a rendelkezésünkre (Biofizikai és Sejtbiológiai Tanszék, Debreceni Egyetem). Ebben a sejtvonaltban az ER α expresszió nem volt detektálható, mellyel összefüggésben az ösztrogén kezelés nem volt hatással a proliferációs, ill. migrációs képességére (Pinton és mtsai, 2018; Márton és mtsai, 2020).

A sejtvonalak fenntartását RPMI1640 médiumban (Corning) végeztük, melyet a PEO1 sejtvonalt esetén 10 %, az A2780 sejtvonalt esetén 5 % FBS (magzati szarvasmarha szérum) (Corning), 1 % L-glutamin (Corning), 100 μ g/mL streptomycin (Corning), valamint 100 U/mL penicillin (Corning) hozzáadásával egészítettünk ki. A sejtvonalak növekedéséhez az optimális körülményeket 37 °C-os termosztátban, 90 %-os páratartalom, valamint 5 % CO₂ koncentráció mellett biztosítottuk. Az ösztrogén molekulákkal végzett kísérletek kivitelezésekor a sejteket a kísérleti elrendezéstől függően 96- vagy 24 lyukú platekre tapasztottuk le. A két sejtvonalt eltérő duplázódási ideje miatt (A2780: 16 h; PEO1: 37 h) az A2780 sejtvonalt 5.000, ill. 50.000, míg a PEO1 sejtvonalt 10.000, ill. 100.000-es sejtszámban tapasztottuk. Ezt 24 h inkubáció követte 10 % (PEO1), vagy 5 % (A2780) FBS-el és 1 % L-glutaminnal kiegészített RPMI1640 médiumban. A kísérlet második napján a sejteket előmelegített PBS-el (foszfáttal pufferelt sóoldat) mostuk, majd lecseréltük a médiumot 5 % DCC (dextran coated charcoal) -FBS-el (Corning) kiegészített PRF (fenol red mentes) -RPMI1640 (Corning) médiumra, amit szintén 24 h inkubáció követett. Erre a sejttenyésztő médiumban esetlegesen jelenlévő ösztrogének, valamint a fenol red zavaró hatásának a kiküszöbölése érdekében volt szükség. Az inkubációs idő letelte után elvégeztük a sejtek E2-vel (Merck), ZEA-val (Merck), ill. BPA-val (Merck) való kezelését 10 nM, 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M és 100 μ M végkoncentrációban. Egyes kísérletek alakalmával a sejteket 10 nM MPP (methyl-piperidino-pyrazole; Merck), 100 nM AZD8835 (Merck), és 1 μ M tamoxifen (Merck), kezeléseknél is kitettük. A kezeléseket követően a sejteket a kísérleti elrendezéstől függően tovább inkubáltuk (24 h-48 h). A kezeléseknél hatását minden esetben kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítva határoztuk meg. A kontrollok ugyanazon körülmények között voltak tenyésztve, mint a kezelt minták (tehát ugyanolyan sejtszámmal voltak tapasztva, és ugyanúgy sor került a mosási

lépésekre, ill. a médiumcserékre), azonban a kezelés pillanatában a vizsgált molekulák helyett ugyanolyan térfogatú üres oldószert (DMSO) adtunk hozzájuk.

5.2. Életképesség vizsgálata

Az életképesség mértékét MTT assay segítségével detektáltuk. A sejtek tapaszttását és kezelését 96 lyukú platen végeztük az *5.1 Sejttenyésztés* fejezetben leírtak szerint. A mérés alkalmával 90 µl tenyésztő médiumhoz 10 µl MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -2,5-Diphenyltetrazolium Bromide; Merck; 5 mg/mL PBS-ben feloldva) oldatot adtunk, majd ebben a médiumban inkubáltuk a sejteket (2-4 h, 37 °C). Ezután eltávolítottuk a felülúszót és a keletkezett formazán kristályokat 100 µl szolubilizáló oldatban (81 v/v% 2-propanol, 9 v/v% 1 M HCl, 10 v/v% Triton-X 100; Merck) oldottuk fel. Az abszorbanciát Multiskan sky mikroplate reader (Thermo Fisher Scientific) segítségével 567 nm hullámhosszon detektáltuk. A sejtek életképességében bekövetkezett változásokat legalább 4 független mérés eredményei alapján, a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítva határoztuk meg.

5.3. Apoptózis vizsgálata

Az apoptózis meghatározását DiIC₁(5) Assay (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük, mely módszer a mitokondriális membránpotenciál mérésén alapszik (Markovics és mtsai, 2019). Ekkor a sejteket 96 lyukú platen tapaszttottuk, majd a médiumcserét és a kezeléseket az *5.1 Sejttenyésztés* fejezetben leírtak alapján hajtottuk végre. A kezeléseket 24 vagy 48 h-t követően a sejtekről eltávolítottuk a tenyész médiumot, majd 50 µl, 50 nM végkoncentrációjú DiIC oldatot (1,1',3,3',3'-hexamethylindodicarbo - cyanine iodide) mértünk rájuk, amit 30 percig 37 °C-on történő inkubáció követett. Az inkubációs idő letelte után a DiIC oldatot eltávolítottuk, a sejteket 2 x 50 µl PBS-el mostuk, majd 50 µl 5 % DCC-FBS PRF-RPMI1640 médiumot mértünk a sejtekre. A fluoreszcens jelet CLARIOstar Plus mikroplate reader készüléken (BMG Labtech) mértük 630 nm gerjesztési és 670 nm emissziós hullámhosszokon. A kezelésekre hatására megfigyelhető apoptózis mértékét legalább 4 független mérés eredményei alapján, a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítva határoztuk meg.

5.4. Sejtlyis vizsgálata

A sejtlyis jelenlétének detektálása a sejttenyészetek felülúszójában mérhető LDH (laktát dehidrogenáz) aktivitás mérésén alapuló CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével történt. A mérés kivitelezéséhez a sejteket 96 lyukú platen tapaszttottuk, a médiumcserét és a kezeléseket az *5.1 Sejttenyésztés* fejezetben leírtak szerint

végeztük el. A kezeléseket 48 h-val követően 50 µl felülúszót pipettáztunk egy új 96 lyukú plate welljeibe, amibe további 50 µl Reaction Mixture oldatot mértünk. 30 perces szobahőmérsékleten (RT) végzett inkubáció után, a reakció leállításához 50 µl Stop solution oldatot adtunk a mintákhoz. A kolorimetriás reakció abszorbanciáját Multiskan sky microplate reader (Thermo Fisher Scientific) segítségével 490 nm gerjesztés és 680 nm emissziós hullámhosszon detektáltuk. A sejtlízis mértékét legalább 4 független mérés eredményei alapján, a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítva határoztuk meg.

5.5. mRNS izolálás és kvantifikáció

A génexpresszió vizsgálatokor a sejteket 24 lyukú plate-re tapasztottuk. A médiumcsere és a kezelések kivitelezése az *5.1 Sejttenyésztés* fejezetben leírtak alapján történt. A kezeléseket 24 és 48 h-t követően totál RNS-t izoláltunk a Quick-RNA MiniPrep Kit (Zymo Research) segítségével, a gyártó által mellékelte protokoll utasításai alapján. Első lépésként eltávolítottuk a médiumot, majd 200 µl előmelegített PBS-el mostuk a sejteket. Ezután 300 µl RNA Lysis puffert pipettáztunk minden well-be és egy steril sejtkaparó segítségével leválasztottuk a sejteket a plate aljáról. Az így kapott sejtszuszpenziót egy steril eppendorf csőbe pipettáztuk, majd 5 percig inkubáltuk (RT), melyet követően lecentrifugáltuk (2 perc, 10.000 g, RT). Ezután a minta felülúszóját a Spin-Away Filter oszlopra pipettáztuk, majd lecentrifugáltuk (1 perc, 10.000 g, RT). Az átfolyóhoz ezután 1 térfogatrésnyi (kb. 300 µl), 100 %-os etanolt adtunk, majd a minta teljes mennyiségét felvittük a Zymo-Spin III CG oszlopra, és lecentrifugáltuk (30 másodperc, 10.000 g, RT). Az oszlopokat 400 µl RNA Wash buffer-rel mostuk, majd lecentrifugáltuk (30 másodperc, 10.000 g, RT). A kontamináló DNS molekulák degradációjához DNáz kezelést alkalmaztunk (5 µl DNase I + 75 µl DNA Digestion Buffer; 15 perc, RT). Az oszlopokra ezután 400 µl RNA Prep Buffer-t mértünk, majd lecentrifugáltuk (30 másodperc, 10.000 g, RT). Ezután a minta mosási lépései következtek 700 µl RNA Wash Buffer (30 másodperc, 10.000 g, RT), majd 400 µl RNA Wash Buffer (2 perc, 10.000 g, RT) alkalmazásával. Az RNS minta elúciójához 20 µl RNáz-mentes vizet mértünk a membránra (5 perc, RT). Ezután az oszlopokat lecentrifugáltuk (1 perc, teljes sebesség, RT). A tisztított RNS koncentrációját NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) készüléken mértük le, majd felhasználásig -80 °C –on tároltuk.

Az izolált mRNS molekulákról a cDNS (komplementer DNS) átíratot Maxima first strand cDNA Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztük, a gyártó által biztosított protokollt követve.

A cDNS szintézis első lépéseként DNáz kezelést végeztünk. Ehhez az alábbi komponensekből álló reakcióelegyet állítottunk össze:

- 1 µl dsDNase
- 1 µl 10x dsDNase Buffer
- x µl RNS (500 ng)
- y µl nukleáz mentes víz

A reakcióelegyet 2 percig 37 °C-on inkubáltunk, majd a reakció leállítása céljából jégre helyeztük a mintákat.

A cDNS szintézishez a reakcióelegyet az alábbi komponensekkel egészítettük ki:

- 4 µl 5x Reaction Mix
- 2 µl Maxima Enzyme Mix
- 4 µl nukleáz mentes víz

Végtérfogat: 20 µl

A reakció az alábbi lépésekből állt:

- 25 °C 10 perc
- 50 °C 15 perc
- 85 °C 5 perc

A cDNS koncentrációját NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) készüléken mértük le, majd felhasználásig -80°C –on tároltuk.

A génexpresszió vizsgálatához a Maxima SYBR Green qPCR (kvantitatív polimeráz lánreakció) Master Mix kitet használtuk (Thermo Fisher Scientific), a gyártó által biztosított protokollt követve. Az alkalmazott primerek szekvenciáit a 2. táblázat tartalmazza.

A qPCR reakcióelegy mintánként az alábbi komponensekből állt:

- 12,5 µl Maxima SYBR Green qPCR Master Mix
- 0,75 µl 10 µM-os Forward primer
- 0,75 µl 10 µM-os Reverse primer
- x µl cDNS (200 ng)
- y µl nukleáz-mentes víz

Végtérfogat: 25 µl

2. táblázat: Az egyes gének expressziójának qPCR-ral végzett vizsgálatához használt primerek szekvenciái.

	Forward	Reverse
<i>GREB1</i>	TCTTGCACAATTCCATCGAG	GTCCACTCGGCTACCACCT
<i>CA12</i>	GTTTCTCCTGACCAACAATGG	CGTGGCACTGTAGCGAGAC
<i>TP53</i>	ACACGCTTCCCTGGATTG	GCTCGACGCTAGGATCTGAC
<i>ATG2B</i>	GGAGTGTCTCTTCTGGGATG	AGGTGAGAGCTTTGGCTCAG
<i>ATG12</i>	TCTTCCGCTGCAGTTTCC	GGAGCAAAGGACTGATTCACA
<i>BAG3</i>	CCCCGTTCAAGGTCATCTGTC	AGGTGCAGTTTCTCGATGGG
<i>SOX4</i>	GACCTGAACCCCAGCTCAAA	AGCCGGGCTCGAAGTTAAAA
<i>ESR2</i>	TGTTAATGATGGGGCTGATGT	CTTCTACGCATTTCCCCTCA
<i>RBBP8NL</i>	CGCATCTTCATCCTCACCA	CCTCCTTCAAGGTCTCGTTCT
<i>BLNK</i>	AGAGAGCCCTGCTGACGA	CGAGTGCTCATCTGGATTTTC
<i>TGMI</i>	GGACTCAGTACTGCGGTTGC	TGGAGATGGCGTGGTAGG
<i>KRT4</i>	TTTGCCTCCTTCATCGACA	TCAAGGTTTTTGGCTGGAGGT
<i>BMF</i>	GAGACTCTCTCCTGGAGTCACC	CCTCTGGTTGGAACACATCA
<i>CD24</i>	ATGGGCAGAGCAATGGTG	CCAGTTGTTGTTTCACTGGAAT
<i>NOTCH3</i>	CTTCCTGCGATCAGGACATC	CACTCATCCACATCGCGGG
<i>GBP3</i>	CCAGCGATCCAGCGAAAGAA	GGGCCTGTCATGTGGATCTC
<i>MYC</i>	TGCTCCATGAGGAGACACC	CTTTTCCACAGAAACAACATCG
<i>EGR1</i>	AGCCCTACGAGCACCTGAC	GGTTTGGCTGGGGTAACTG
<i>NOLC1</i>	AAGACAGCAGTGATGAGTCTGATT	AGCTCTCTGCTGCTTTCTTTG
<i>RRP12</i>	ACCATCCGGCCCTACCTA	CCTGAGGACTGGCACACA
<i>MYBL1</i>	AGGATCGGGGAGAAGGAGCAT	TCGGCATACTGAAGGTCATCATC
<i>DEPTOR</i>	TCATGGCATCTGAATTCCTG	ATGGGTGCTTGTGGACAC
<i>AGT</i>	TGCCGTTGTTCTGGGTAATA	TGTATGTACACCCGGTCACCT
<i>GAPDH</i>	CACCCACTCCTCCACCTTT	GCCAAATTCGTTGTCATACCA

Az alkalmazott PCR program az alábbi lépésekből állt:

- Denaturáció: 95 °C 10 perc
- Amplifikáció: (40 ciklus) 95 °C 15 másodperc
60 °C 30 másodperc
72 °C 30 másodperc
- Olvadási görbe felvétele: 95 °C 10 másodperc
65 °C 60 másodperc
97 °C 1 másodperc

- Lehűtés: 37 °C 30 másodperc

A PCR termékek tisztaságának megállapításához olvadási görbe került felvételre. Ehhez a PCR reakció végén 65 °C és 97 °C intervallumban 0,2 °C-onként fluoreszcens jel detektálása történt.

Minden gén transzkripció elmozdulásának meghatározásakor legalább 4 független mérés eredményeit vettük alapul. A génexpressziós eredmények normalizálásához a *GAPDH* gént alkalmaztuk. Az ösztrogén kezelés hatására végbemenő génexpressziós változásokat a kezelésen át nem esett kontroll mintáknál kapott értékekhez viszonyítottuk, a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula alkalmazásával. Ahol a $\Delta\Delta C_t$ (ciklusszám)=kezelt minta ΔC_t értéke (C_t vizsgált gén - C_t *GAPDH*) - kontroll minta ΔC_t értéke (C_t vizsgált gén - C_t *GAPDH*). A kapott FC (Fold change) értékeket Log_2 formában ábráztuk (Varga és mtsai, 2022).

5.6. miRNS izolálás és kvantifikáció

A miRNS expresszió vizsgálatok a sejteket 24 lyukú platen tapasztottuk. A médiumcsere, valamint a kezelések kivitelezését az 5.1 *Sejtenyésztés* fejezetben leírtak alapján végeztük. A kezeléseket 24 h-t követően a miRNeasy Kit (Qiagen) segítségével a gyártó utasításai szerint totál RNS-t izoláltunk, amely tartalmazta a 200 bp-nál kisebb (miRNS-eket tartalmazó) RNS frakciót is. A kezelő médium eltávolítása és a sejtek PBS-el való mosása után, 700 µl QIAzol lízis reagenst pipettáztunk a sejtekre és egy steril sejtkaparóval leválasztottuk őket a sejtenyésztő plate aljáról. A sejtsuszpenziót egy steril eppendorf csőbe mértük, amit 5 perc, RT végzett inkubáció után centrifugálás követett (2 perc, 12.000 g, 4 °C). A felülúszó leszívása után 0,2 térfogatrész kloroformot adtunk a mintákhoz, amit 15 másodperc erős rázás után, újabb 5 perces RT inkubáció, majd centrifugálás követett (10 perc, 12.000 g, 4 °C). A felső, vizes fázis leszívása után 1,5-szeres térfogat résznyi abszolút etanolt adtunk a mintához. A minta alapos átmozgatása után 700 µl-t pipettáztunk az RNeasy MinElute Spin oszlopra. A mintát 8000 g-n, 30 másodpercig centrifugáltuk RT, majd 350 µl RWT puffert mértünk az izoláló oszlopra, melyet újból lecentrifugáltunk (8000 g, 30 másodperc, RT). Az átfolyó eltávolítása után a szilika membránhoz kötött nukleinsav molekulákon DNáz kezelést hajtottunk végre a kontamináló genomi DNS degradálása céljából. Ekkor mintánként 10 µl DNase I enzimből és 70 µl RDD pufferből álló elegyet pipettáztunk az oszlopra, amellyel 15 percig inkubáltuk a mintákat. Ezt 500 µl RWT, majd RPE pufferrel végzett két lépéses mosás követett (8000 g, 2 perc, RT). Az elúciót 20 µl nukleáz-mentes vízzel végeztük. Az izolált RNS koncentrációját NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) készüléken mértük le és -80 °C –on tároltuk.

A miRNS molekulák cDNS-sé való átírását a miRCURY LNA RT Kit (Qiagen) segítségével végeztük, a gyártó által biztosított protokollt követve.

A cDNS szintézis reakcióelegye mintánként az alábbi komponensekből állt:

- 2 μ l 20 ng/ μ l koncentrációjú miRNS
- 2 μ l 5x miRCURY RT Probe Reaction Buffer
- 5 μ l RNáz-mentes víz
- 1 μ l 10x miRCURY RT Enzim Mix

A reakció az alábbi lépésekből állt:

- Reverz transzkripció: 40 °C 60 perc
- Reakció leállítása: 95 °C 5 perc
- Hold temperature: 4 °C

A cDNS koncentrációját NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) készüléken mértük le és -80 °C –on tároltuk.

A miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-30d-5p, miR-30e-5p, miR-501-5p, let-7a-2-3p, let-7g-3p, miR-26a-2-3p, miR-197-5p, miR-582-3p, miR-6795-3p, miR-5008-5p miRNS-ek expressziós analízisét a miRCURY LNA PCR (Qiagen) primer assay és a miRCURY LNA SYBR Green PCR Kit (Qiagen) segítségével végeztük, a gyártó által biztosított protokollt követve. Ekkor 20 ng/ μ l cDNS terméket a 60 szorosára hígítottuk.

A reakcióelegy összetétele a következő volt:

- 5 μ l 2x miRCURY SYBR Green Master Mix
- 1 μ l PCR primer Mix
- 3 μ l cDNS (60x hígított)
- 1 μ l RNáz- mentes víz

Végtérfogat: 10 μ l

A PCR program a következő lépésekből állt:

- Aktiváció: 95 °C 2 perc
- Amplifikáció (40 ciklus):
 - Denaturáció: 95 °C 10 másodperc
 - Lánchosszabbítás: 56 °C 60 másodperc
- Olvadási görbe analízis: 95 °C 20 másodperc
40 °C 20 másodperc
85 °C 1 másodperc

- Lehűtés: 37 °C 30 másodperc

A PCR termékek tisztaságának megállapításához olvadási görbe került felvételre. Ehhez a PCR reakció során 60 °C és 95 °C intervallumban 0,2 °C-onként fluoreszcens jel detektálása történt.

Minden miRNS transzkripció szintjében megfigyelhető elmozdulás meghatározásakor legalább 4 független mérés eredményeit vettük alapul. A vizsgált miRNS-ek expressziós szintjében bekövetkező változások megállapításához a miR-103a-3p miRNS-t használtuk referenciaként. A kezelések hatására végbemenő miRNS expressziós változásokat a kezelésen át nem esett kontroll mintáknál kapott értékekhez viszonyítottuk a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formula alkalmazásával. Ahol $\Delta\Delta Ct = \text{kezelt minta } \Delta Ct \text{ értéke (} Ct_{\text{vizsgált miRNS}} - Ct_{\text{miR-103a-3p}}) - \text{kontroll minta } \Delta Ct \text{ értéke (} Ct_{\text{vizsgált gén}} - Ct_{\text{miR-103a-3p}})$. A kapott FC (Fold change) értékeket Log_2 formában ábrázoltuk. Egyes ábrákon a relatív expressziós értéket ábrázoltuk, ami a $2^{-\Delta Ct}$ értéknek felel meg.

5.7. Transzfektálás miRNS mimikkel

A miR-30d-5p funkcionális vizsgálatához a PEO1 és A2780 sejteket a miRIDIAN microRNA Mimic (Horizon) segítségével transzfektáltuk. A sejteket az *5.1 Sejtenyészítés* fejezetben leírtak alapján 96-os, vagy 24-es platekre tapasztottuk, majd 24 h-t inkubáltuk. Másnap a médiumot 5 % DCC-FBS-el kiegészített PRF-RPMI1640 médiumra cseréltük, mellyel egy időben megtörtént a sejtek transzfektálása is 50 nM és 100 nM koncentrációban a miR-30d-5p mimik vagy a miRIDIAN microRNA Mimic Negatív Kontrol (Horizon) hozzáadásával a DharmaFECT 1 siRNA Transfection Reagent Kit (Horizon) használati utasításait követve. A miR-30d-5p-t és a negatív kontrollt (miRIDIAN microRNA Mimic Negatív Kontrol) 50 nM, ill. 100 nM végkoncentrációban PRF-RPMI1640 + 1 % L-glutamin tartalmú médiummal hígítottuk. A transzfektáló reagensből 0,4 μl -t szintén PRF-RPMI1640 + 1 % L-glutamin tartalmú médiummal hígítottuk úgy, hogy a végtérfogata 10 μl legyen. A mixeket külön eppendorf csövekben összeállítottuk, majd 5 percig, RT inkubáltuk. Ezután a transzfektáló reagenst és a mimiket tartalmazó mixeket összemértük, majd további 20 percig RT inkubáltuk, végül kiegészítettük 80 μl 5 % DCC-FBS PRF-RPMI1640 + 1 % L-glutamin médiummal. A végső, 100 μl mennyiségű transzfektáló mixeket ezután a sejtekre pipettáztuk. 24 h inkubációt követően (37 °C, 90 %-os páratartalom, 5 % CO_2 koncentráció) friss, 5 % DCC-FBS PRF-RPMI1640 médium rámerésével együtt újabb transzfektálást hajtottunk végre. Ebben

az időpontban a PEO1 sejtvonalat egyes kísérletek során E2 (10 nM, 1-100 µM), AZD8835 (100 nM), vagy tamoxifén (1 µM) kezelésnek is alávetettük.

5.8. Transzkriptomikai analízis RNS szekvenálással

A szekvenálás kivitelezését és a nyers adatok analízisét a Genomi Medicina és Bioinformatikai Szolgáltató Laboratórium (Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Debreceni Egyetem) végezte. A szekvenálás 3-3 párhuzamos mintán történt kivitelezésre, mely 3 kezeletlen kontroll, valamint 3-3 E2, ZEA, ill. BPA kezelésen átesett minta volt. A sejttenyésztés, valamint az RNS izolálás az *5.1 Sejttenyésztés*, *5.5 mRNA izolálás és kvantifikáció* és *5.6 miRNA izolálás és kvantifikáció* fejezetben leírt releváns részek alapján lett kivitelezve. Az RNS minták minőség ellenőrzése az Agilent Bio Analyzer with the Eukaryotic Total RNA Nano Kit-tel, a gyártó által mellékelte protokollt követve történt. Ezek alapján csak azoknál a mintáknál került sor könyvtárkészítésre, ahol az RNS integritási szám (RNA integrity number, RIN) nagyobb volt, mint 7. A mRNA szekvenáláshoz a könyvtárkészítés a NEBNext Ultra II RNA Sample Prep kit (New England BioLabs) segítségével történt, a gyártó utasításait követve. A miRNA szekvenálás esetén a könyvtárak generálása a NEBNext Multiplex Small RNA PREP Set for Illumina (1-48) 96 rxn kit (New England BioLabs) segítségével történt, a mellékelte gyártói protokoll szerint. A szekvenálás Illumina NextSeq 500 készüléken (Illumina) lett elvégezve. A nyers RNS szekvenálási adatok illesztése a GRCh38.p13 (HG38: GCF_000001405.39_GRCh38.p13_genomic.fna) referencia genomhoz történt a HISAT2 algoritmus segítségével. A miRNA szekvenálás során kapott nyers adatok referencia genomhoz való illesztése a Novoalign szoftverrel történt. A további analízishez, vagyis a DESeq algoritmussal való normalizáláshoz és az FPKM értékek generálásához, a StrandNGS szoftver (www.strand-ngs.com) lett felhasználva. Az ösztrogén kezelésekre gyakorolt hatása a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítva moderated T-teszt alkalmazásával (Benjamini-Hochberg FDR korrekcióval kiegészítve; $p < 0,05$) lett meghatározva. A szekvenálás során generált adatok nyilvánosan hozzáférhetőek a GEO (Gene Expression Omnibus) adatbázisban (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) a GSE224108 azonosító számon.

5.9. Bioinformatikai analízis

A transzkriptomikai adatok analízisét az előző pontban meghatározott FPKM értékek felhasználásával végeztük az iDEP.96 internetes program (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep96>) segítségével. Az alacsony expressziót mutató, ezért

feltehetően alacsony biológiai relevanciával rendelkező gének és miRNS-ek kizárása érdekében a cut-off értéket 1-re állítottuk, azaz csak azokat vontuk be az analízisbe, amelyeknél az FPKM érték legalább az egyik mintában 1, vagy annál nagyobb értéknek adódott. A bioinformatikai elemzések alkalmával az expressziós elmozdulást jelző Log_2FC értékek kiszámítása, heatmap-ek és MA plot-ok generálása történt. Az iDEP.96, GO_BP, valamint a Reactome adatbázisok (<https://reactome.org/PathwayBrowser/>) segítségével dúsulási analízist végeztünk az indukciójukban csökkenést és emelkedést mutató gének esetében. A Venn diagramokat a BioVenn (<https://www.biovenn.nl/index.php>) szoftverrel készítettük. A miRNS szekvenálásból származó adatok esetében a Log_2FC értékeket szintén az iDEP.96 segítségével határoztuk meg. Az expressziójukban emelkedést és csökkenést mutató miRNS-ek, valamint a célgénjeik közötti hálózatanalízist és dúsulási analízist a miRNet szoftver (<https://www.mirnet.ca>) segítségével végeztük, mely a GO_BP, KEGG és a Reactome adatbázisokon alapult.

5.10. Statisztikai elemzések

A gén-, ill. miRNS expressziós mérések alkalmával az egyes minták közötti szignifikancia mértékét Student-féle t-teszt segítségével határoztuk meg, a ΔCt értékek felhasználásával. A szekvenálás, ill. a qPCR során kapott Log_2FC értékek közötti korreláció mértékét Pierson korrelációval határoztuk meg. Az ösztrogén kezelések patofiziológiai paraméterekre gyakorolt hatásának meghatározásakor egyutas ANOVA tesztet végeztünk (posthoc analízis: Dunnet teszt). A statisztikai analíziseket és az ábrákat a GraphPad Prism 7.0 program segítségével készítettük el.

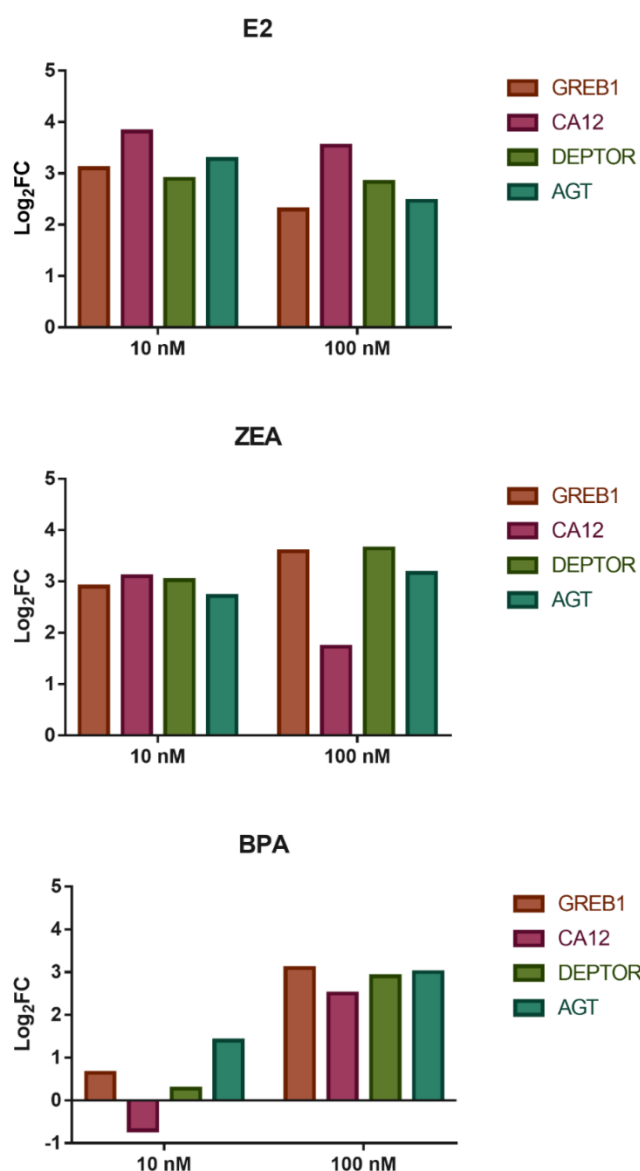
6. Eredmények

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

6.1.1. Az E2, ZEA és BPA által kiváltott, mRNS expresszióban megmutató változások

Munkánk során a ZEA és a BPA xenoösztrogének által kiváltott transzkriptomikai hatásokat hasonlítottuk össze a fiziológiailag releváns E2 által kiváltott változásokkal, RNS szekvenálás segítségével. Kísérleteinkhez a PEO1 – ER α -t expresszáló - humán epiteliális ovárium sejtvonalat alkalmaztuk, mely esetében korábbi munkánk alkalmával az E2, ZEA és BPA molekulákkal való kezeléseket 10 nM és 100 nM koncentrációban a sejtproliferáció és a migráció fokozódását váltották ki. Érdekes megjegyezni továbbá, hogy ezen dózisok sem apoptózist, sem sejtlízist nem indukáltak (Márton és mtsai, 2020). Annak eldöntése érdekében, hogy a 10 nM vagy a 100 nM dózisú kezeléseket optimálisabbak a transzkriptomikai kísérleteinkhez a PEO1 sejtvonalat 10 nM, ill. 100 nM E2, ZEA és BPA kezelésnek vetettük alá, majd 8 órával a kezeléseket követően mRNS-t izoláltunk. A kiváltott génexpressziós hatás mértékéről a *GREB1*, *CA12*, *DEPTOR* és *AGT*, korábbi kísérleteink alkalmával ösztrogén szenzitívnek bizonyult gének génexpressziós elmozdulása adott információt, amit qPCR-rel határoztunk meg (Márton és mtsai, 2020). Eredményeink alapján a 10 nM koncentrációban alkalmazott E2 és ZEA a marker gének expressziójának szignifikáns emelkedését idézte elő (10. ábra). Hasonló mértékű indukciót a BPA esetében 100 nM kezelés esetén tapasztaltunk. Ugyanakkor az E2 és ZEA esetében nem volt megfigyelhető jelentősen nagyobb mértékű indukció a 100 nM dózis alkalmazása esetén. A minimális effektív dózis tehát az E2 és a ZEA molekuláknál 10 nM-nak bizonyult. A BPA-nál azonban az összevethetőbb eredmények érdekében 100 nM dózist alkalmaztunk (10. ábra).

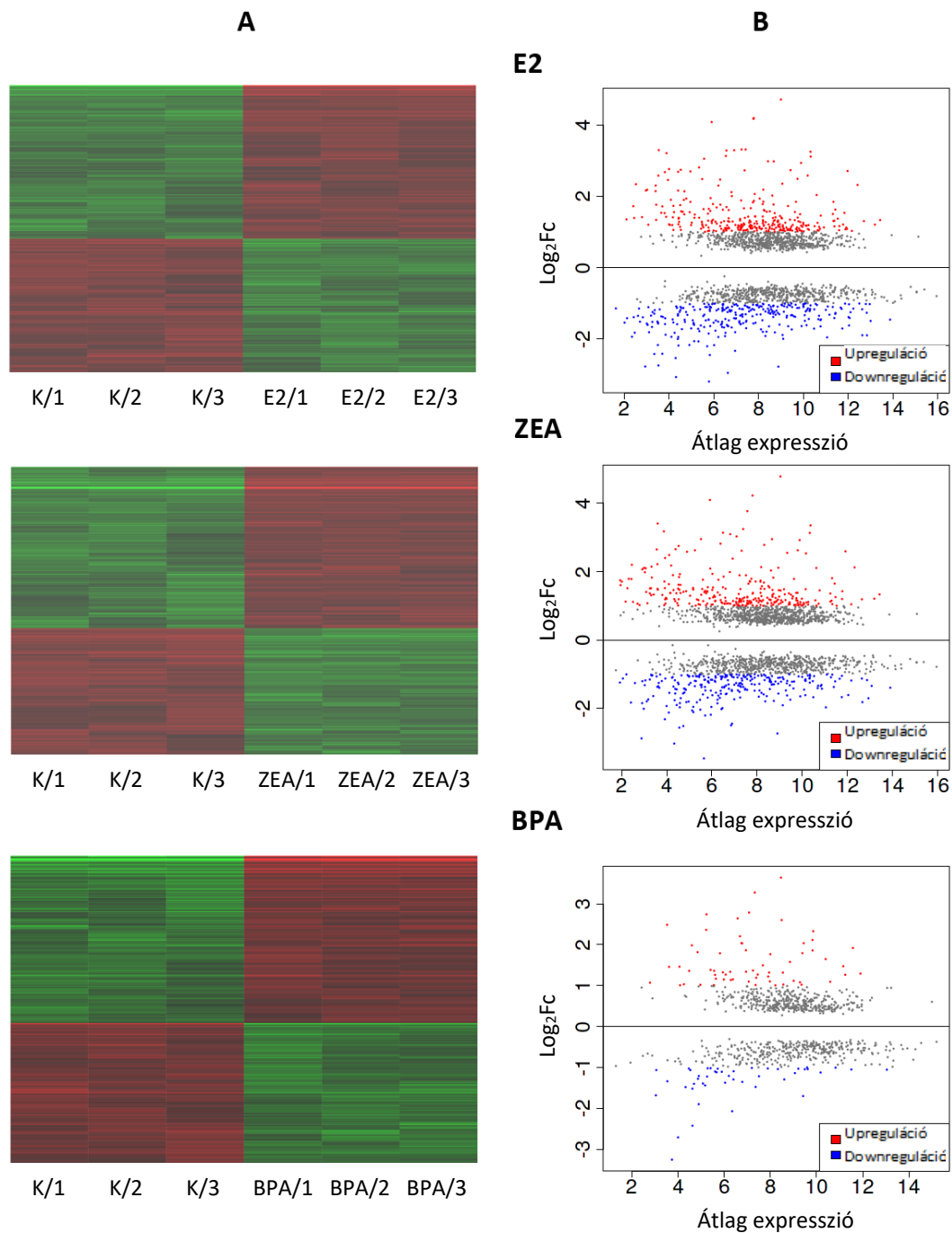
A kezelésekre végbemenő transzkriptomikai változások detektálása érdekében RNS szekvenálást végeztünk. Eredményeink 3-3 párhuzamos mintából (3 kezeletlen kontroll; ill. 3 E2, 3 ZEA és 3 BPA kezelésen átesett) származtak. Az eredmények kiértékelése során az ösztrogén kezelésekre által kiváltott hatást a kezeletlen kontroll mintákhoz hasonlítottuk. Eredményeink alapján mindhárom ösztrogén hatású molekula jelentős mértékű befolyást gyakorolt a globális génexpressziós mintázatra. Az E2 kezelés 1847, a ZEA kezelés 2019, míg a BPA-val való kezelés 901 gén expresszióját változtatta meg szignifikáns mértékben ($p < 0,05$, 11, ábra, A; Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő táblázat 1).



10. ábra. Az E2, ZEA és BPA kezelések során alkalmazott dózis optimalizálása. Ekkor a sejteket 10 nM, ill. 100 nM dózissal kezeltük, és meghatároztuk a *GREB1*, a *CA12*, a *DEPTOR*, valamint az *AGT* gének expresszóját qPCR segítségével. A génexpressziós változások mértékét Log₂FC értékekben ábrázoltuk.

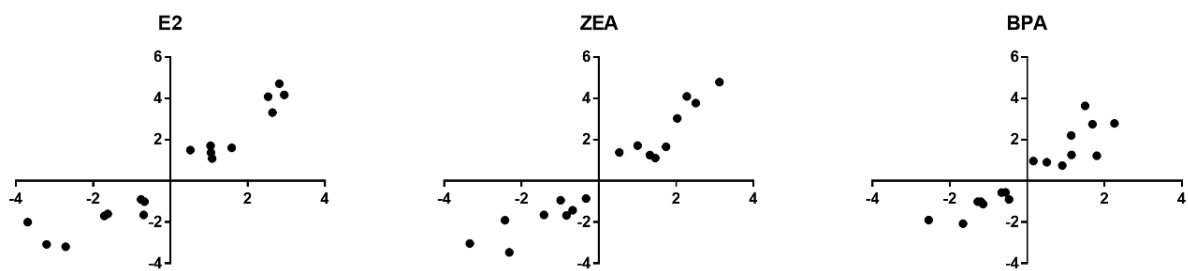
Az adatok elemzéséhez az iDEP.96 weboldalon elérhető programot használtuk. Az indukció, valamint a represszió mértékét a Log₂FC értékek segítségével határoztuk meg. Fontos kiemelni, hogy a további elemzésekbe csak a legalább kétszeres elmozdulást mutató géneket vontuk be, melyek feltételezhetően jelentős biológiai relevanciával rendelkeznek. Ezen adatok alapján 308, 288 és 63 gén expressziója mutatott szignifikáns mértékű emelkedést (Log₂FC > 1), míg 292, 260 és 45 gén szignifikáns mértékű csökkenést (Log₂FC < -1) az E2, ZEA és BPA kezelések hatására (11. ábra, B; Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő Táblázat 2). Ezen

eredmények alapján a ZEA kezelés az E2-hoz hasonló mértékű hatás kiváltására volt képes, ami nem mondható el a BPA-ról (11. ábra).



11. ábra. A génextpresszió változása az E2, ZEA és BPA kezelések hatására. (A) A kezelések hatására szignifikáns elmozdulást ($p < 0,05$) mutató gének heatmap ábrái. A kezelések által kiváltott változásokat a kezeletlen kontroll mintákhoz (K) hasonlítottuk. Az ábrákon a három replika expressziós profilja látható. (B) Az ösztrogén hatású molekulák hatására expressziós emelkedést és csökkenést mutató gének MA-ploton való ábrázolása, a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítva. A génextpresszió változásának a mértékét a Log_2FC értékek jelzik. $\text{Log}_2\text{FC} > 1$: biológiailag releváns mértékű indukció (piros szimbólumok); $\text{Log}_2\text{FC} < -1$: biológiailag releváns mértékű represszió (kék szimbólumok).

A mRNS szekvenálás eredményeinek validálásához 17 gént választottunk ki, melyek közül 8 gén represszálódott (*RBBP8NL*, *BLNK*, *TGMI*, *KRT4*, *BMF*, *CD24*, *NOTCH3* és *GBP3*) és 9 gén indukálódott (*MYC*, *EGR1*, *NOLC1*, *RRP12*, *MYBL1*, *GREB1*, *CA12*, *DEPTOR* és *AGT*). Expressziójukat qPCR segítségével határoztuk meg, ugyanazon kísérleti körülményeket alkalmazva, mint korábban a mRNS szekvenálás esetében. A vizsgált gének qPCR-el kapott Log₂FC értékeit összevetettük a mRNS szekvenálás során kapott Log₂FC értékekkel. Eredményeink alapján a vizsgált gének qPCR és mRNS szekvenálás során kapott Log₂FC értékei jó korrelációt mutattak egymással (12. ábra). A Pearson korrelációs koefficiens az E2, ZEA és BPA kezelések esetében $r=0,95$, $r=0,96$ és $r=0,93$ értéknek adódott (12. ábra).



12. ábra. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására megfigyelhető génexpressziós változások validálása qPCR segítségével. A vizsgálatban 17 gén expresszióját monitoroztuk. A génexpresszió változásának mértékét Log₂FC értékkel jellemeztük. X tengely: qPCR méréssel kapott Log₂FC értékek. Y tengely: mRNS szekvenálással kapott Log₂FC értékek az egyes gének esetében.

6.1.2. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására indukálódott és represszálódott gének funkcionális géndúsulási analízise

A kezelések hatására biológiailag feltehetőleg releváns elmozdulást (Log₂FC > 1 vagy Log₂FC < -1) mutató géneket bioinformatikai elemzésnek vetettük alá. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására megfigyelhető génexpressziós elmozdulások átfedését Venn diagrammon ábráztuk (13. ábra, Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő táblázat 3). A megváltozott expressziót mutató gének között 83 mutatott változást mindhárom kezelés hatására, melyek közül 57 gén indukálódott, míg 26 gén represszálódott (13. ábra, 3. táblázat).

Ahogy a Venn diagrammon is látható, az E2 és a ZEA kezelések hatása jelentősen átfedett egymással, mintegy 407 gén mutatott elmozdulást ezen kezelések esetében, melyek nagy része az indukálódott gének közé sorolható (13. ábra, 3. táblázat). A BPA ugyan kevesebb gén elmozdulását idézte elő, de ezek 77 %-a ugyancsak reagált az E2 és/vagy ZEA kezelésekre egyaránt. 13 gén elmozdulása azonban a BPA kezelésre specifikusnak mondható (13. ábra, Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő táblázat 3).

Indukálódott gének

Represszálódott gének



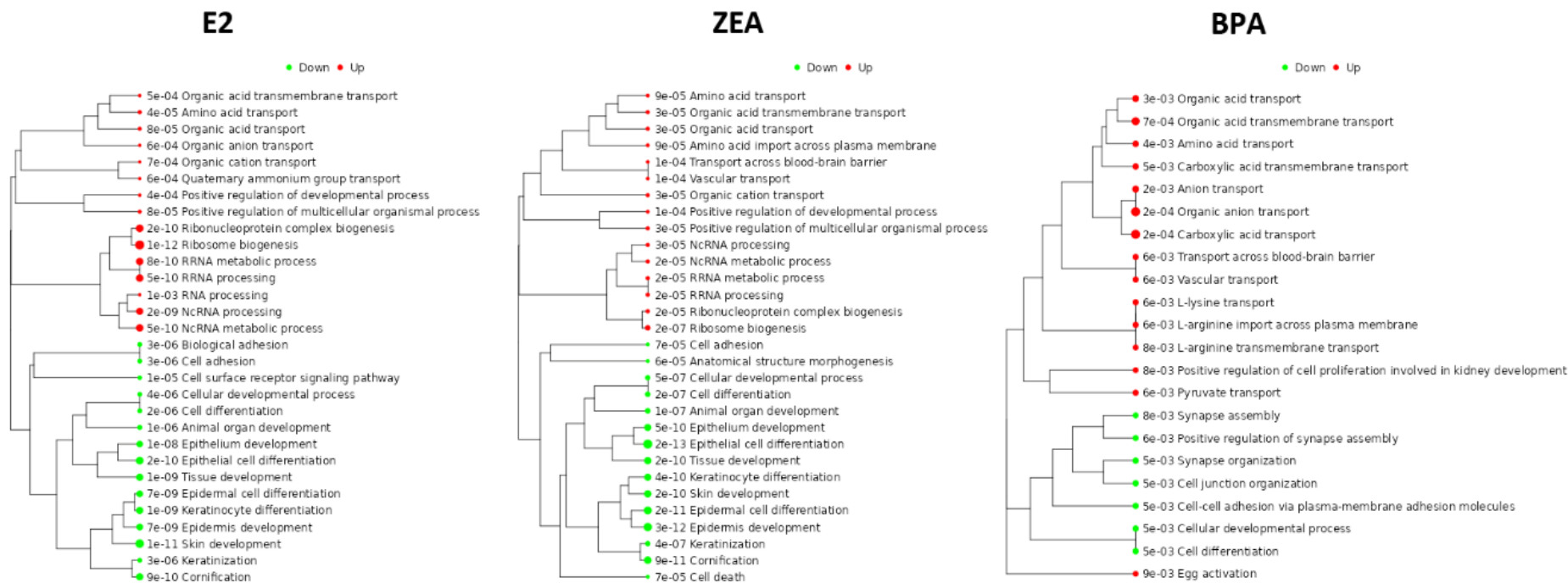
13. ábra. Az E2 (piros), a ZEA (zöld) és a BPA (lila) kezelések hatására indukálódott ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$) és represszálódott ($\text{Log}_2\text{FC} < -1$) gének közötti átfedéseket ábrázoló Venn diagrammok.

3. táblázat. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására indukálódott ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$) és represszálódott ($\text{Log}_2\text{FC} < -1$) gének listája a hozzájuk tartozó Log_2FC és FDR értékekkel.

Gén	E2		ZEA		BPA	
	Log_2FC	FDR	Log_2FC	FDR	Log_2FC	FDR
<i>GREB1</i>	4,71	7,39E-11	4,79	3,95E-08	3,64	3,61E-12
<i>KCNF1</i>	4,19	2,15E-10	4,23	7,10E-08	3,27	8,96E-12
<i>DEPTOR</i>	4,17	7,39E-11	3,77	5,25E-08	2,79	8,96E-12
<i>CA12</i>	4,08	7,39E-11	4,10	2,98E-08	2,74	4,80E-12
<i>AGT</i>	3,31	2,69E-10	3,03	5,25E-08	2,21	1,38E-11
<i>MGAT3</i>	3,31	2,15E-10	3,25	3,15E-08	2,03	4,05E-12
<i>CBLN1</i>	3,29	2,71E-10	3,10	1,20E-07	2,64	3,74E-12
<i>OLFM1</i>	3,28	1,43E-09	3,14	6,37E-07	1,79	1,29E-08
<i>ARHGAP26</i>	3,25	2,22E-10	3,35	3,95E-08	2,33	8,95E-12
<i>SEZ6</i>	3,21	1,04E-08	3,18	1,61E-07	2,49	3,15E-12
<i>PPP1R1A</i>	3,13	2,08E-10	2,82	2,98E-08	1,26	4,58E-10
<i>CADM1</i>	3,11	2,69E-10	3,13	3,37E-08	2,11	6,99E-12
<i>PIPOX</i>	3,05	9,83E-08	2,95	5,97E-06	2,36	4,42E-08
<i>DHRS2</i>	2,98	5,99E-10	2,78	1,17E-07	1,50	2,70E-09

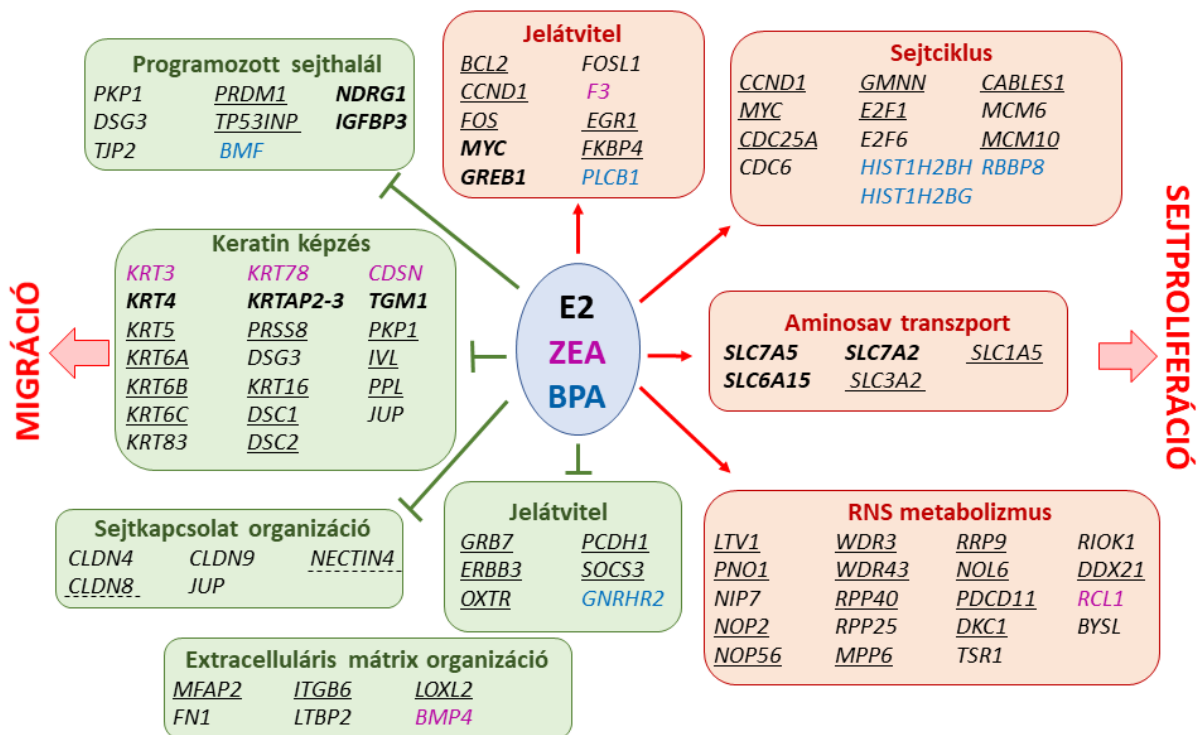
<i>PKDCC</i>	2,97	6,56E-10	2,95	2,98E-08	2,60	4,05E-12
<i>SLC7A2</i>	2,93	1,43E-09	2,92	2,89E-07	2,04	2,70E-10
<i>HPDL</i>	2,81	2,51E-08	2,63	3,42E-06	1,82	7,26E-08
<i>CABLES1</i>	2,73	2,94E-10	2,55	3,14E-08	1,58	2,63E-11
<i>RHOBTB1</i>	2,72	9,85E-10	2,61	8,73E-08	1,86	9,33E-11
<i>RBBP8</i>	2,71	2,69E-10	2,60	3,95E-08	1,92	1,49E-11
<i>RUBCNL</i>	2,69	1,05E-08	2,58	1,00E-06	1,98	1,35E-08
<i>DIRAS3</i>	2,58	6,56E-10	2,54	6,41E-08	1,86	1,94E-11
<i>LONRF2</i>	2,49	1,43E-09	2,63	1,61E-07	1,79	1,78E-10
<i>RIMS4</i>	2,35	3,09E-09	2,11	9,53E-08	1,32	3,73E-10
<i>SLC7A5</i>	2,32	9,02E-10	2,13	8,63E-08	1,29	1,20E-09
<i>PLAT</i>	2,30	6,56E-10	1,94	2,36E-06	1,17	9,17E-09
<i>CISH</i>	2,18	1,06E-08	2,13	6,54E-07	1,77	2,70E-10
<i>AFF3</i>	2,11	1,77E-08	2,38	6,58E-07	2,04	2,11E-10
<i>PDGFRL</i>	2,06	1,41E-08	1,65	7,60E-07	1,19	4,13E-09
<i>RASGRP1</i>	2,03	2,41E-08	2,11	8,43E-07	1,65	9,16E-10
<i>BEND3</i>	2,00	1,47E-08	1,99	9,05E-07	1,34	7,40E-08
<i>PPARGC1B</i>	1,95	1,49E-07	2,09	6,75E-06	1,36	9,28E-08
<i>MTHFD2P7</i>	1,93	3,40E-08	1,61	8,43E-07	1,36	1,40E-08
<i>ERICH3</i>	1,88	1,37E-07	1,90	3,96E-06	1,34	5,68E-08
<i>PLCB1</i>	1,87	9,19E-08	1,79	2,36E-06	1,01	5,31E-07
<i>CDCA7</i>	1,85	1,04E-08	1,74	4,73E-07	1,32	2,00E-09
<i>OLFML3</i>	1,84	1,41E-08	1,79	6,54E-07	1,08	1,20E-08
<i>SLC22A3</i>	1,84	9,64E-09	1,81	2,89E-07	1,47	1,31E-10
<i>EGR1</i>	1,78	2,67E-08	1,71	9,58E-07	1,22	9,03E-09
<i>SLITRK4</i>	1,76	5,89E-08	1,76	1,40E-06	1,15	3,05E-07
<i>PNPT1P1</i>	1,73	8,04E-08	1,19	3,83E-05	1,46	4,42E-08
<i>RRS1</i>	1,72	1,49E-08	1,49	9,13E-07	1,12	2,30E-08
<i>ZNF239</i>	1,70	4,87E-08	1,55	2,42E-06	1,14	3,21E-08
<i>NPY1R</i>	1,69	1,99E-08	1,54	3,45E-06	1,32	2,19E-09
<i>SLC6A15</i>	1,66	1,75E-07	1,72	2,65E-06	1,27	3,28E-08
<i>TSEN2</i>	1,66	2,68E-07	1,49	1,14E-05	1,10	3,82E-07
<i>ZNF485</i>	1,64	5,17E-07	1,77	9,08E-07	1,38	3,22E-09
<i>MYC</i>	1,63	1,49E-08	1,65	4,36E-07	1,26	4,51E-10
<i>NCR3LG1</i>	1,62	1,94E-07	1,86	3,42E-06	1,34	8,40E-08
<i>TFAP4</i>	1,61	1,36E-07	1,58	2,23E-06	1,10	5,87E-08

<i>KBTBD8</i>	1,59	2,61E-08	1,55	9,05E-07	1,01	1,29E-08
<i>SLC19A2</i>	1,57	8,04E-08	1,58	9,05E-07	1,01	1,51E-08
<i>LYAR</i>	1,56	5,51E-08	1,33	1,40E-06	1,02	5,39E-08
<i>KAZN</i>	1,46	4,96E-08	1,45	9,08E-07	1,09	9,52E-09
<i>PUS7</i>	1,41	5,51E-08	1,35	9,28E-07	1,03	9,66E-09
<i>ERG</i>	1,40	1,84E-06	1,20	4,52E-05	1,03	7,90E-08
<i>NXNL2</i>	1,28	1,69E-06	1,25	4,68E-05	1,27	8,75E-08
<i>CLDN8</i>	-1,32	3,21E-07	-2,11	5,65E-07	-1,03	3,19E-07
<i>LINC01133</i>	-1,42	2,42E-07	-1,26	5,64E-06	-1,01	2,91E-07
<i>MFAP2</i>	-1,55	1,31E-07	-1,80	5,65E-07	-1,22	7,07E-08
<i>IGSF9</i>	-1,60	5,90E-08	-1,57	7,60E-07	-1,03	4,15E-08
<i>KRTAP2-3</i>	-1,60	5,51E-08	-1,35	9,58E-07	-1,02	2,80E-08
<i>UNC5B-AS1</i>	-1,62	6,74E-08	-1,38	5,76E-08	-1,12	5,76E-08
<i>BMF</i>	-1,64	1,99E-08	-1,65	4,90E-09	-1,12	4,90E-09
<i>EPHB3</i>	-1,64	2,84E-08	-1,62	4,08E-08	-1,04	4,08E-08
<i>KRT4</i>	-1,71	2,13E-08	-1,67	1,10E-08	-1,01	1,10E-08
<i>CYSRT1</i>	-1,72	1,69E-08	-2,06	1,33E-08	-1,10	1,33E-08
<i>RNF224</i>	-1,77	2,59E-08	-1,96	1,68E-07	-1,09	1,68E-07
<i>RASSF2</i>	-1,80	1,06E-06	-1,64	4,32E-09	-1,29	4,32E-09
<i>IKZF2</i>	-1,89	6,80E-08	-1,47	3,52E-07	-1,04	3,52E-07
<i>IGFBP3</i>	-1,89	1,04E-08	-1,82	5,02E-09	-1,06	5,02E-09
<i>POU2F3</i>	-1,92	3,87E-07	-1,99	1,46E-08	-1,35	1,46E-08
<i>NDRG1</i>	-1,96	4,01E-09	-1,97	2,70E-09	-1,05	2,70E-09
<i>TGM1</i>	-2,00	2,22E-08	-1,91	3,82E-08	-1,00	3,82E-08
<i>LINC01559</i>	-2,00	3,15E-07	-1,90	1,34E-07	-1,40	1,34E-07
<i>LRRC4</i>	-2,20	4,11E-08	-2,21	2,76E-08	-1,21	2,76E-08
<i>FILIP1L</i>	-2,33	1,49E-08	-2,45	6,82E-10	-1,22	6,82E-10
<i>C4ORF26</i>	-2,45	1,61E-07	-2,18	2,30E-08	-1,29	7,14E-08
<i>NECTIN4</i>	-2,78	1,43E-09	-2,73	1,07E-10	-1,70	1,07E-10
<i>AIM1L</i>	-2,95	1,04E-08	-2,50	3,21E-10	-1,48	3,21E-10
<i>BLNK</i>	-3,07	2,53E-07	-3,03	2,70E-09	-1,90	2,70E-09
<i>RBBP8NL</i>	-3,19	1,28E-07	-3,46	1,42E-08	-2,07	1,42E-08



14. ábra. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására indukciót ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$) és repressziót ($\text{Log}_2\text{FC} < -1$) mutató gének funkcionális vizsgálata. A funkcionális gendúsulási analízist az iDEP.96 és a GO_BP adatbázisok segítségével végeztük el.

Annak kiderítése érdekében, hogy az általunk vizsgált ösztrogének milyen biológiai folyamatokban működnek közre, a hatásukra megváltozott expressziójú gének esetében funkcionális géndúsulási analízist végeztünk a GO_BP és a Reactome adatbázisok felhasználásával. Az E2, ZEA és BPA kezelés hatására egyaránt indukciót mutattak az aminosav-, szerves sav- és iontranszportozható folyamatok. Érdekes kiemelni továbbá az RNS szintézishez köthető folyamatok nagymértékű dúsulását is (pl. nem-kódoló-, riboszómális- és nukleáris RNS metabolizmus) (14., 15. ábra). Ezzel ellentétesen az epiteliális fenotípus fenntartásához (pl. epiteliális sejt differenciáció, epidermisz kialakulás) és a sejt adhézióhoz (pl. biológiai adhézió, sejt adhézió) köthető folyamatok represszálódása volt megfigyelhető (14., 15. ábra). Ezen eredmények jó összhangban vannak a Reactome adatbázist alapul vevő analízisünk eredményével (15. ábra, Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő Táblázat 4).

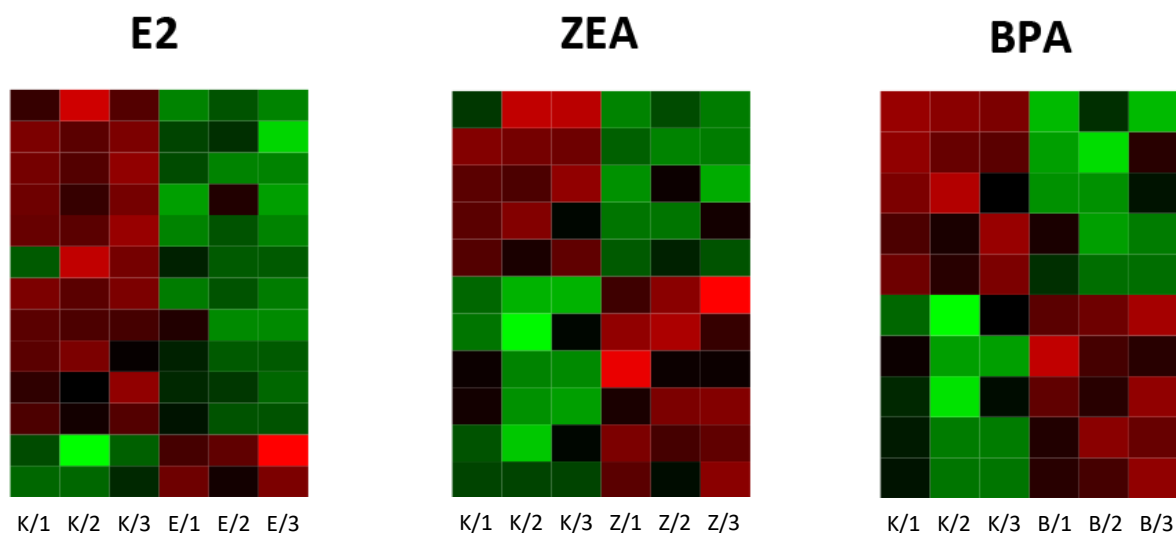


15. ábra. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására változott expressziót mutató gének, valamint az érintett útvonalak összegzése. A fekete színnel jelölt gének az E2 kezelés hatására mutattak elmozdulást. A félkövér jelzéssel ellátott gének az E2, ZEA, és BPA kezelés hatására egyaránt elmozdulást mutattak. Az aláhúzott jelzéssel ellátott gének az E2 és a ZEA, míg a szaggatott vonallal aláhúzott gének az E2 és a BPA hatására mutattak elmozdulást. A rózsaszín jelzéssel ellátott gének expressziója csak a ZEA, a kék jelzéssel ellátott gének csak a BPA kezelés hatására változott. Az ábra a Reactome adatbázis felhasználásával végzett funkcionális géndúsulási analízis eredményei alapján lett készítve (Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő Táblázat 4).

A p-érték alapján a 20 legjelentősebbnek vélhető találat szerint az E2 és a ZEA kezelések hatására indukálódott/represszáldott útvonalak esetében nagy átfedés volt tapasztalható, ami valószínűsíthetően a megváltozott expressziót mutató gének esetében megmutatkozó nagy átfedés következménye (15. ábra, Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő Táblázat 4). Az indukálódott gének a sejtciklushoz és az RNS metabolizmushoz köthető folyamatokban dúsultak leginkább (pl. a mitotikus G1 és G1-S fázis átmenet, valamint a rRNS érési folyamatok a sejtmagban és a citoplazmában). Ezenfelül az aminosav transzportfolyamatok (pl. a plazma membránon keresztül megvalósuló aminosav transzport) és az ösztrogén hatására indukálódó génexpressziós folyamatok is nagyfokú dúsulást mutattak (15. ábra, Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő Táblázat 4). A BPA hatására indukciót mutató gének esetében szintén megfigyelhető a sejtciklus, az aminosav metabolizmus és az ösztrogén hatására indukálódó génexpressziós folyamatok dúsulása, azonban az RNS metabolizmushoz köthető folyamatok esetében nem volt megfigyelhető szignifikáns mértékű elmozdulás (15. ábra, Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő Táblázat 4). Hasonló jelenség volt megfigyelhető a represszált gének esetében, ahol ugyancsak az E2 és a ZEA kezelések hatására megfigyelt változások között volt jellemző a nagyobb mértékű korreláció. A legnagyobb mértékű dúsulás a keratinizációhoz, a sejt-sejt kapcsolatok kialakításához, valamint a programozott sejthalálhoz köthető folyamatokban volt jellemző (15. ábra, Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő Táblázat 4).

6.1.3. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására megváltozott expressziót mutató miRNS-ek vizsgálata

Az E2, ZEA és BPA hatására változott expressziót mutató miRNS-ek azonosítása érdekében miRNS szekvenálást végeztünk. Ezen vizsgálat kísérleti körülményei (a sejtek tenyésztése, kezelése) megegyeztek a mRNS szekvenálásnál alkalmazott körülményekkel. Az E2, ZEA és BPA kezelések esetében 74, 47 és 73 miRNS expressziója változott meg szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) (16. ábra, Márton és mtsai, 2023; Kiegészítő Táblázat 5). A változás mértékét itt is Log_2FC értékekkel jellemeztük, melynek kiszámítása az iDEP.96 weboldalon elérhető szoftver segítségével történt. A további analíziseknél azon miRNS-eket vettük figyelembe, amelyek esetében az expressziós elmozdulás legalább kétszeresnek bizonyult ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$ vagy $\text{Log}_2\text{FC} < -1$). Ezek alapján 13 (E2), 11 (ZEA) és 10 (BPA) miRNS mutatott feltehetőleg biológiailag releváns mértékű elmozdulást (16. ábra, 4. táblázat). Az azonosított miRNS-ek közül a miR-6795-3p, miR-5008-5p, miR-197-5p expressziója mindhárom kezelés hatására, a miR-501-5p pedig az E2 és a ZEA kezelések hatására egyaránt csökkent (4. táblázat).



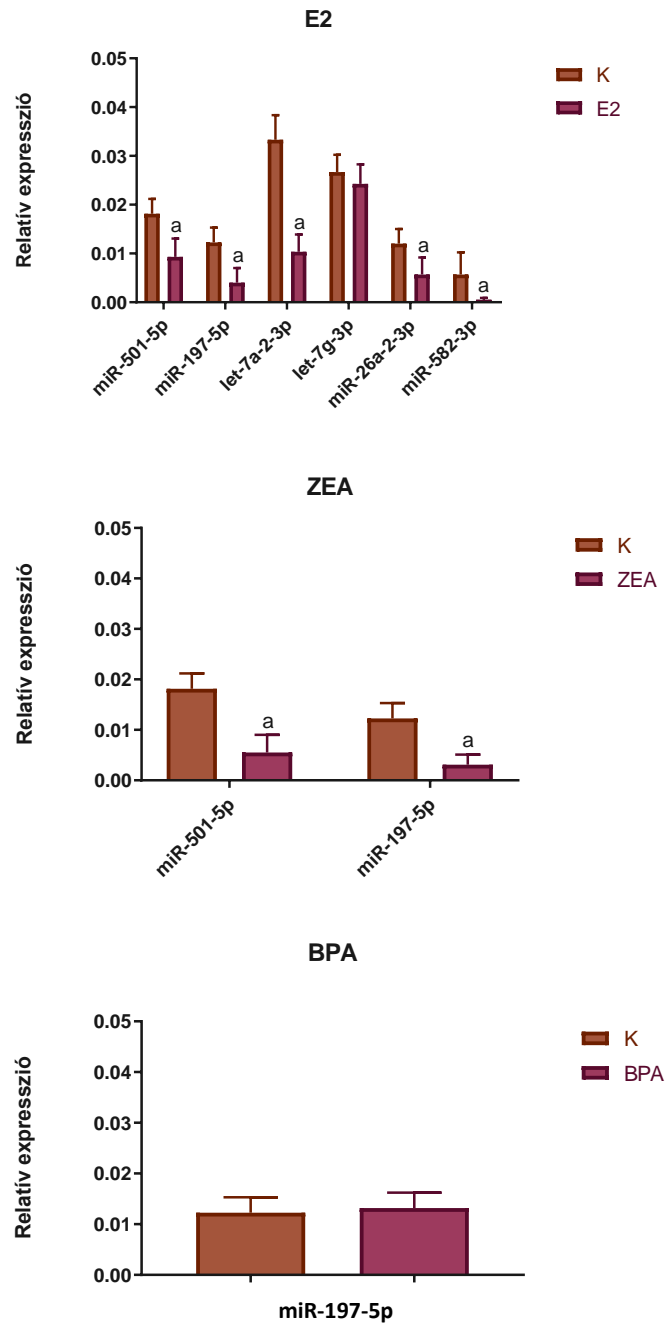
16. ábra. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására indukciót ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$) és repressziót ($\text{Log}_2\text{FC} < -1$) mutató miRNS-ek heatmap ábrái. A kezelések által kiváltott változások mértékét a kezeletlen kontroll mintákhoz hasonlítottuk. Az ábrákon a három replika expressziós profilja látható. (K: kezeletlen kontroll; E: E2-vel kezelt; Z: ZEA-val kezelt; B: BPA-val kezelt).

4. táblázat. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására indukciót ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$) és repressziót ($\text{Log}_2\text{FC} < -1$) mutató miRNS-ek Log_2FC és FDR értékei.

E2	Log_2FC	FDR	ZEA	Log_2FC	FDR	BPA	Log_2FC	FDR
let-7a-2-3p	-1,99	0,001	miR-6795-3p	-1,83	0,0002	miR-6795-3p	-1,66	0,029
miR-501-5p	-1,98	0,001	miR-3661	-1,68	0,052	miR-597-5p	-1,33	0,05
let-7g-3p	-1,98	0,017	miR-501-5p	-1,55	0,033	miR-197-5p	-1,21	0,046
miR-3679-5p	-1,95	0,001	miR-197-5p	-1,10	0,066	miR-5008-5p	-1,09	0,037
miR-26a-2-3p	-1,92	0,023	miR-5008-5p	-1,07	0,013	miR-320c	-1,03	0,065
miR-326	-1,65	0,035	miR-451a	1,09	0,039	miR-6879-3p	1,01	0,046
miR-6795-3p	-1,41	0,035	miR-3065-3p	1,33	0,095	miR-3934-5p	1,11	0,065
miR-1305	-1,27	0,092	miR-3620-3p	1,46	0,049	miR-590-5p	1,11	0,046
miR-197-5p	-1,27	0,026	miR-6806-3p	1,49	0,033	miR-636	1,22	0,05
miR-6765-3p	-1,16	0,035	miR-4747-3p	1,93	0,033	miR-6806-3p	1,45	0,046
miR-5008-5p	-1,05	0,026	miR-548u	2,34	0,013			
miR-582-3p	1,48	0,023						
miR-6775-3p	2,48	0,026						

6 miRNS expresszióját qPCR segítségével is megvizsgáltuk, melyek a miR-501-5p, let-7a-2-3p, let-7g-3p, miR-26a-2-3p, miR-197-5p és miR-582-3p voltak. Ezen miRNS-ek tumorok kialakulásában betöltött szerepét más sejtvonalak esetében is bizonyították már (Dai és mtsai, 2021; Fan és mtsai, 2016; Gao és mtsai, 2020; Jain és mtsai, 2019; Mi és mtsai, 2019). A miR-

501-5p, let-7a-2-3p, miR-26a-2-3p és miR-197-5p molekulák qPCR-ral végzett méréseink esetén is repressziót mutattak az E2 kezelések hatására (17. ábra). Azonban a miR-582-3p esetében is repressziót tapasztaltunk, amely miRNS a szekvenálás alkalmával indukciót mutatott (17. ábra, 4. táblázat).

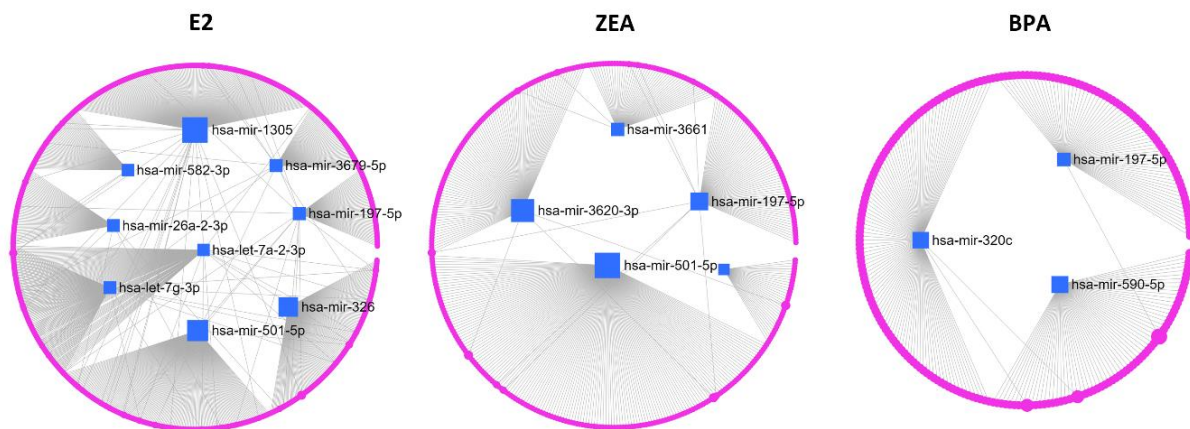


17. ábra. A 6 kiválasztott miRNS expressziójának vizsgálata az E2, ZEA és BPA kezelések hatására qPCR segítségével. Az ábrákon a vizsgált miRNS-ek relatív expressziós értékeit tüntettük fel a kezeletlen kontroll (K), és a kezelt (E2, ZEA vagy BPA) minták esetében. a: $p < 0,05$, Student t-teszt.

A ZEA kezelések hatására a miR-501-5p és miR-197-5p represszáldását szekvenálással és qPCR-ral is sikerült megerősíteni (17. ábra, 4. táblázat). A BPA kezelés hatására a miR-197-5p represszáldása volt megfigyelhető, amit azonban nem sikerült qPCR-ral megerősítenünk (17. ábra, 4. táblázat).

6.1.4. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására megváltozott expressziójú miRNS-ek funkcionális analízise

Mivel 1 miRNS több targettel is rendelkezhet, valamint egy adott mRNS-ről folyó fehérjeszintézist is több miRNS befolyásolhatja, ezért a sejtekben a miRNS-ekhez köthető biológiai folyamatok miRNS-mRNS interakciós hálózatokként működnek. Az egyes kezelések hatására elmozdulást mutató miRNS-ek között megvalósuló hálózatokat a miRNet szoftver segítségével azonosítottuk, amely a miRTarBase v8.0 adatbázison alapul (18. ábra). A legnagyobb hálózat az E2 kezelések hatására megváltozott expressziójú miRNS-ek, valamint ezek targetjei között rajzolódott ki (18. ábra, 5. táblázat). A ZEA kezelésre érzékeny miRNS-ek és a targetjeik szintén kiterjedt hálózatot alkottak (18. ábra, 5. táblázat). A legkisebb hálózat a BPA kezelés hatására volt megfigyelhető (18. ábra, 5. táblázat). Érdeemes megemlíteni, hogy a miR-501-5p és miR-197-5p – amely mind az E2, mind a ZEA kezelés hatására repressziót mutatott az RNS szekvenálás és qPCR méréseink során egyaránt – magas degree és betweenness értékekkel rendelkezett, ami ezen miRNS-ek, a kialakult hálózatban betöltött jelentős szerepére utal (18. ábra, 5. táblázat).



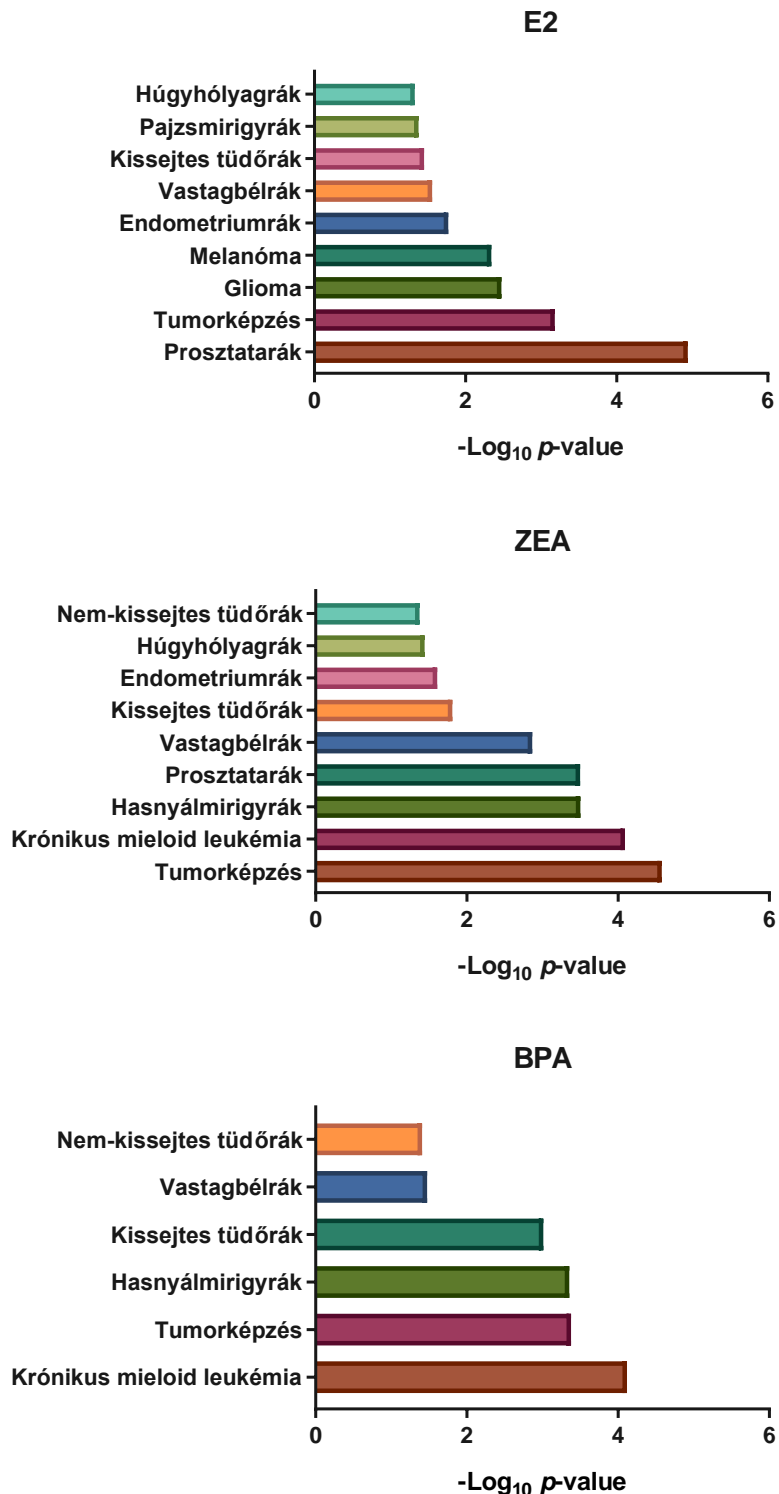
18. ábra. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására változott expressziót ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$; $\text{Log}_2\text{FC} < -1$) mutató miRNS-ek között megvalósuló hálózatok. A kék négyzetek a vizsgált miRNS-eket, míg a rózsaszín pontok a kölcsönható fehérjéket szimbolizálják.

5. táblázat. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására változott expressziót ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$; $\text{Log}_2\text{FC} < -1$) mutató miRNS-ek degree és betweenness értékei az egymással kölcsönható miRNS–mRNS hálózatban. Az egy csomóponthoz tartozó degree (Deg.) érték a szomszédos csomópontokkal való kölcsönhatások számát jelenti. A betweenness érték (Betw.) az adott csomópont hálózatban betöltött központi jellegét adja meg az alapján, hogy hány útvonal halad át rajta.

E2			ZEA			BPA		
miRNS	Deg.	Betw.	miRNS	Deg.	Betw.	miRNS	Deg.	Betw.
miR-1305	195	141840	miR-501-5p	158	48544	miR-320c	108	19875
miR-501-5p	158	107695	miR-3620-3p	95	41791	miR-197-5p	68	13869
miR-326	138	96436	miR-197-5p	68	27959	miR-590-5p	66	20688
let-7g-3p	106	43469	miR-3661	49	16350			
let-7a-2-3p	102	40279	miR-451a	31	11295			
miR-197-5p	68	46136						
miR-3679-5p	63	45319						
miR-26a-2-3p	59	42825						
miR-582-3p	55	39732						

A különböző kezelésekre elmozdulást mutató miRNS-ek által kialakított hálózatoknál funkcionális géndúsulási analízist végeztünk a miRNet szoftver segítségével, a GO_BP, KEGG és a Reactome adatbázisokban szereplő adatokat alapul véve. A GO_BP adatbázis alapján a kezelések hatására megváltozott expressziójú miRNS-ek szerepet játszhatnak számos, a tumorok képződéséhez és inváziójához köthető folyamatban (Márton és mtsai, 2023; 6., 7., 8. Kiegészítő táblázat). Az E2 hatására reagáló miRNS-ek targetjei tk. a sejtproliferáció ($p=0,000649$), a sejtciklus ($p=0,00107$), a sejtmetabolizmus ($p=0,000339$), az apoptózis ($p=0,000525$), a sejtadhézió ($p=0,000898$) és a sejtmigráció ($p=0,00176$) szabályozásában mutattak dúsulást (Márton és mtsai, 2023; 6. kiegészítő táblázat). A ZEA hatására a bioszintetikus folyamatok ($p=0,00229$), a sejtmetabolizmus ($p=0,00258$), a mitózis G1 fázisa ($p=0,00334$), a sejtnövekedés ($p=0,00883$), a programozott sejthalál ($p=0,000466$), az apoptózis ($p=0,000396$) és a sejtmigráció ($p=0,012$) folyamatai dúsultak (Márton és mtsai, 2023; 7. kiegészítő táblázat). A BPA kezelés hatására pedig ugyancsak a bioszintetikus folyamatok ($p=0,00000122$), a fejlődés ($p=0,0000117$), a sejtmetabolizmus ($p=0,0000558$), a sejtdifferenciáció ($p=0,00162$), a sejtnövekedés ($p=0,0018$), az epiteliális- mesenchymalis átalakulás ($p=0,00617$) és a tmigrációs ($p=0,00592$) folyamatokban tapasztaltunk dúsulást (Márton és mtsai, 2023; 8. kiegészítő táblázat). Mindezek mellett a KEGG adatbázissal végzett vizsgálatok alapján a miRNS-mRNS interakciók dúsulást mutattak számos daganattípus

kialakulását segítő folyamatban, melyek között több hormonfüggő daganat is szerepel (pl. prosztatatarák, endometriumrák, pajzsmirigyrák) (19. ábra).



19 ábra. Az E2, ZEA és BPA kezelések hatására változott expressziót ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$; $\text{Log}_2\text{FC} < -1$) mutató miRNS-ek és a velük kölcsönható gének hálózatán végzett funkcionális géndúsulási analízis eredménye. A funkcionális géndúsulási analízist a miRNet program segítségével végeztük, a KEGG adatbázist alapul véve.

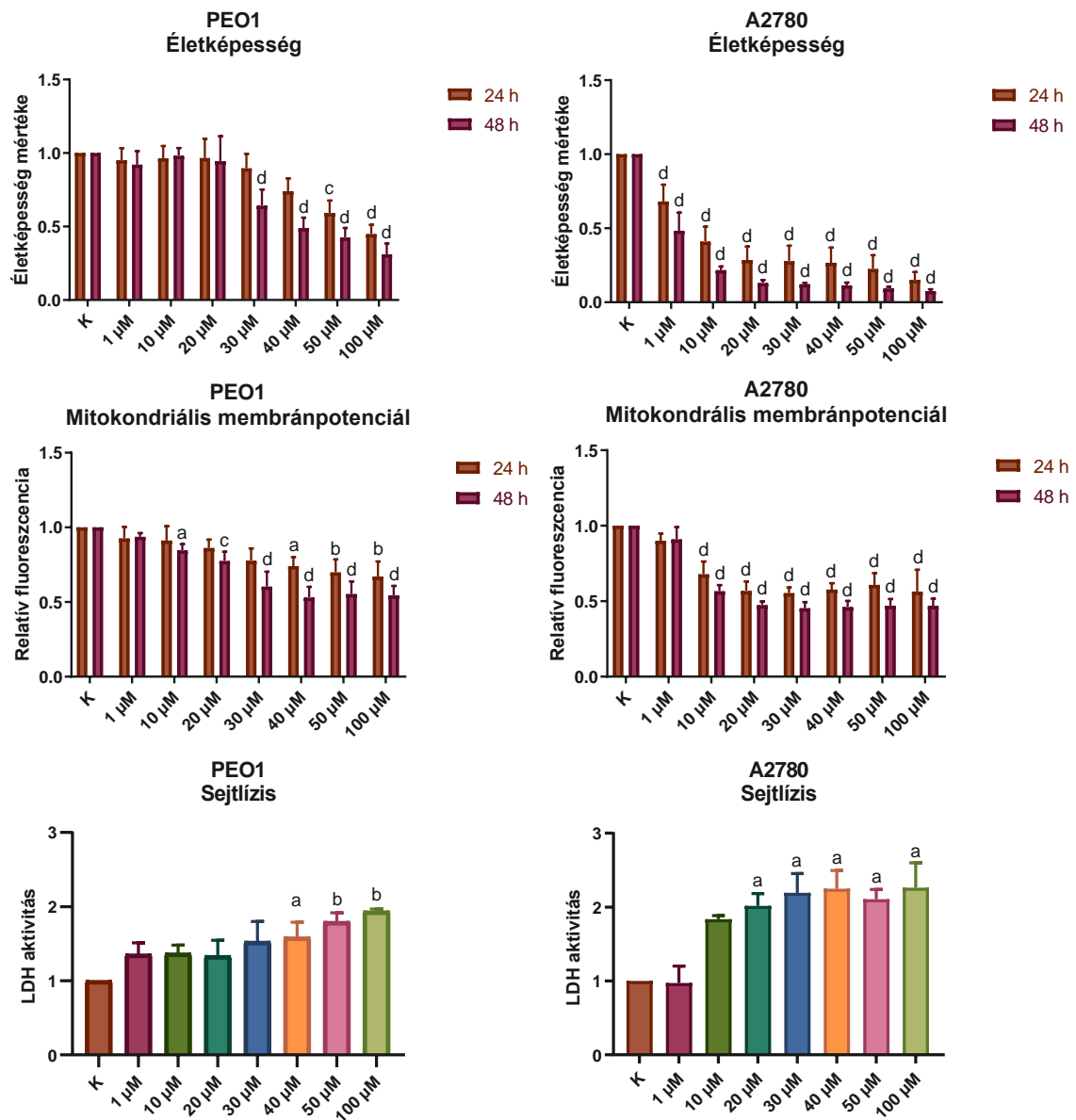
6.2. Magas dózisú ösztrogén kezelések ovárium sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata

6.2.1. A nagydózisú ösztrogén kezelés patofiziológiai jellemzőkre gyakorolt hatásának vizsgálata

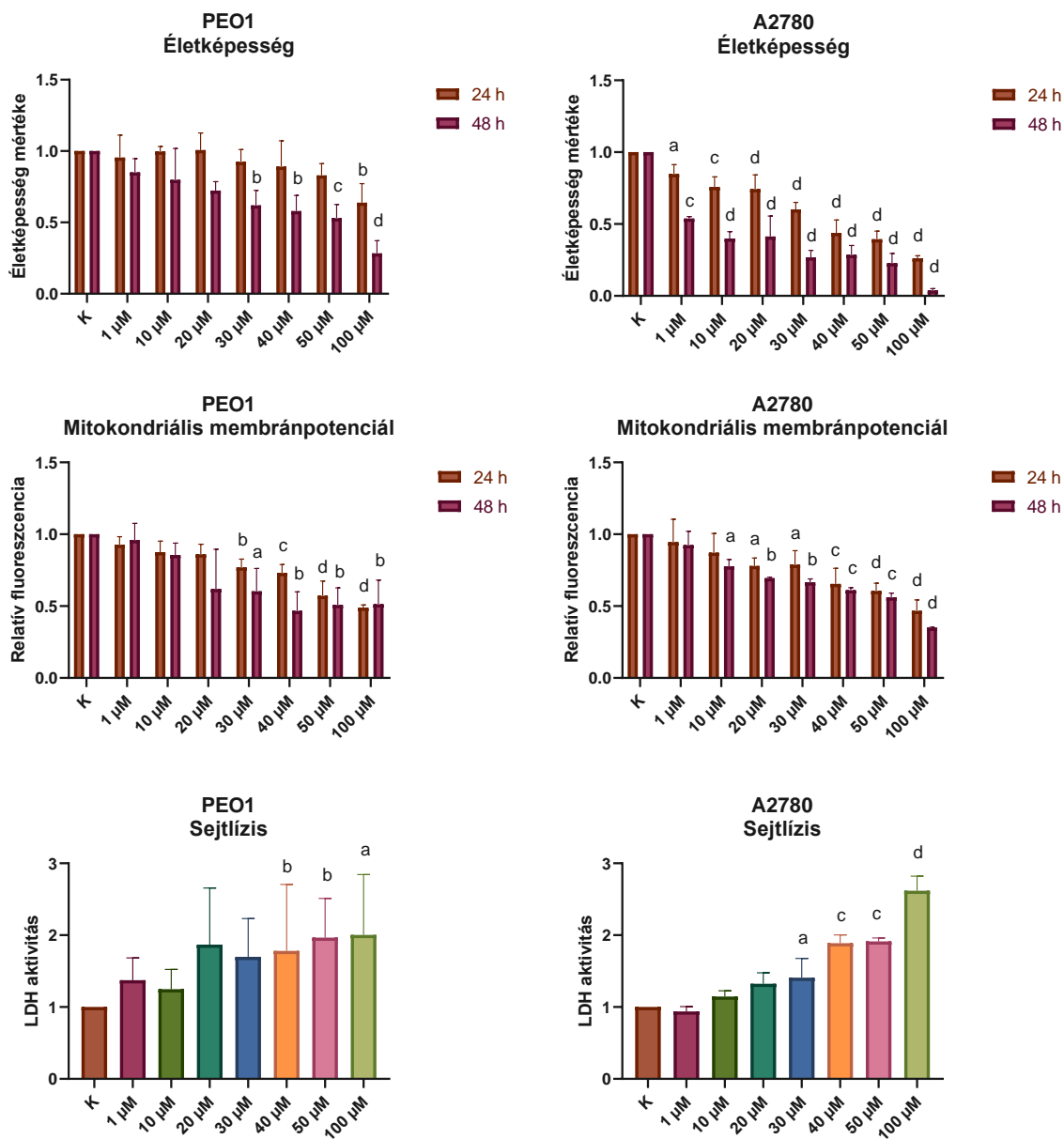
Munkánk folytatásában megvizsgáltuk a xenoösztrogének magas dózisban kiváltott hatását, amelyet itt is az E2 által kiváltott válasszal hasonlítottunk össze. Ezen kísérletekbe a PEO1 sejtvonal mellett az A2780 sejtvonalat is bevontuk, amely egy ER α -t nem expresszáló sejtvonal, ebből következően korábbi kísérleteink alkalmával az alacsony dózisú ösztrogén kezelések proliferációt és migrációt fokozó hatása sem érvényesült nála (Márton és mtsai, 2020). A nagy dózisú kezelések fenotípusos hatásának vizsgálatakor az alábbi paramétereket monitoroztuk: (i) az életképesség mértékét; (ii) a mitokondriális membránpotenciál csökkenését, ami a korai apoptotikus folyamatok markere; valamint (iii) a sejtlízis előfordulását, amelyről a sejtek felülúszójában mérhető LDH aktivitás adott információt. Ezen paramétereket 24 h és 48 h-val a kezeléseket követően is meghatároztuk.

Eredményeink alapján a nagy dózisú ösztrogén kezelések csökkentették az életképesség mértékét, valamint sejthalált indukáltak (20. ábra). A két sejtvonal toleranciája azonban nagyban különbözött. Ahogyan a 20. ábrán látható a PEO1 sejtvonal jobban tolerálta a nagy dózisú E2 kezelést. Ugyanis az életképesség csökkenése 30 μ M, míg az apoptózis 10 μ M dózis fölött jelentkezett, sejtlízis pedig 40 μ M-nál volt megfigyelhető a kezeléseket 48 h-val követően (20. ábra). Ugyanakkor az A2780 sejtvonal a PEO1-nél jóval nagyobb érzékenységet mutatott az E2 kezelés toxikus hatásával szemben. Itt már 1 μ M E2 is az életképesség szignifikáns csökkenését vonta maga után a 24 h-s tenyészetekben, továbbá a sejtlízis már 20 μ M E2 kezelés hatására is detektálható volt (20. ábra).

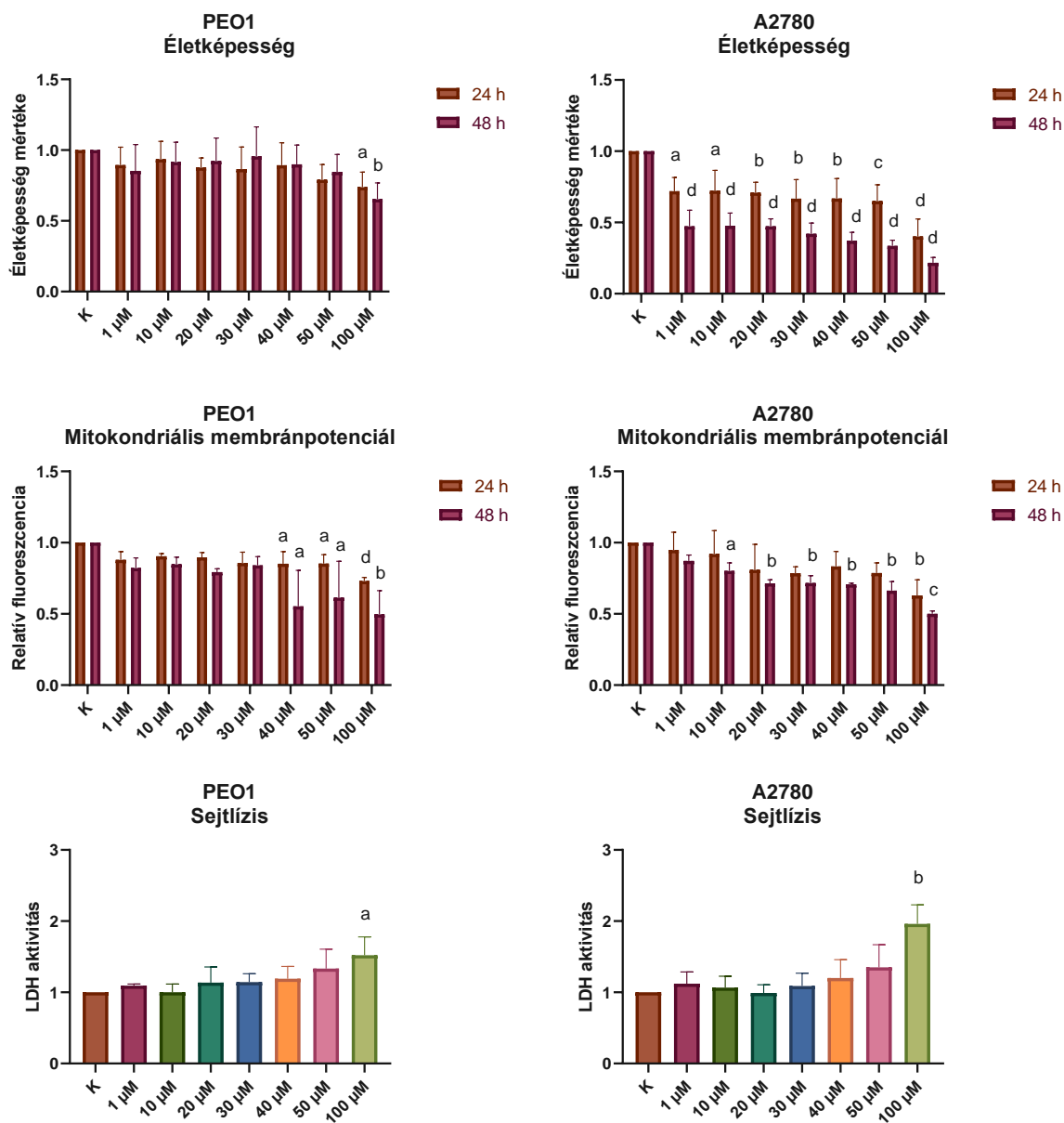
A nagy dózisú E2 kezelés által kiváltott hatásokat összehasonlítottuk a ZEA és a BPA által kiváltott hatásokkal. Ekkor ugyanolyan kísérleti körülményeket és kezelési dózisokat alkalmaztunk, mint korábban az E2-nál. Eredményeink alapján a nagydózisú ZEA kezelések életképességet, valamint sejthalált befolyásoló hatása hasonlóan alakult az E2 által kiváltott változásokhoz (21. és 22. ábra). Azaz a PEO1 sejtvonal ZEA-val történő kezelése esetében az életképesség csökkenése 30 μ M dózis fölött jelentkezett, valamint 40 μ M-nál magasabb dózisonál a sejtlízis megjelenése is megfigyelhető volt (48 h) (21. ábra). Ugyanakkor a BPA toxicitása jóval alacsonyabbnak bizonyult a PEO1 sejtvonal esetében, az életképesség mértékének csökkenése, valamint a sejtlízis 100 μ M dózisonál, míg az apoptózis 40 μ M dózis fölött volt megfigyelhető (22. ábra).



20. ábra. Az életképesség, az apoptózis és a sejtlízis mértékének vizsgálata a PEO1 és az A2780 sejtvonalakban nagy dózisú E2 kezelések hatására. Az életképesség és a mitokondriális membránpotenciál csökkenésének mértékét (24 h és 48 h a kezeléseket követően), valamint a felülúszó LDH aktivitásának növekedését (48 h a kezeléseket követően) határoztuk meg. Az eredményeket minden esetben a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítottuk. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.



21. ábra. Az életképesség, az apoptózis és a sejtlízis mértékének vizsgálata a PEO1 és az A2780 sejtvonalakban nagy dózísú ZEA kezelésekre hatására. Az életképesség és a mitokondriális membránpotenciál csökkenésének mértékét (24 h és 48 h a kezeléseket követően), valamint a felülúzó LDH aktivitásának növekedését (48 h a kezeléseket követően) határoztuk meg. Az eredményeket minden esetben a kezeltlen kontroll mintákhoz viszonyítottuk. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.



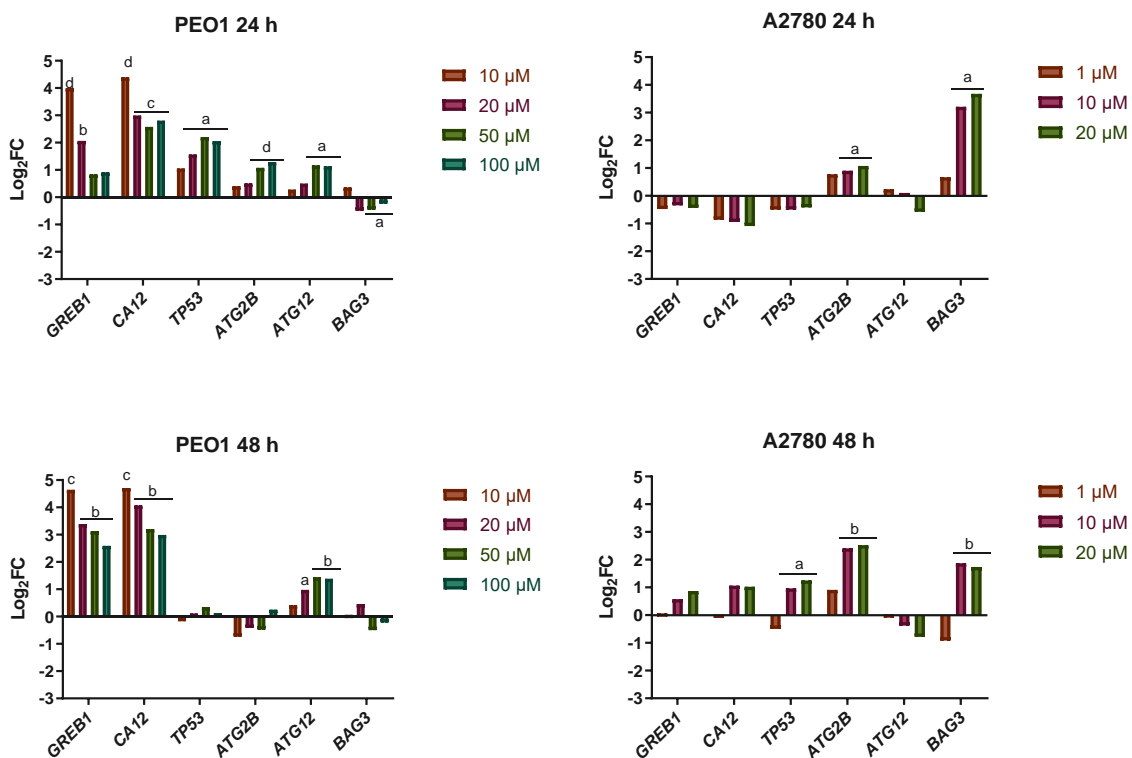
22. ábra. Az életképesség, az apoptózis és a sejtlízis mértékének vizsgálata a PEO1 és az A2780 sejtvonalakban nagy dózisú BPA kezelések hatására. Az életképesség és a mitokondriális membránpotenciál csökkenésének mértékét (24 h és 48 h a kezeléseket követően), valamint a felülúszó LDH aktivitásának növekedését (48 h a kezeléseket követően) határoztuk meg. Az eredményeket minden esetben a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítottuk. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.

Az A2780 sejtvonal ugyancsak kevésbé tolerálta a ZEA és BPA kezelések toxikus hatását. Az E2-hoz hasonlóan az életképesség csökkenése már 1 μM dózis hatására is megfigyelhető volt mindkét molekula hatására (24 h) (21. és 22. ábra). Emellett a ZEA, az E2-hoz hasonló mértékű sejtlízist indukált (21. ábra). Összességében tehát elmondható, hogy a ZEA kezelések

képesek az E2-hoz hasonló fenotípusos változásokat okozni az ovárium sejtvonalakban magasabb koncentrációtartományban is. Valamint a PEO1 és az A2780 sejtvonalak között megfigyelt érzékenységbeli különbségek a ZEA és BPA kezelések esetében is megmutatkozik (21. és 22. ábra).

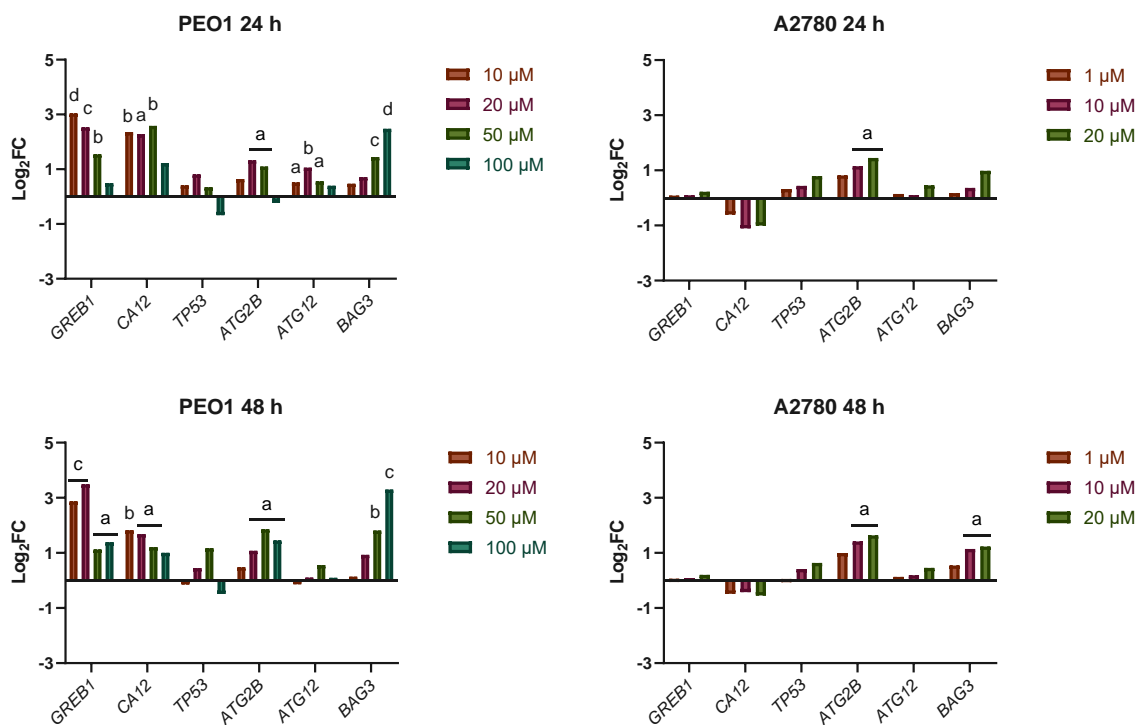
6.2.2. A nagy dózisú ösztrogén kezelés génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata

A nagy dózisú ösztrogén kezelések hatására megfigyelt fenotípusos változások transzkripcionális hátterének megértése érdekében megvizsgáltuk a *GREB1*, *CA12*, *TP53*, *ATG2B*, *ATG12* és *BAG3* gének expressziós változását a kezelések hatására. Az ER α -mediálta ösztrogén válasz indukálódását a korábbi méréseink alkalmával megbízhatóan jellemezték a *GREB1* és a *CA12* gének. Az apoptózis megindulását a *TP53*, míg az autofágia jelenlétét az *ATG2B*, az *ATG12* és a *BAG3* gének expresszióján keresztül monitoroztuk. Ezen gének ER-ok általi szabályozását korábbi vizsgálatok már igazolták (Berger és mtsai, 2012; Felzen és mtsai, 2015; Xiang és mtsai, 2019).



23. ábra. A nagy dózisú E2 kezelés génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata a PEO1 és az A2780 sejtvonalakban. Az ábrákon a vizsgált gének expressziójának a változását a Log₂FC értékekkel jellemeztük. Az RNS izolálás az E2 kezeléseket 24 h és 48 h-val követően történt. A szignifikancia szintjének meghatározását a kezelt és a kezeletlen kontroll minták Δ CT értékeinek összevetésével végeztük. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.

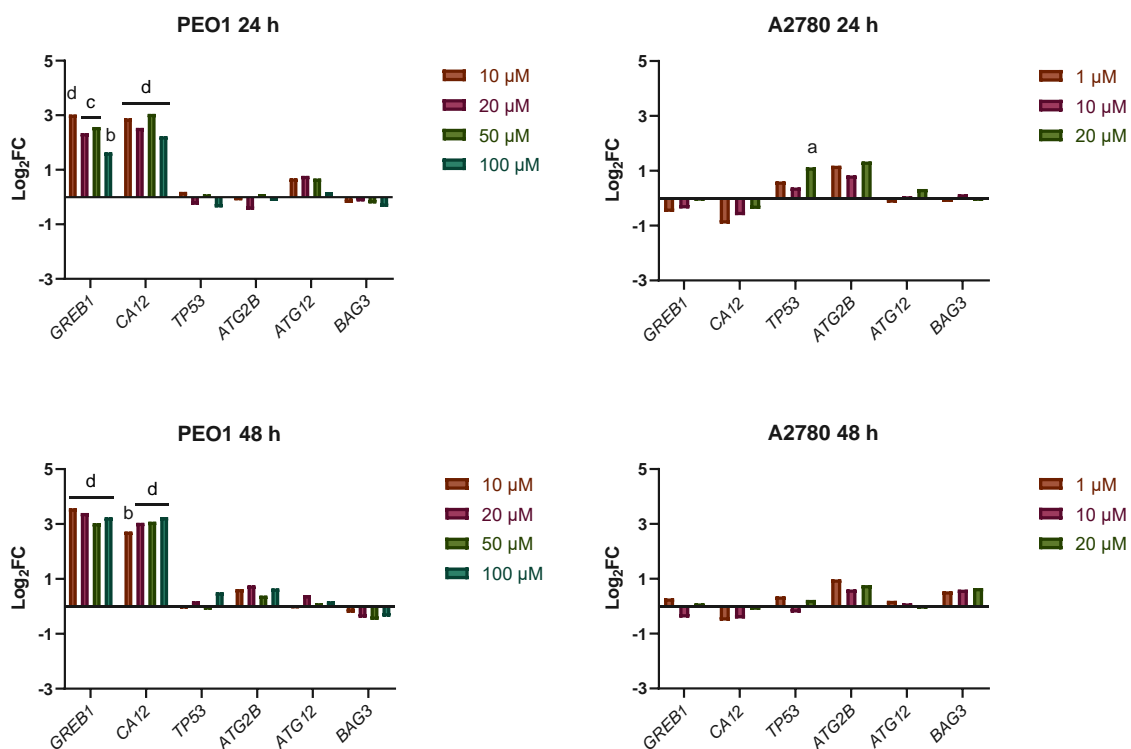
A PEO1 sejtvonal esetében a nagy dózisu E2 kezelés a *GREB1* és a *CA12* gének indukcióját váltotta ki, ami az ER α -mediált ösztrogén válasz megindulására utal. Érdemes megemlíteni, hogy ezen gének indukciója még 50 μ M dózis fölött is megfigyelhető volt a 48 h-s tenyészetekben, azonban az indukció mértéke alacsonyabbnak bizonyult, mint a kisebb dózisoknál (23. ábra). Emellett a *TP53* gén dóziszfüggő indukciót mutatott, ami jó összefüggésben van a kezelések hatására megfigyelhető mitokondriális membránpotenciál csökkenésével (20.,23. ábra). Az autofágiához köthető *ATG12* és *ATG2B* gének esetében szintén dóziszfüggő indukció volt jellemző, amely ezen folyamat jelentőségére utal körülményeink között (23. ábra). Az A2780 sejtvonal esetében nem volt megfigyelhető a *GREB1* és a *CA12* gének indukciója az E2 kezelés hatására, ami jó összhangban van az ER α hiányával. Ugyanakkor az *ATG2B* és a *BAG3* gének jelentős mértékű indukciót mutattak, ami arra utal, hogy az ezen sejtvonalnál tapasztalt sejthalál leginkább az autofágia következménye lehet (23. ábra).



24. ábra. A nagydózisú ZEA kezelés génextpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata a PEO1 és az A2780 sejtvonalakban. Az ábrákon a vizsgált gének expressziójának a változását Log₂FC értékekkel jellemeztük. Az RNS izolálás a ZEA kezeléseket 24 h és 48 h-val követően történt. A szignifikancia szintjének meghatározását a kezelt és a kezeletlen kontroll minták Δ CT értékeinek összevetésével végeztük. a: p < 0,05; b: p < 0,01; c: p < 0,001; d: p < 0,0001.

A génextpressziós elmozdulásokat a PEO1 és az A2780 sejtvonalak esetében a ZEA és a BPA kezeléseket követően is detektáltuk (24., 25. ábra). A *GREB1* és a *CA12* gének

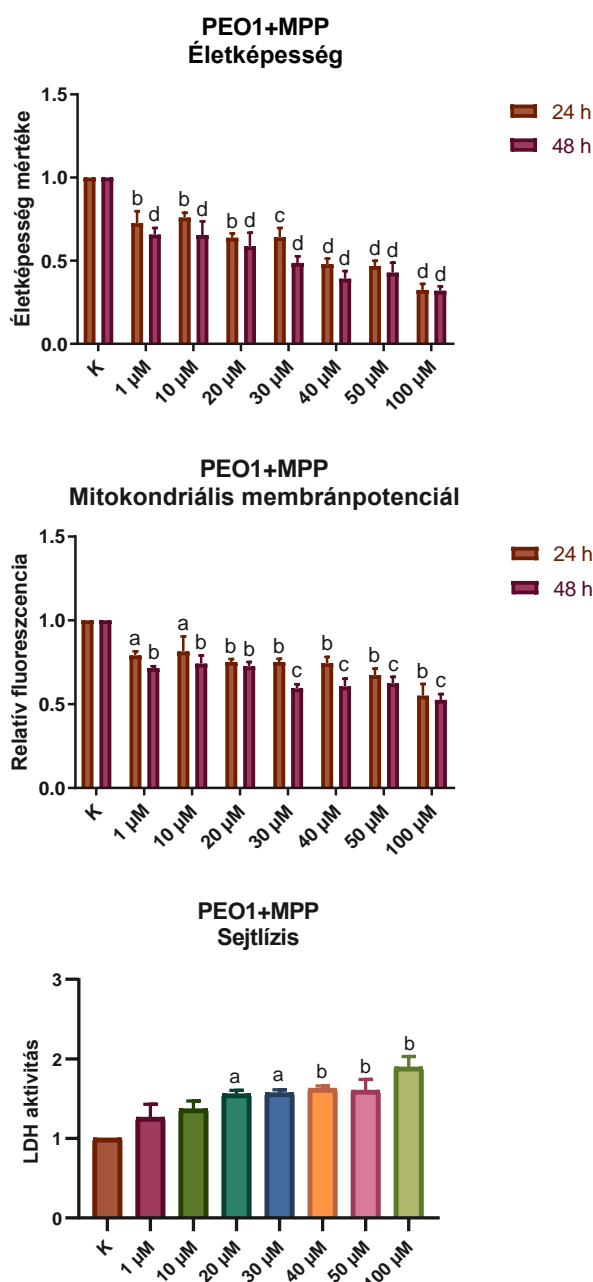
expressziója a ZEA és a BPA kezelések hatására ugyancsak emelkedett a PEO1 sejtvonalban (24., 25. ábra). Érdekes azonban megemlíteni, hogy az indukció mértéke elmaradt az E2 kezelésekénél tapasztaltaktól a 10 μM -os kezelés esetében (23., 24., 25. ábra). Ugyancsak érdekes jelenség, hogy a BPA esetében az indukció mértéke hasonlóan alakult a különböző dózisokban, ami azzal lehet összefüggésben, hogy ezen molekula fenotípusos hatása sem mutatott jelentős dóziszfüggő mintázatot (25. ábra). Emellett megfigyelhető volt az *ATG2B* és a *BAG3* gének dóziszfüggő indukciója a ZEA hatására, ami az E2-nál tapasztaltakhoz hasonlóan az autofágia jelentőségére utal (24. ábra). A BPA azonban nem váltott ki jelentős indukciót a sejthalálért felelős gének esetében a PEO1 sejtvonalnál (25. ábra).



25. ábra. A nagy dózisú BPA kezelés génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata a PEO1 és az A2780 sejtvonalakban. Az ábrákon a vizsgált gének expressziójának a változását Log₂FC értékekkel jellemeztük. Az RNS izolálás a BPA kezeléseket 24 h és 48 h-val követően történt. A szignifikancia szintjének meghatározását a kezelt és a kezeletlen kontroll minták ΔCT értékeinek összevetésével végeztük. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.

Az A2780 sejtvonal esetében a ZEA és BPA kezelések hatására sem volt megfigyelhető a *GREB1* és *CA12* gének indukálódása, tehát feltehetően – az E2-nál tapasztaltakhoz hasonlóan – ezen kezelések sem váltották ki az ER α -mediált ösztrogén hatást (24., 25. ábra). Azonban az *ATG2B* és *BAG3* gének indukciója az autofágia jelentőségét jelzi a ZEA kezelés fenotípusos hatásában is (24. ábra).

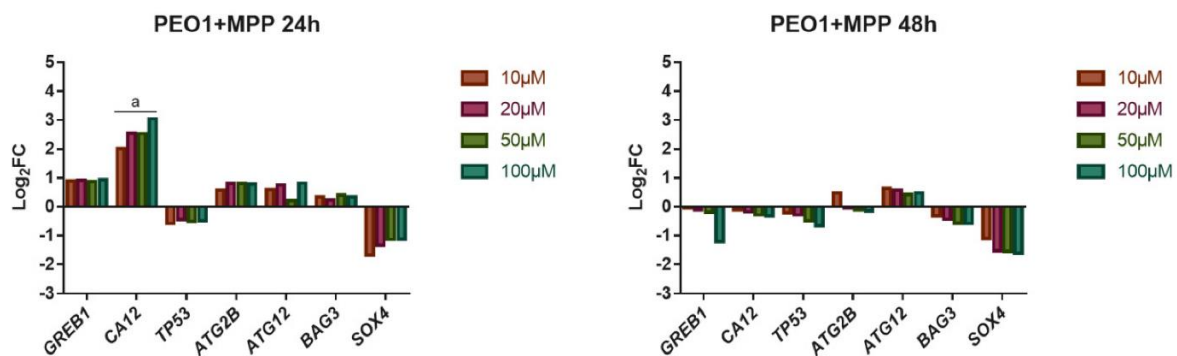
6.2.3. Az ER α -mediált ösztrogén válasz jelentőségének vizsgálata a nagy dózisú ösztrogén kezelésre mutatott tolerancia meghatározásában



26. ábra. Az életképesség, apoptózis és a sejtlízis mértékének vizsgálata a PEO1 sejtvonalban nagy dózisú E2 kezelés hatására, 10 nM MPP (methyl-piperidino-pyrazole) jelenlétében. Az életképesség és a mitokondriális membránpotenciál csökkenésének mértékét (24 h és 48 h a kezeléseket követően), valamint a felülúszó LDH aktivitásának növekedését (48 h a kezeléseket követően) határoztuk meg. Az eredményeket minden esetben a kezeltetlen kontroll mintákhoz viszonyítottuk. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.

Eredményink alapján azt feltételeztük, hogy a PEO1 sejtvonal, nagy dózisú ösztrogén molekulákkal szemben mutatott toleranciájának oka, hogy azok még viszonylag magas, 10-20 μM dózisban is képesek az ER α -mediált ösztrogén válasz elindítására, ami hozzájárulhat a proliferáció fenntartásához. Ezen útvonal azonban nem működik az A2780 sejtvonal esetében, így a nagy dózisú kezelések toxikus hatása dominál. Ezen hipotézisünk tesztelése érdekében a PEO1 sejtvonalnál a nagy dózisú E2 kezelést elvégeztük 10 nM MPP jelenlétében is, ami egy ER α specifikus antagonistá (Sun és mtsai, 2002) (26. ábra).

Ahogy az a 27. ábrán látható az MPP alkalmazása esetén nem indukálódott az ER α -mediált ösztrogén válasz, amit a *GREB1* és a *CA12* gének indukciójának elmaradása jelzett (27. ábra). Emellett feltehetően az E2 proliferációra gyakorolt inductív hatása sem jelentkezett, ami már 1 μM dózisonál az életképesség csökkenéséhez vezetett, 20 μM felett pedig már intenzív sejtlízist detektálhattunk (26. ábra). Érdekes azonban megjegyezni, hogy az MPP alkalmazása ugyan csökkentette a PEO1 toleranciáját, azonban az érzékenység nem csökkent az A2780 sejtvonalnál tapasztalt mértékig, ami arra utal, hogy ezen sejtvonal stresszel szemben mutatott nagyobb fokú érzékenységének alakulásában más, eddig nem azonosított tényezők is szerepet kaphatnak. Ezek felderítése további vizsgálataink tárgyát képezi.



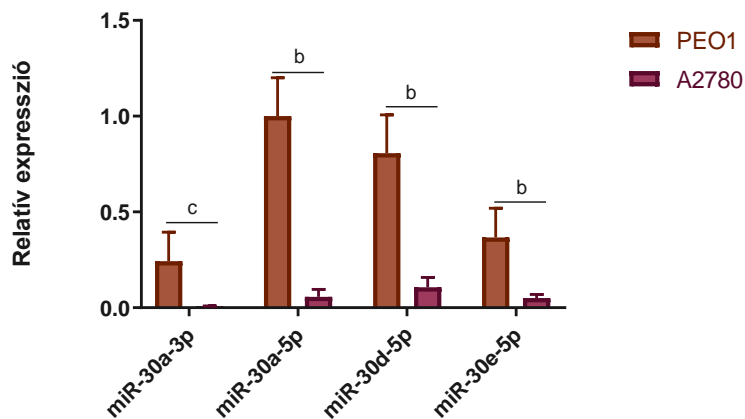
27. ábra. A nagy dózisú E2 kezelés génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata a PEO1 sejtvonalban 10 nM MPP jelenlétében. Az ábrákon a vizsgált gének expressziójának a változását Log₂FC értékekkel jellemeztük. Az RNS izolálás az E2 (10 μM -100 μM) és MPP (10 nM) kezeléseket 24 h és 48 h-val követően történt. A szignifikancia szintjének meghatározása a kezelt és a kezeletlen kontroll minták ΔCT értékeinek összevetésével történt. a: $p < 0,05$.

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

6.3.1. A miR-30 család expressziójának analízise

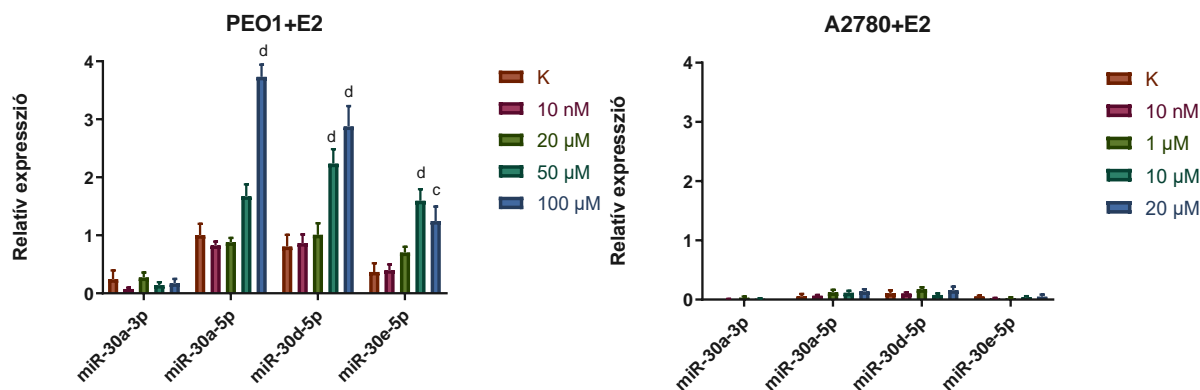
Munkánk következő lépésében megvizsgáltuk a miR-30 családba tartozó miRNS-ek, ovárium sejtek ösztrogén válaszára gyakorolt esetleges szerepét. A miR-30-as családba 6 miRNS tartozik: a miR-30a, miR-30b, miR-30c-1, miR-30c-2, miR30d és a miR-30e (Mao és

mtsai, 2018). Ezek közül a miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-30d-5p és a miR-30e-5p expresszióját monitoroztuk, mely miRNS-ek más sejtvonalakban fontosnak bizonyultak a proliferáció és/vagy a sejthalál szabályozásában (Mao és mtsai, 2018). Korábbi tapasztalataink alapján a miRNS-ek alap expressziója különbözhet az egyes sejtvonalakban, ezért első lépésben összehasonlítottuk ezen miRNS-ek alap expresszióját az általunk alkalmazott PEO1 és A2780 sejtvonalakban. Amint a 28. ábrán látható, mind a 4 miRNS alap expressziója a PEO1-ben volt magasabb, amiből arra következtethetünk, hogy ezen miRNS-ek nagyobb biológiai relevanciával rendelkezhetnek az ER α -t expresszáló, ösztrogén szenzitív PEO1 sejtvonalban.



28. ábra. A miR-30-as családba tartozó miRNS-ek alap expressziójának összehasonlítása a PEO1 és az A2780 sejtvonalakban. Az adatok a párhuzamos mérések során kapott eredmények átlagát és szórását prezentálják. A szignifikancia szintjének meghatározása a PEO1 és A2780 sejtvonalból származó minták Δ CT értékeinek összevetésével történt a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.

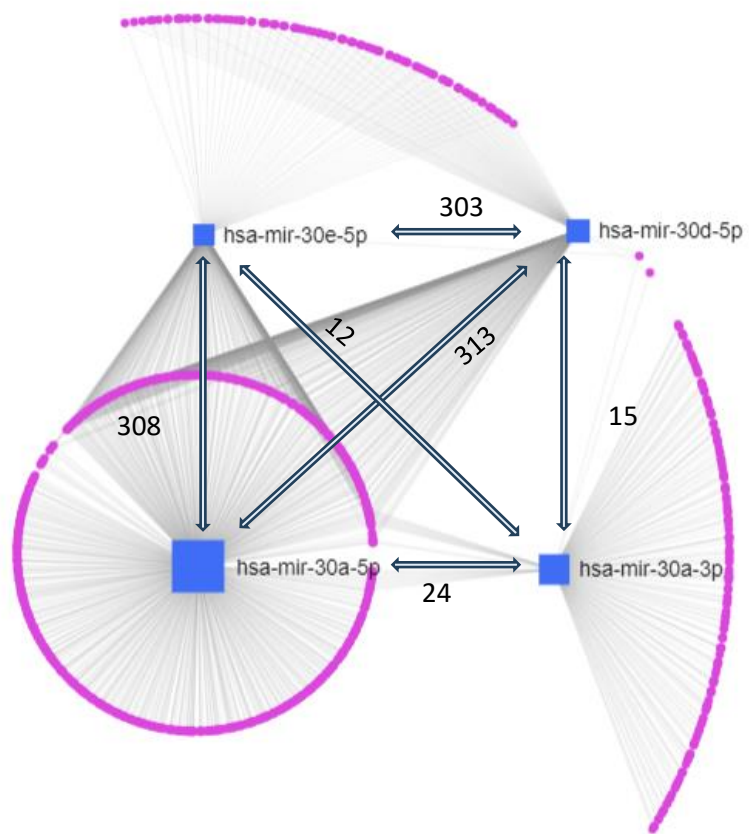
Ezt követően a miR-30-as molekulák expressziójának változását E2 kezelés hatására is megvizsgáltuk, melyet a korábban fenotípusos hatást kiváltó alacsony (10 nM) és magasabb (1 μ M -100 μ M) tartományban is elvégeztünk. A PEO1 sejtvonalnál a 10 nM E2 kezelés nem befolyásolta ezen miRNS-ek expresszióját. Azonban amikor a kezelést magasabb, korábbi vizsgálataink alkalmával sejthalált kiváltó dózisban (50 μ M -100 μ M) alkalmaztuk, a miR-30a-5p, miR-30d-5p és miR-30e-5p miRNS-ek expressziójának az emelkedése volt megfigyelhető (29. ábra). Ugyanakkor ezen miRNS-ek jellemzően alacsony expressziója nem mutatott szignifikáns változást az E2 kezelésekre az A2780 sejtvonalban (29. ábra).



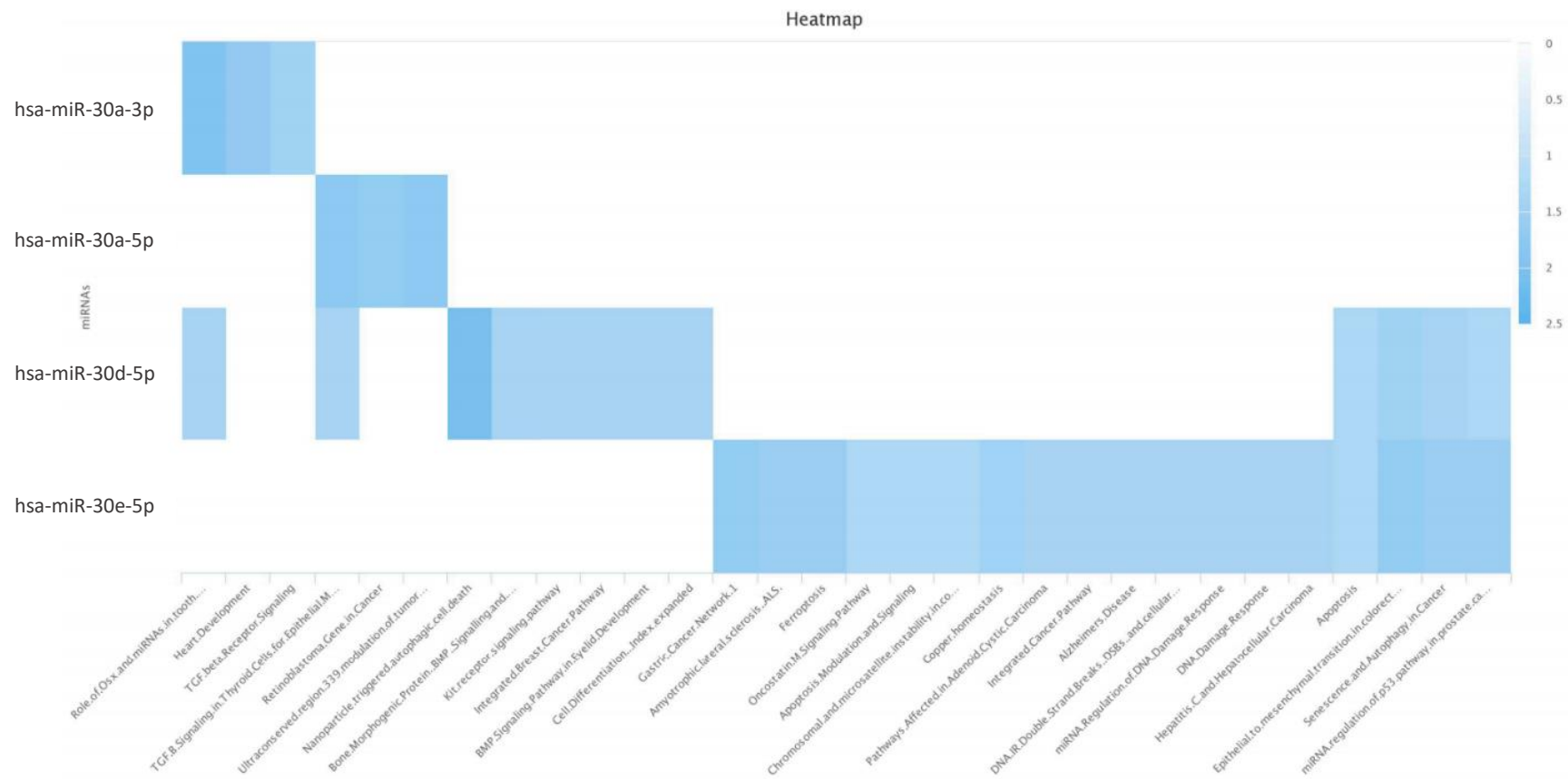
29. ábra. A miR-30-as családba tartozó miRNS-ek expressziója E2 kezelés hatására a PEO1 és az A2780 sejtvonalakban. Az adatok a párhuzamos mérések során kapott eredmények átlagát és szórását prezentálják. A szignifikancia szintjének meghatározása a kezelt és a kezeletlen kontroll minták Δ CT értékeinek összehasonlításával történt: a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.

6.3.2. A miR-30 család bioinformatikai analízise

A miR-30a-5p, miR-30d-5p és miR-30e-5p expressziójának változása az E2 kezelés hatására felveti ezen miRNS-ek szerepét az E2 által kiváltott sejthalál szabályozásában. Ezen hipotézis megerősítése érdekében bioinformatikai elemzést végeztünk. Első lépésben megnéztük, hogy a miR-30a-5p, miR-30a-3p, miR-30d-5p és miR-30e-5p hány közös targettel rendelkezik, melyhez a miRNet programot használtuk (30. ábra). Amint az ábrán látható, a miR-30a-3p csupán 24, 15, ill. 12 targeten osztozik a miR-30a-5p, miR-30d-5p és miR-30e-5p molekulákkal. Azonban ezen utóbbiak lényegesen több közös targettel rendelkeznek (30. ábra). Ez magyarázatot adhat a miR-30a-3p, E2 kezelés hatására mutatott, többtől eltérő viselkedésére (29. ábra).

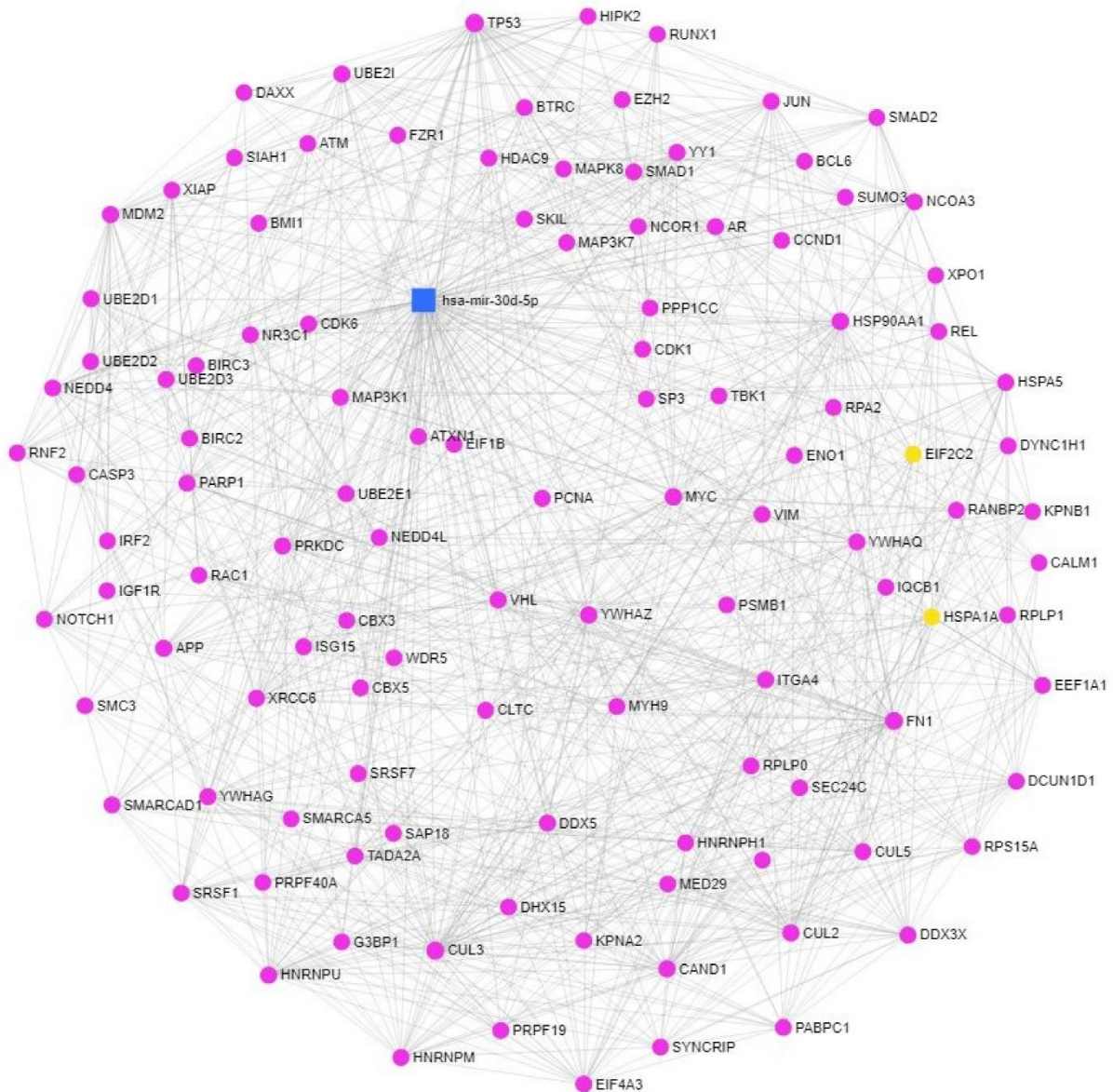


30. ábra. A miR-30a-5p, miR-30a-3p, miR-30d-5p, miR-30e-5p és targetjeik között kialakult hálózat (miRNET). A kék nyilak és a számok az egyes miRNS párok közös targetjeinek számát jelölik.



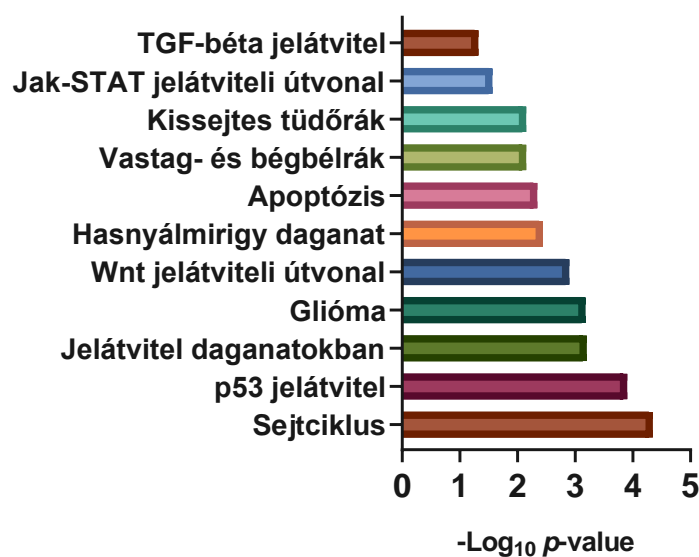
31. ábra. A miR-30-as család target génjeinek, molekuláris útvonalakban való funkcionális dúsulási analízise a miRPathDB és a miRTarBase 8.0 adabázis alkalmazásával.

Ezt követően a miRPathDB program segítségével funkcionális gén-dúsulási analízist végeztünk, amely a miRTarBase v8.0 adatbázison alapul. Csupán néhány találat rajzolódott ki a miR-30a-3p és a miR-30a-5p targetjeit vizsgálva. Azonban a miR-30d-5p és a miR-30e-5p targetjei közül több köthető a daganatok kialakulásához hozzájáruló folyamatokhoz. Külön kiemelendő, hogy a miR-30d-5p targetjei nagymértékű dúsulást mutattak a sejthalál szabályozásához köthető folyamatokban (apoptózis, autofágia) (31. ábra). Ezért a miR-30d-5p molekulát választottuk ki további vizsgálatainkhoz.



32. ábra. A miR-30d-5p és targetjei között kialakult hálózat. A gén–gén és fehérje-fehérje kölcsönhatások a miR-30d-5p és targetjei között a miRNet adatbázis segítségével lettek generálva.

Első lépésben a miRNet segítségével megalkottuk a miR-30d-5p targetjei között megvalósuló interakciós hálózatot (32. ábra). Érdemes megemlíteni, hogy ezen hálózatban a *TP53* gén rendelkezik a legnagyobb jelentőséggel a kapott degree (29) és betweenness (446) értékek alapján. A target géneket alapul véve funkcionális géndúsulási analízist végeztünk. A KEGG adatbázis adatai alapján számos ráktípus kialakulásához, valamint sejthalálhoz köthető folyamatban is dúsulás volt megfigyelhető (33. ábra, Varga és mtsai, 2022; Kiegészítő Táblázat 3). Emellett a Reactome adatbázis alapján ezen targetek dúsulást mutattak az apoptózis ($p=0,000757$) a sejtciklus ($p=0,00723$) és a PI3K kaszkád ($p=0,00894$) működésében (33. ábra, Varga és mtsai, 2022; Kiegészítő Táblázat 3).

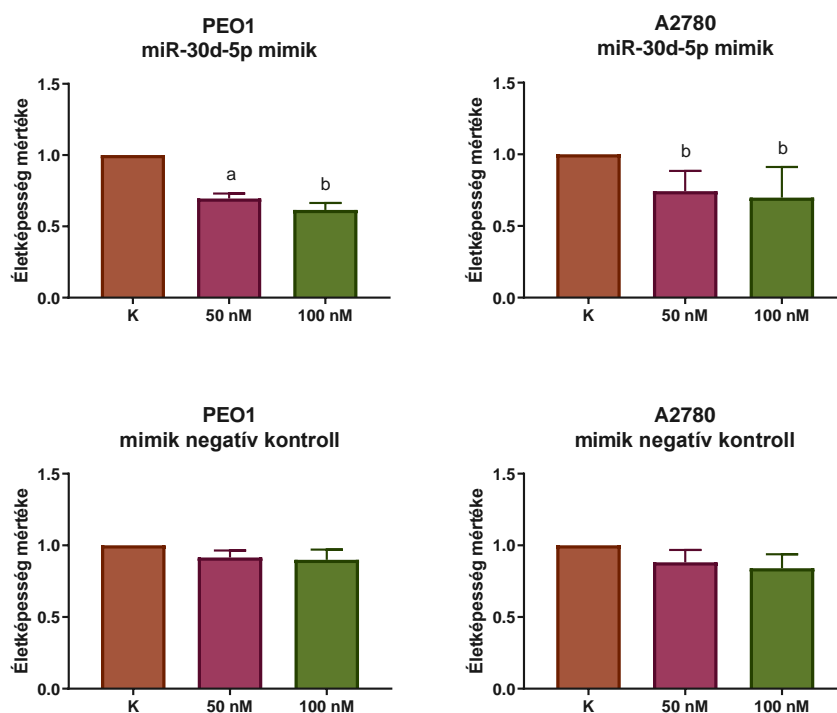


33. ábra. A miR-30d-5p és a target génjeinek a hálózatán végzett funkcionális géndúsulási vizsgálat eredménye. A funkcionális géndúsulási analízist a miRNet program segítségével végeztük, amely a KEGG adatbázison alapult. Az ábrán néhány, a daganatok kialakulásához köthető folyamat látható.

6.3.3. A miR-30d-5p funkcionális vizsgálata a PEO1 és A2780 sejtvonalakban

Az alábbi megfigyelések alapján a további vizsgálatainkhoz a miR-30d-5p-t választottuk: (i) ezen miRNS magas alapexpressziót mutatott a PEO1 sejtvonalban és jól reagált a nagy dózisú E2 kezelésekre, (ii) a miR-30d-5p target génjei számos olyan folyamatban érintettek, amelyek a sejtciklust és/vagy a sejthalál folyamatát szabályozzák, valamint (iii) számos egyéb daganatos sejtvonalban bizonyították a miR-30d-5p szerepét a sejtproliferáció gátlásában és a sejthalál indukálásában (Xu és mtsai, 2021; Yu és Liu, 2020; Zhang és mtsai, 2017/b). Mivel a miR-30d-5p ovárium sejtekre gyakorolt hatását illetően hiányos a szakirodalom, ezért megvizsgáltuk, hogy milyen hatást fejt ki a PEO1 és A2780 sejtvonalakra, ha a miR-30d-5p sejten belüli szintjét megemeljük. Ekkor miR-30d-5p mimikkal transzfektáltuk a sejteket (34.

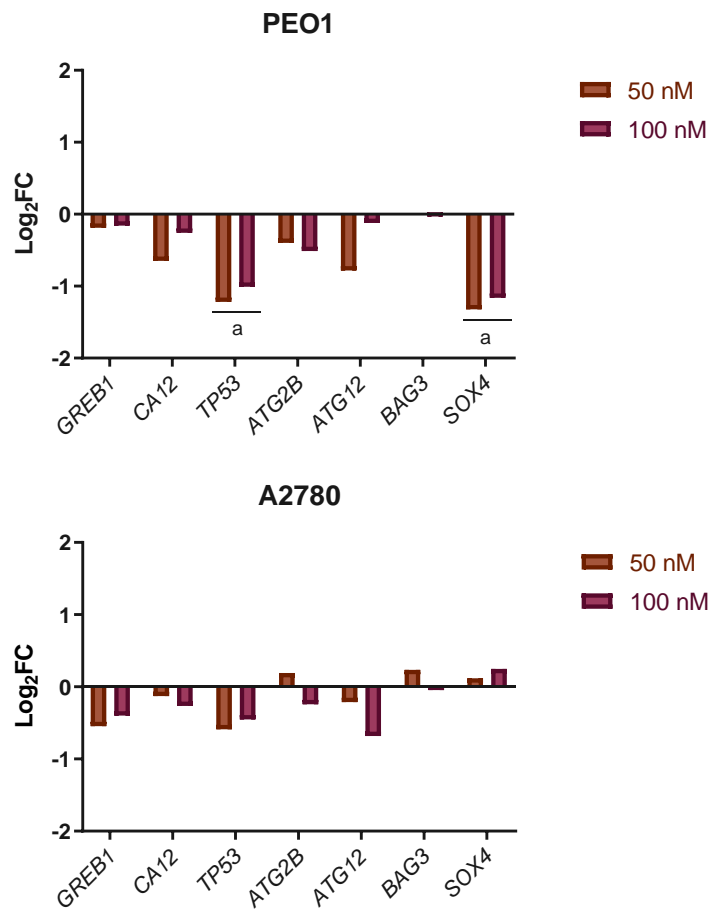
ábra). A transzfektálást 50 nM és 100 nM koncentrációban is elvégeztük, annak sikerességéről pedig qPCR-el győződünk meg. Ekkor az 50 nM és 100 nM koncentrációban végzett transzfektálást követően szignifikánsan magasabb miR-30d-5p expressziót detektáltunk, a PEO1 (Log₂FC: 8,56 és 8,65) és az A2780 (Log₂FC: 6,69 és 8,52) sejtvonalakban a nem-transzfektált sejtekhez viszonyítva. Fenotípusos vizsgálataink alkalmával a miR-30d-5p mimik csökkentette mindkét sejtvonal életképességét (34. ábra). Érdemes megemlíteni, hogy az életképesség nem csökkent szignifikáns mértékben, amikor a sejteket a negatív kontroll molekulával transzfektáltuk (34. ábra).



34. ábra. A miR30d-5p mimik PEO1 és A2780 sejtvonalak életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata. A sejteket 50 nM, vagy 100 nM miR-30d-5p mimikkel, ill. microRNA Mimic Negative Control-al transzfektáltuk, majd az életképesség mértékét 24 h-val később meghatároztuk. Az eredményeket minden esetben a kezeltlen kontroll mintákhoz viszonyítottuk a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$.

Megvizsgáltuk továbbá, hogy a miR-30d-5p mimikkel való transzfektálás hatással van-e a korábban, nagy dózisu E2 kezelésnél vizsgált gének alap expressziójára (35. ábra). Ekkor a PEO1 sejtvonalban a *TP53* expressziója mutatott csökkenést, amely összhangban van azzal a ténnyel, hogy ezen gén a miR-30d-5p target génei között szerepel (Kumar és mtsai, 2011) (35. ábra). Megvizsgáltuk továbbá a *SOX4* gént is, amely ezen miRNS másik validált targetje (Xu és mtsai, 2021). A *SOX4* gén szintje ugyancsak csökkenést mutatott a PEO1 sejtvonalban. A

többi vizsgált gén expressziójára azonban nem volt hatással a miR-30d-5p-vel való transzfektálás (35. ábra).

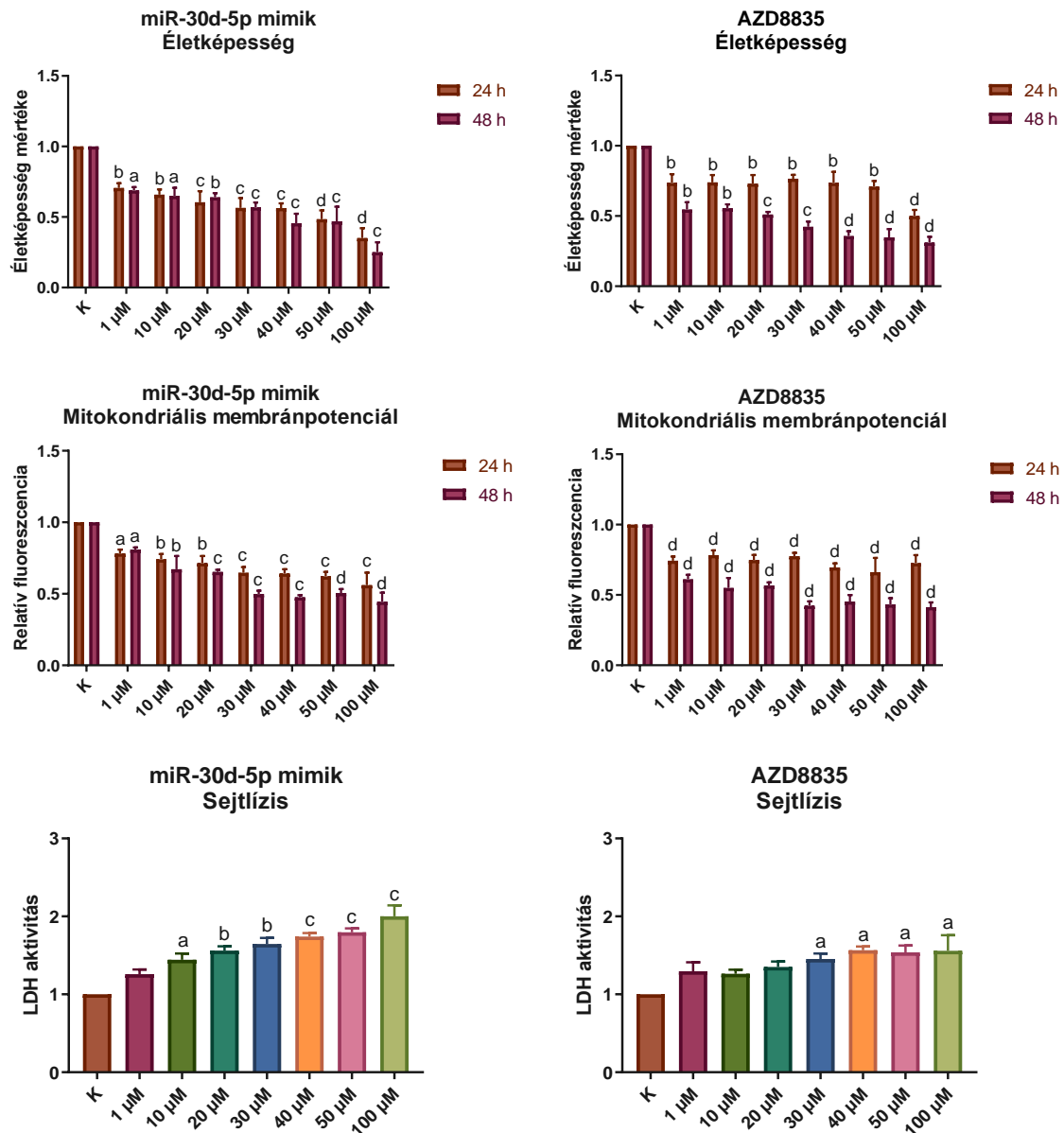


35. ábra. A miR30d-5p mimikkel való transzfektálás génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata néhány gén esetében, a PEO1 és A2780 sejtvonalakban. Az ábrákon a vizsgált gének expressziójának a változását Log₂FC értékekkel jellemeztük. Az RNS izolálás az 50 nM, ill. 100 nM miR-30d-5p mimikkel való transzfektálást 24 h-val követően történt. A szignifikancia szintjének meghatározása a kezelt és a kezeletlen kontroll minták Δ CT értékeinek összevetésével történt. a: $p < 0,05$.

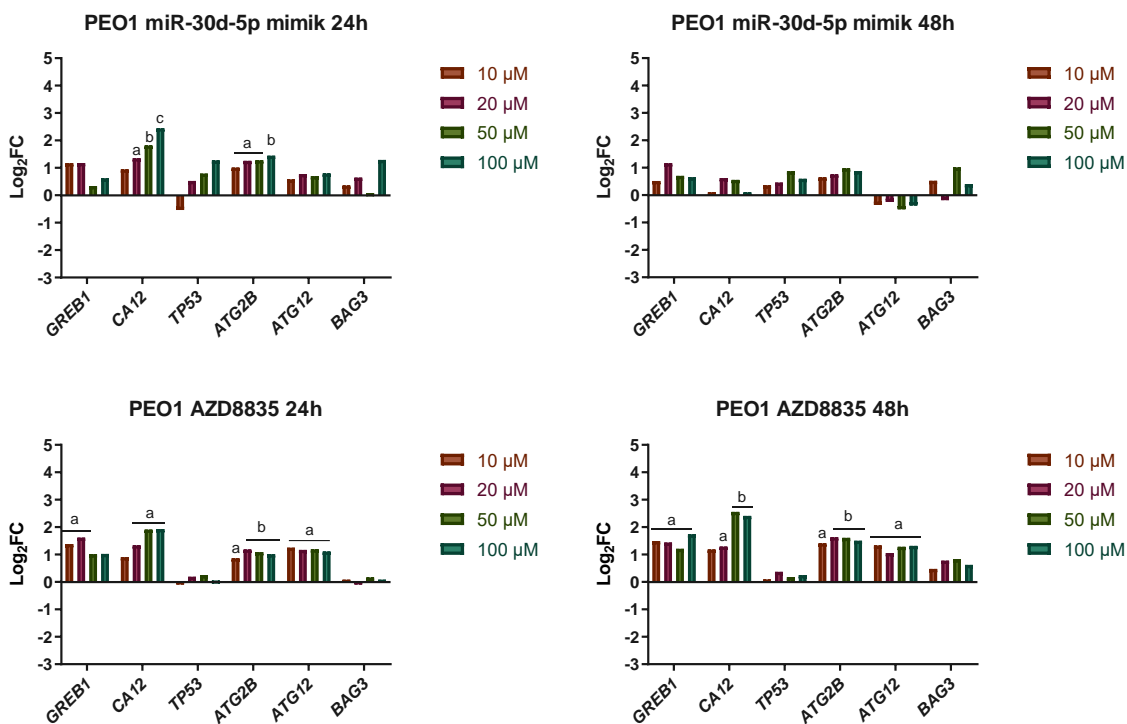
6.3.4. A miR-30d-5p mimikkel való transzfektálás hatásának vizsgálata a nagy dózisu E2-vel szemben mutatott tolerancia alakulásában a PEO1 sejtvonalban

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a miR-30d-5p-vel való transzfektálás hogyan befolyásolja a PEO1 sejtvonal nagy dózisu E2-al szemben mutatott toleranciáját. Ekkor a korábbi vizsgálataink során alkalmazott dózissal (1-100 μ M) kezeltük a sejteket. Eredményeink alapján a PEO1 sejtvonal nagy dózisu E2-al szemben mutatott toleranciája jelentősen csökkent, ha a kezelést 50 nM miR-30d-5p mimikkel együtt alkalmaztuk, ugyanis már 1 μ M E2 az életképesség csökkenését eredményezte (36. ábra). Ez a tény lehet összefüggésben, hogy csökkent az ER α -mediált ösztrogén válasz intenzitása, amit a *GREB1* és

a *CA12* gének indukciójának elmaradása jelzett (37. ábra). Ugyanakkor a *TP53* és az *ATG12* gének expressziója nem mutatott szignifikáns elváltozást. Azonban megfigyelhető volt az *ATG2B* indukciója (37. ábra).



36. ábra. Az életképesség, az apoptózis és a sejtlyízis mértékének vizsgálata a PEO1 sejtvonalban miR-30d-5p mimik (50 nM) vagy AZD8835 (100 nM) jelenlétében. Az életképesség és a mitokondriális membránpotenciál csökkenésének mértékét (24 h és 48 h a kezeléseket követően), valamint a felülúzó LDH aktivitásának növekedését (48 h a kezeléseket követően) határoztuk meg. Az eredményeket minden esetben a kezeletlen kontroll mintákhoz viszonyítottuk. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.

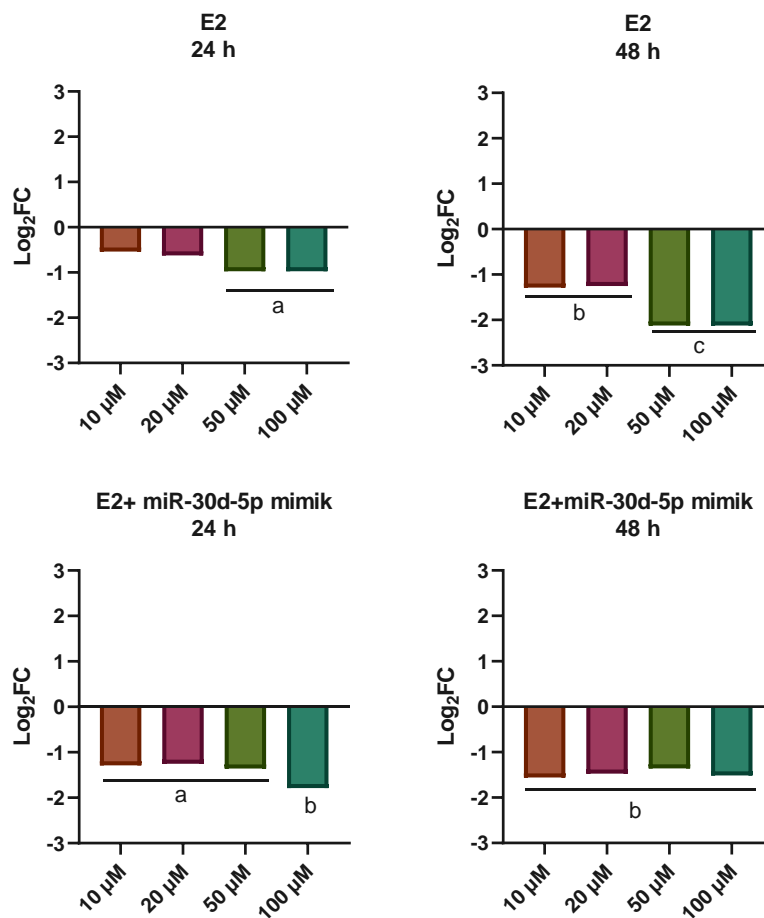


37. ábra. A nagy dózisú E2 kezelés génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata miR-30d-5p mimik (50 nM), ill. AZD8835 (100 nM) jelenlétében. Az ábrákon a vizsgált gének expressziójának a változását Log_2FC értékekkel jellemeztük. Az RNS izolálás az E2 kezeléseket 24 h és 48 h-val követően történt. A szignifikancia szintjének meghatározása a kezelt és a kezeletlen kontroll minták ΔCT értékeinek összevetésével történt. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$.

Megvizsgáltuk továbbá a miR-30d-5p másik validált target génjének, a *SOX4* expressziójának az alakulását is a kezelések hatására. Önmagában az E2 kezelés hatására a *SOX4* repressziót mutatott a sejthalált kiváltó 50 μM és 100 μM dózisoknál (24 h). Azonban, ha az E2 kezelést a miR-30d-5p mimikkel együtt alkalmaztuk, a *SOX4* repressziója már 10 μM dózisonál is megfigyelhető volt (38. ábra).

Hasnyálmirigy sejtvonalon végzett kísérletek alapján a miR-30d-5p a *SOX4* expressziójának szabályozásán keresztül a PI3K/Akt útvonal szabályozásában működik közre (Xu és mtsai, 2021). Ezen útvonal a proliferáció szabályozása mellett befolyást gyakorol az $\text{ER}\alpha$ -mediált ösztrogén válaszra is (Kathpe és mtsai, 2021). Ezért feltételeztük, hogy a miR-30d-5p a *SOX4* represszálásán keresztül, a PI3K/Akt útvonalra gyakorolt hatásának következtében zavarhatta meg az $\text{ER}\alpha$ -mediált ösztrogén választ és ez állhatott a nagy dózisú E2-al szembeni tolerancia csökkenésében a mimikkel kezelt tenyészetekben. Ennek bizonyítása érdekében kísérleteinket a PI3K inhibitor hatású AZD8835 jelenlétében is megismételtük (36. ábra). Érdeemes megjegyezni, hogy ezen molekula ovárium és mellrákos sejtvonalakon is képes

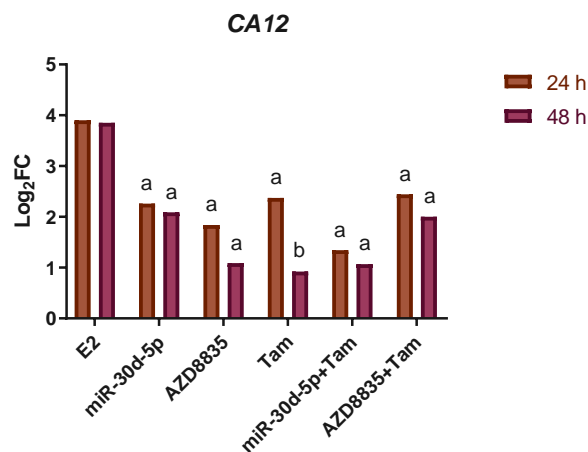
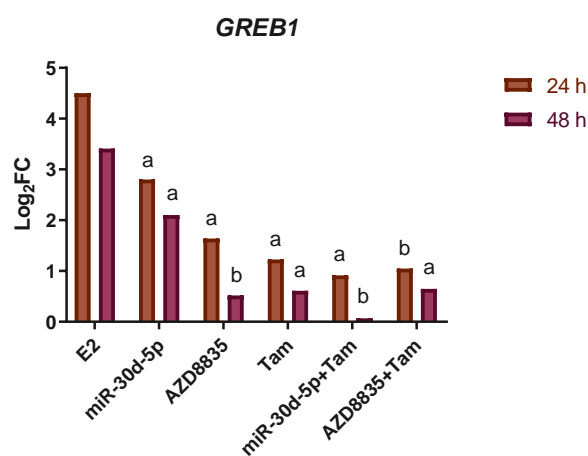
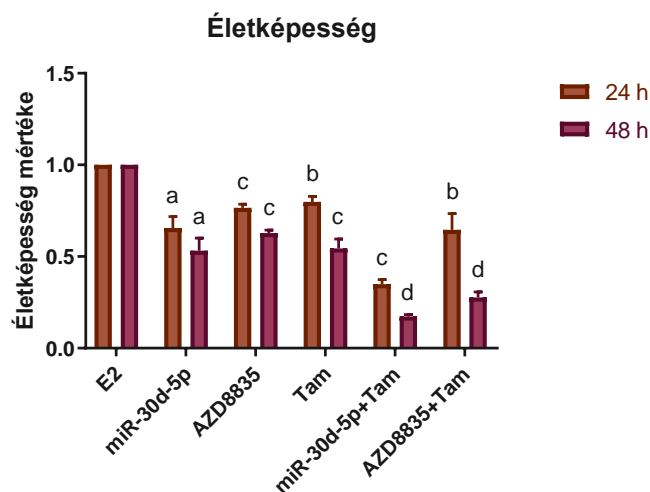
volt a PI3K útvonal és a sejtproliferáció megzavarására (Hudson és mtsai, 2016; Wu és mtsai, 2020). Kísérleteink alkalmával az AZD8835-vel való kezelés a miR-30d-5p mimikhez hasonló mértékben csökkentette a PEO1 sejtek nagy dózisú E2-al szemben mutatott érzékenységét (36. ábra). A *GREB1* és *CA12* gének esetében ugyancsak az indukció mértékének a csökkenése volt tapasztalható, amely megerősíti, hogy a PI3K/Akt útvonal gátlása megzavarhatja az ER α -mediálta ösztrogén választ (37. ábra). Érdeemes megemlíteni továbbá, hogy az *ATG2B* és *ATG12* gének indukálódása szintén megfigyelhető volt ezen tenyészetekben (37. ábra). Fontos megjegyezni, hogy az AZD8835 önállóan alkalmazva nem gyakorolt befolyást sem a miR-30d-5p, sem a vizsgált gének expressziójára (Varga és mtsai, 2022, Kiegészítő Táblázat 2).



38. ábra. A nagy dózisú E2 kezelés *SOX4* gén expressziójára gyakorolt hatásának vizsgálata a miR-30d-5p mimik (50 nM) jelenlétében. A *SOX4* gén expressziójának a változását Log_2FC értékekkel jellemeztük. Az RNS izolálás az E2 kezeléseket 24 h és 48 h-val követően történt. A szignifikancia szintjének meghatározását a kezelt és a kezeletlen kontroll minták ΔCT értékeinek összevetésével végeztük. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$.

6.3.5. A miR-30d-5p mimikkel való transzfektálás hatásának vizsgálata a tamoxifénnel szemben mutatott érzékenység alakulására a PEO1 sejtvonalonban

Kísérleteink végén megvizsgáltuk, hogy a miR-30d-5p mimik alkalmazása hogyan befolyásolja a PEO1 sejtvonala érzékenységét egy, a klinikumban alkalmazott terápiás szerrel szemben. Választásunk az anti-ösztrogén hatású tamoxifén molekulára esett, mivel (i) eredményeink alapján szoros interakció áll fenn a PI3K/Akt útvonal és az ER α -mediált ösztrogén válasz között ovárium sejtekben, (ii) ezen útvonalak együttes gátlása szinergista módon hatott mellrákos sejtvonalakon, ezáltal egy ígéretes terápiás opciónak tekinthető (Chen és mtsai, 2017; Vasán és mtsai, 2019), (iii) a tamoxifént alkalmazzák ER+ ovárium daganatok terápiájában (Langdon és mtsai, 2020). Mivel a tamoxifén hatása E2 jelenlétében szembetűnő, ezért ezen kísérleteket 10 nM E2 jelenlétében végeztük el. Eredményeink alapján a tamoxifén, a miR-30d-5p, valamint az AZD8835 egyaránt gátolta a 10 nM E2 proliferatív, valamint a *GREB1* és *CA12* génekre kifejtett induktív hatását (39. ábra). Emellett a tamoxifén kezelés miR-30d-5p mimikkel, vagy AZD8835-el való kombinálása markánsabb inhibíciót fejtett ki az életképességre (39. ábra).



39. ábra. A miR-30d-5p mimik és az AZD8835 hatásának vizsgálata a PEO1 sejtvonal tamoxifén érzékenységére. Az életképesség mértékét, valamint a *GREB1* és a *CA12* gének expresszióját határoztuk meg. A PEO1 sejtvonalat E2 (10 nM) kezelésnek tettük ki, amit kiegészítettünk tamoxifén (Tam; 1 μ M) és/vagy miR-30d-5p mimik (50 nM) és AZD8835 (100 nM) kezelésekkel. Az életképesség mértékében és a génexpresszióban megmutatkozó változások a kezeléseket 24 h és 48 h-val követően lettek meghatározva. Az eredményeinket a csak E2 kezelésen átesett sejtekhez viszonyítottuk. A génexpresszió változását Log₂FC értékekkel jellemeztük. a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$; d: $p < 0,0001$.

7. Diskusszió

7.1. Fiziológiailag releváns dózisú xenoösztrogén kezelések mRNS és miRNS expresszióra gyakorolt hatásának összehasonlítása az E2 által kiváltott hatásokkal

7.1.1. A mRNS expresszióban megfigyelhető változások

Korábbi vizsgálataink alkalmával a xenoösztrogénekkal történő kezelések jelentős fenotípusos választ indukáltak az ER α -val rendelkező PEO1 humán ovárium sejtvonalon (Márton és mtsai, 2020). Ezen munka folytatásaként, a xenoösztrogének emberi szervezetre kifejtett élettani hatásának pontosabb megismerése érdekében RNS szekvenálást végeztünk, amely a mRNS molekulák mellett a miRNS-ekre is kiterjedt. Eredményeink alapján nemcsak az E2, hanem a ZEA és a BPA kezelések is jelentős, a génexpresszióban megmutatkozó változásokat indukáltak az általunk alkalmazott, PEO1 sejtvonal esetében. Ez alátámasztja, hogy a korábban megfigyelt fenotípusos változások mögött intenzív transzkriptomikai folyamatok állnak. Eredményeink összhangban vannak mások megfigyeléseivel, hiszen ezen molekulák intenzív, génexpresszióban megfigyelhető változásokat indukáltak számos sejtvonalon (Kim és mtsai, 2021/a; Kowalska és mtsai, 2018; Lecomte és mtsai, 2019; Li és mtsai, 2020; Li és mtsai, 2021/b; Li és mtsai, 2022; Parveen és mtsai, 2009; So és mtsai, 2014; Zhang és mtsai, 2017/a). A ZEA már alacsony koncentrációban (0,1-0,01 nM) is képes volt a PC3 prosztatarák sejtvonal proliferációját, invázióját és migrációját, valamint az EMT folyamatát elősegítő gének (*VIM*, *ZEB1*, *ZEB2* és *TGF β 1*) expresszióját fokozni (Kowalska és mtsai, 2018). A ZEA továbbá az E2-hoz hasonló módon, már nM-os koncentrációban indukált több, ösztrogén válaszhoz köthető gént (*CXCL12*, *PgR*, *AREG*, és *GREB1*) MCF-7 és T47D emlőrák sejtvonalakon (Kowalska és mtsai, 2018). Parveen és munkatársai (2009) MCF-7 sejtvonallal végzett kísérletei során ZEA kezelés hatására ugyancsak, a proliferációhoz köthető gének (pl. Ras-függő gének, *ULK1*, *RHOV*) indukciója, valamint az apoptózishoz köthető gének (*PRKCD*, *IGFBP5*) repressziója volt megfigyelhető (Lecomte és mtsai, 2019; Parveen és mtsai, 2009). Petefészek granulóza sejtekkel végzett kísérletek azt mutatták, hogy 10 μ M-30 μ M-os koncentrációban a ZEA szignifikánsan csökkentette az *IFG-1* és emelte a *TGF- β* , *IER-3*, és az *EDN-1* gének expressziós szintjét (Zhang és mtsai, 2017/a). Emellett primer uterus leiomyoma sejtvonalon a BPA kezelés hatására számos, a sejtciklushoz köthető gén (*XBPI*, *CDC6*, *CDKN2B*, *E2F1*, *MCM2-6*), ill. a *CCND1* proto-onkogén indukciója volt köthető (Li és mtsai, 2019/a; Li és mtsai, 2022). Y79 humán retinoblasztóma sejtvonalban a 40 μ M-os BPA kezelés hatására megváltozott expressziót mutattak az RNS szplicingban, ill. a

nonszensz- mutációk mediálta lebomlásban résztvevő gének (*MAGOHB*, *HNRNPD*, *FUS*, *RBM3*) (Kim és mtsai, 2021/a).

Érdekes megfigyelésünk továbbá, hogy a ZEA által kiváltott, transzkriptomban megfigyelhető hatás mértéke az E2-hoz hasonlóan bizonyult, mind a hatásos dózis, mind az elmozdulást mutató gének számát tekintve. Ez alapján feltételezhetjük, hogy a ZEA az E2-hoz hasonló mértékű ösztrogén válasz kiváltására képes. Ezen megállapításunk jó összhangban van azzal a korábbi megfigyeléssel, hogy a ZEA képes az ER α -hoz kötődni, valamint erős agonistának bizonyult Ishikawa (humán endometrium adenokarcinóma, ER+), HeLa (humán epiteliális méhnyakrák, ER-), és HepG2 (humán hepatocelluláris) sejtvonalakon végzett ERE-luc riporter assay-n alapuló vizsgálatokban (Li és mtsai, 2012). Érdemes megemlíteni továbbá, hogy a 10 nM koncentrációban végzett E2 és ZEA kezelések szintén hasonló mértékű hatást fejtettek ki az ösztrogén hatásban közreműködő gének expressziójára MCF-7 sejtvonalon végzett kísérletek alkalmával (Parveen és mtsai, 2009). A BPA azonban a ZEA és az E2 molekulákhoz viszonyítva kisebb mértékű hatás kifejtésére volt képes. Ez nemcsak a hatásosnak bizonyult magasabb dózisban, de a változott expressziót mutató gének számában is megfigyelhető volt. Ezen eredményünk szintén jó összhangban van korábbi tanulmányok eredményeivel. Az Ishikawa sejtvonalnál az 1 nM E2-lal megegyező mértékű ER α aktivációhoz, 10 nM ZEA és 100 nM BPA kezelések voltak szükségesek (Li és mtsai, 2012). MCF-7 és T47D sejtvonalon 1 nM E2 proliferatív hatásával ekvivalens hatás kifejtéséhez 100 nM BPA kezelés volt szükséges (Li és mtsai, 2020). Humán endometrium, ECC-1 sejtvonalban ráadásul az E2 kezelésre megváltoztatott expressziójú gének csupán 6 %-ban mutattak átfedést a BPA kezelésnél kapott eredményekkel (Gertz és mtsai, 2012; Li és mtsai, 2020). Ez magyarázható azzal a ténnyel, hogy a BPA az E2-nál mintegy 1000-2000-szer gyengébb affinitással képes kötődni az ER α -hoz, ezért a BPA-t egy gyenge ösztrogén hatású molekulaként tartják számon (Acconcia és mtsai, 2015; Li és mtsai, 2012).

7.1.2. A mRNS expresszióban megfigyelhető változások alapján érintett biológiai folyamatok

Ahhoz, hogy teljesebb képet kapjunk a kezelések hatására megfigyelhető patofiziológiai változásokról, a feltehetőleg biológiailag releváns elmozdulást mutató gének esetében funkcionális gendúsulási analízist végeztünk. Több, az ösztrogének hatásmechanizmusával összefüggésbe hozható, a sejtproliferációhoz köthető útvonalban közreműködő gén is dúsulást mutatott (pl. *CCND1*, *MYC*, *GREB1*). Ezen eredmények alapján az E2, ZEA és BPA kezelések számos, a sejtproliferációban részt vevő gén expresszióját indukálták, ami jó összhangban van

a korábban kapott eredményeinkkel (Márton és mtsai, 2020). Érdekes megemlíteni továbbá, hogy a ZEA és a BPA képes volt neuroblasztóma- (SK-N-SH), vastagbél- (HCT116, SW480, HT29), petefészek- (OVCAR-3), prosztatata- (PC3, WPMY-1, HPrF) és mellrákos (MCF-7, T47D) sejtvonalak proliferációjának fokozására korábbi kísérletek alkalmával (Deng és mtsai, 2021; Jun és mtsai, 2021; Kowalska és mtsai, 2018; Lecomte és mtsai, 2019; Lo és mtsai, 2021; Sang és mtsai, 2021; Wang és mtsai, 2022; Zheng és mtsai, 2018). Emellett ezen molekuláknak való kitettség indukciót váltott ki számos, az RNS metabolizmushoz köthető gén expressziójában (pl. *LTVI*, *RCLI*, *RRP9*). Ezek közül többnek a funkciója a nem kódoló RNS-ek metabolizmusához köthető, melyek a miRNS-ek szintézisét is segíthetik. Azonban a legtöbb a rRNS-ek képződéséhez kapcsolódik, amely fokozott riboszómális aktivitásra utal ezen körülmények között. A riboszóma szintézis fokozódását MCF-7 és T47D mellrákos sejtek ösztrogén kezelését követően is megfigyelték (Ray és mtsai, 2013). Ez feltehetőleg a fokozott proliferációt hivatott szolgálni a sejt fehérje szintetizáló kapacitásának emelésén keresztül, amely kulcsfontosságú a tumorképződés során (Pelletier és mtsai, 2018). Dúsulást mutattak az aminosav transzportozhoz köthető gének is (pl. *SLC7A5*, *SLC7A2*, *SLC6A15*), amelyek a monomerek biztosításával ugyancsak a fokozott fehérjeszintézist segíthetik. Érdekes megemlíteni, hogy a riboszóma biogenezis gátlását és az aminosav transzport folyamatok blokkolását ígéretes terápiás stratégiaként tartják számon a rákos megbetegedésben, ami alátámasztja ezen folyamatok központi jelentőségét a tumorok patofiziológiájában (Ray és mtsai, 2013; Saito és Soga, 2021). A BMH-21, CX-5461, CX-3543 és a camptothecin mind ígéretes, riboszóma biogenezist célzó terápiás szerek, melyek közül az utóbbi jelenleg a 3-as klinikai fázisban jár a sarcoma kezelésében (Jiao és mtsai, 2023). Emellett az *SLC7A5*, aminosav transzport inhibitorok (BCH, JPH203) az ER-pozitív mellrák, az NSCLC, a petefészekrák, az endometrioid karcinóma, a hepatocelluláris karcinóma, ill. a glióma kezelésében is jó sikerrel alkalmazhatóak (Saito és Soga, 2021). Az *SLC7A11* inhibitorok közül a SASP emlő-, vastag- és végbélrák, NSCLC, hepatocelluláris karcinóma és limfóma; az Erastine pedig prosztatata-, és hasnyálmirigy daganat kezelésében alkalmazhatóak (Saito és Soga, 2021).

Kísérleteink során az ösztrogénekkal való kezelés hatására a keratinizáció (pl. *KRT4*, *KRTAP2-3*, *TGMI*), az extracelluláris mátrix organizáció (pl. *MFAP2*, *ITGB6*, *LOXL2*) és a tight-junction kapcsolatok kialakításáért (pl. *CLDN8*, *NECTIN4*) felelős folyamatokban résztvevő gének represszálódtak. Mindez a migráció, ezen keresztül pedig a metasztázis képzés folyamatának kedvezhet. A keratinok a citoskeletont kialakító intermedier filamentumokat felépítő (1-es és 2-es típusú keratin monomerekből felépülő heteropolimer) fehérjék. Fontosak

az epiteliális hámsejtek organizációjában, ill. a sejtek integritásának, motilitásának, valamint apikális-bazális polarizációjának meghatározásában is közreműködnek. A különböző epiteliális daganatokra egyedi keratin összetétel jellemző, ami diagnosztikus szereppel bír (Karantza, 2011). Sejten belüli szintjük csökkenése kedvez az ún. EMT-nek, ami által a sejt inváziós képességre tesz szert és képes metasztázisok kialakítására (Karantza, 2011; Kim és mtsai, 2015). A tumorsejtek terjedését ugyancsak támogatja az extracelluláris mátrix átrendeződése, valamint a sejtek közötti szoros kapcsolatok kialakításáért felelős tight junction kapcsolatok elvesztése (Tzanakakis és mtsai, 2018). Kísérleteink során a claudin fehérjéket (amelyek a tight junction kialakításában részt vevő transzmembrán fehérjék) kódoló gének (pl. *CLND4*, *CLND8*, *CLND9*) represszáldtak. Érdeemes megemlíteni, hogy a claudin-3 (*CLND3*) és claudin-4 (*CLND4*) normál ovárium sejtek felszínén nem expresszáldik, azonban a petefészek daganatos sejteken nagy mennyiségben megtalálható. Ezek a claudin-ok növelik a sejtek inváziós képességét és mozgékonyágát az MMP-2 (mátrix metallopeptidáz-2) aktiválásán keresztül (Kyuno és mtsai, 2021). Ezen megfigyelésekkel összhangban korábbi vizsgálataink alkalmával az E2, ZEA és BPA kezelésekre hatására a sejtek migrációs képességének fokozódását, valamint az E-cadherin-t kódoló gén represszáldását figyeltük meg (Márton és mtsai, 2020).

7.1.3. Az azonosított gének expressziójának monitorozásában rejlő diagnosztikai lehetőségek

Vizsgálataink alkalmával sikerült azonosítanunk 83 gént, amelyek mind a 3 kezelés hatására – köztük a gyengébb ösztrogén hatással rendelkező BPA hatására is - elmozdulást mutattak. Feltételezhetően ezen gének kiemelkedő szereppel rendelkezhetnek az ovárium sejtek ösztrogén válaszában. Ezen gének közül több, szintén elmozdulást mutatott ösztrogén kezelésekre alkalmával, más sejtvonalakkal végzett kísérletekben. Mellrákos MCF-7 és T-47D sejtvonalakban ugyancsak megfigyelték a *DEPTOR* expressziójának a fokozódását (MCF-7) (Cuesta és mtsai, 2019) és a *BLNK* expressziójának csökkenését (MCF-7) (Casa és mtsai, 2012) ösztrogén kezelésekre hatására. Ezenkívül a BeWo placenta sejtvonalban az E2 hatására az *AGT* megváltozott expressziót mutatott (Wang és mtsai, 2013). Ischikawa endometrium adenokarcinóma sejtvonalban az E2 gátolta az apoptózist a *MYC* gén upregulálásán keresztül (Gao és mtsai, 2019). A *CA12* gén expressziója magasabbnak bizonyult ER+ mellrákos sejtvonalakban (T-47D, MCF-7), mint ER- sejtvonalak esetében (Franke és mtsai, 2020). Ugyanakkor a *CDCA7* emelkedett szintje a triplanegatív mellrákos daganatok esetében volt megfigyelhető, és rossz prognózissal társult (Ye és mtsai, 2018). Tamoxifén kezelés hatékonyságával fordítottan arányosnak bizonyult a *PDGFR* expresszió, ugyanis ezen gén

gátlásával, valamint tamoxifén alkalmazása mellett javultak a mellrákos betegek túlélési esélyei (Kim és mtsai, 2021/b). Emellett számos gén expressziójában bekövetkező változás összefüggésbe hozható a tamoxifén rezisztenciával. A *DHRS2* (Men és mtsai, 2017), az *EGR1* (Shajahan-Haq és mtsai, 2017), ill. az *NPY1R* (Men és mtsai, 2017) gének expressziója csökkent, míg az *AFF3* (Shi és mtsai, 2018; Liang és mtsai, 2022/a) és a *PUS7* gének (Cheng és mtsai, 2020) expressziós szintje emelkedett a tamoxifén rezisztenciát mutató MCF-7 sejtvonalban. Ezenkívül BPA kezelés hatására az *SLC7A2* (Böckers és mtsai, 2020/b), ill. az *NCR3LGI* (Böckers és mtsai, 2020/a) gének expressziója eltérést mutatott az MCF-7 sejtvonalban. BPA kezelés hatására a *CBLN1* gén expressziója szintén megváltozott BeWo placenta sejtvonalban (de Aguiar Greca és mtsai, 2020). Ischikawa endometrium adenokarcinóma sejtvonalban a BPA csökkentette a sejtproliferációt az *OLFM1* gén indukcióján keresztül (Gao és mtsai, 2019). Zahra és munkatársai (2021) összefüggést mutattak ki a petefészeksejtek BPA expozíciója, valamint az *RRS1* és *KRT4* gének expressziója között. Az eredményeinkkel összhangban a ZEA kezelés hatására ugyancsak változott expressziót mutatott MCF-7 sejtvonalban a *CDKN1C* (Yip és mtsai, 2017), prosztata sejtvonalban a *HMOX1* (Kowalska és mtsai, 2020), IPEC-1 sertés bélhámsejtvonalban a *BMP4* és az *RGS16* (Taranu és mtsai, 2015). Heneweer és munkatársai (2007) patkányokon végzett kísérletei során a *GJB2* expressziója ugyancsak reagált a ZEA kezelésre, sertés petefészek granulóza sejtekben pedig a ZEA kezelés csökkentette a *BDNF* kifejeződését (Zhang és mtsai, 2017).

Az ösztrogének hatására indukálódó, ovárium sejtek ösztrogén válaszában kulcsfontosságú gének azonosítása felveti azok, ösztrogén szenzitív tumorok diagnosztikájában való felhasználásának lehetőségét. Ez jelenleg a klinikumban az ER expresszió monitorozásán keresztül valósul meg, és pozitív esetén javasolt az endokrin terápia alkalmazása. Azonban a kezelés sikere nagyban függ a tumor valós ösztrogén érzékenységtől, amiről csupán az ER expresszió monitorozása nem ad pontos információt (Makhlouf és mtsai, 2024). Ennek oka, hogy a tumorsejtek ER expressziójának mértéke nem minden esetben mutat egyenes arányosságot azok ösztrogén érzékenységgel az ER mutációk esetleges megléte miatt (Langdon és mtsai, 2017). Ráadásul az ovárium tumorokra nagyban jellemző a heterogentitás, ami az ER expresszió tekintetében is megfigyelhető (Makhlouf és mtsai, 2024). Az ER-pozitív, endokrin terápiára rezisztens, áttét képző emlődagaganatok 36 %-ban szomatikus *ESR1* génmutáció fedezhető fel. Az ER α -t kódoló *ESR1* gén Y537N pozíciójában elszenvedett mutációja a receptor LBD-nek a konformáció változását okozza, ami fokozza az ER ligand független aktiválódását. Ilyen esetekben a hatástalan endokrin terápia alkalmazása rontja a

beteg gyógyulási esélyeit és további metasztázisok kialakulásának kedvezhet (Herzog és mtsai, 2022). Ezért az ösztrogén érzékenység meghatározásában segítséget nyújthat néhány, az ösztrogén válaszban kulcsfontosságú gén expressziójának a monitorozása is. Mellrák esetén már rendelkezésre áll számos ilyen panel (Nishi és mtsai, 2022). Az, hogy az általunk azonosított gének közül több magasabb expressziót mutatott ER pozitív tumorokban megerősíti ezen gének alkalmazásának lehetőségét a diagnosztikában. Emlődaganatban a *GREB1* (Cheng és mtsai, 2018), a *CA12* (Franke és mtsai, 2020; Li és mtsai, 2019/b), az *OLFMI* (Piryaei és mtsai, 2022), a *DHRS2* (Wang és mtsai, 2017), az *SLC7A2* (Böckers és mtsai, 2020/b), az *RBBP8* (Chow és mtsai, 2018), az *SLC7A5* (Alfarsi és mtsai, 2020; Hisada és mtsai, 2022), a *PLAT* (Thakkar és mtsai, 2015), az *AFF3* (Liang és mtsai, 2022/a), ill. a *CDCA7* (Ye és mtsai, 2018) gének expressziója mutatott összefüggést az ER jelenlétével. Endometrium daganatban a *CDCA7* (Zhang és mtsai, 2020), ER pozitív ovárium tumorokban pedig a *GREB1* (Hodgkinson és mtsai, 2018), *RRS1* (Zahra és mtsai, 2021), a *KRT4* (Zahra és mtsai, 2021), a *CA12* (Franke és mtsai, 2020), a *DHRS2* (Wang és mtsai, 2017), ill. a *PLAT* (Thakkar és mtsai, 2010) gének mutattak magasabb expressziót. Az *RBBP8* (Chow és mtsai, 2018), az *SLC7A5* (Alfarsi és mtsai, 2020), az *AFF3* (Shi és mtsai, 2018), és a *PDGFRL* (Kim és mtsai, 2021/b) gének pedig az endokrin terápia sikerét voltak képesek előre jelezni. Érdeemes kiemelni, hogy a *GREB1* az ER expresszió és az endokrin terápia sikerességének megítélésében is alkalmazható marker gének bizonyult mellődaganat esetében (Wu és mtsai, 2018).

Ezenkívül sikerült további 130 és 13 gént azonosítanunk, amelyek csak a ZEA vagy a BPA kezelésekre hatására mutattak változott expressziót. Ezen gének ígéretes jelöltek lehetnek a ZEA és/vagy a BPA kitettség mértékének megállapítását célzó diagnosztikai tesztek kidolgozásakor. Az eredményeinkkel összhangban a ZEA kezelés hatására ugyancsak változott expressziót mutatott MCF-7 sejtvonalban a *CDKN1C* (Yip és mtsai, 2017), prosztata sejtvonalban a *HMOX1* (Kowalska és mtsai, 2020), IPEC-1 sertés bélhámsejtvonalban a *BMP4* és az *RGS16* (Taranu és mtsai, 2015). Heneweer és munkatársai (2007) patkányokon végzett kísérletei során a *GJB2* expressziója ugyancsak reagált a ZEA kezelésre, sertés petefészkek granulóza sejtek esetén pedig a ZEA kezelés csökkentette a *BDNF* kifejeződését (Zhang és mtsai, 2017/a). A BPA kezelésekre hatására változó expressziót mutató gének közül az *NNAT*-t azonosították korábban (Wang és mtsai, 2020). Fontos azonban kiemelni, hogy az általunk azonosított gének diagnosztikai hatékonyságának megítéléséhez további vizsgálatok szükségesek.

7.1.4. A miRNS expresszióban megfigyelhető változások és az érintett útvonalak

Munkánk második szakaszában miRNS szekvenálás segítségével olyan miRNS-eket azonosítottunk, amelyek feltehetőleg közreműködnek az ösztrogének által kiváltott hatások koordinálásában. A változott elmozdulást mutató miRNS-ek esetében végzett hálózat analízis, valamint funkcionális géndúsulási analízis alapján ezen miRNS-ek által szabályozott target gének több, a sejtproliferációhoz, ill. migrációhoz köthető folyamat szabályozásában is közreműködhetnek. Ezáltal pedig számos ráktípus kialakulásához is köthetőek. Érdeemes megemlíteni, hogy az E2, ZEA és BPA molekulák miRNS expresszióra gyakorolt hatását korábban már mások is leírták az MCF-7 sejtvonalban, ahol 10 μ M BPA a miR-320-c, ill. MCF-7 és Ishikawa endometrium sejtvonalakban a miR-30d upregulációját indukálta (Klinge, 2015). Vemhes patkányok BPA-val kontaminált vízzel való itatását követően az utódok szívizomzatának fibrózisát figyelték meg, ill. a miR-30a-5p expresziójának emelkedését is leírták, aminek a szívizomgyulladásban lehet szerepe (Rasdi és mtsai, 2020). Majom TB placenta sejtvonal és egér placenta sejtekben szintén számos miRNS expressziójára volt hatással a BPA (Mao és mtsai, 2021; Rosenfeld, 2021). Jelen eredményeinkkel összhangban a TM3 Leydig sejtvonal 50 μ M/L ZEA koncentrációjú kezelését követően számos, a daganatképzésben, apoptózisban és oxidatív stresszben részt vevő jelátviteli útvonal módosulását írták le (Wang és mtsai, 2019/a). Az E2 általi kezelés hatására elmozdulást mutató miRNS-ek, és target génjeik által kialakult hálózat nagyobbban adódott, mint a ZEA, vagy a BPA esetében elmozdulást mutató miRNS-ek esetében. Ez azonban feltehetőleg az utóbbi miRNS-ek esetében rendelkezésre álló kevesebb információ következménye lehet, így erre vonatkozóan nem bocsátkozunk messzemenő következtetések levonásába. Inkább felhívjuk a figyelmet a hasonló tanulmányok szükségességére, ill. ezen miRNS-ek részletes funkcionális vizsgálatának fontosságára.

A miRNS szekvenálás eredményeit felhasználva kiválasztottunk 6 miRNS-t, amelyek expresszióját qPCR-el is megvizsgáltuk. Sikerült megerősítenünk a let-7a-2-3p, miR-501-5p, miR-26a-2-3p és a miR-197-5p, E2 kezelés hatására, valamint a miR-197-5p és a miR-501-5p, ZEA kezelés hatására megfigyelhető csökkenő expresszióját. Azonban a qPCR-es eredményeink alapján az E2 kezelés hatására a miR-582-3p expressziója csökkent, a miRNS szekvenálás során kapott eredményeinkkel ellentétben, ahol ezen miRNS expressziójának emelkedését figyeltük meg. Mivel a qPCR a miRNS expresszió megbízhatóbb kvantifikációs módszerének tekinthető, ezért az egyes miRNS-ek expressziójának értelmezésekor ezen módszer eredményeit vettük alapul. A let-7a-2-3p, a miR-501-5p, a miR-26a-2-3p és a miR-197-5p daganatok kialakulásában betöltött szerepét más sejtvonalak esetén is megerősítették

(Fan és mtsai, 2016; Gao és mtsai, 2020; Jain és mtsai, 2019; Mi és mtsai, 2019). A let-7a egy ismert tumorszupresszor, amelynek downregulációja a *MAGE-A1* mRNS targetjén keresztül kedvezett a mellrákos sejtek proliferációs, migrációs és inváziós képességének (Mi és mtsai, 2019). A miR-26a ugyanezen folyamatok szabályozásában való szerepét írták le ovárium daganatos sejtekben a *TCF12* targetálásán keresztül (Gao és mtsai, 2019). A miR-197-5p expressziós csökkenése pedig a sejtosztódást segítő faktor, a KIAA0101 expresszióját segíti, ami a sejtöregedés gátlását és a sarcoma képződést idézte elő humán fibrosarcoma (HT1080) és humán embrionális vese (HEK-293) sejtvonalakon (Jain és mtsai, 2019). A let-7a-2-3p, a miR-26a-2-3p és a miR-197-5p szintjének csökkenése kedvezett a daganatok kialakulásának, ezzel szemben Fan és munkatársai (2016) ezzel ellentétes megfigyelést tettek a miR-501-5p esetében. Ők ugyanis azt találták, hogy a miR-501-5p a Wnt/ β -katenin szignál útvonal aktiválásával elősegíti a gyomor daganatos sejtek összejt irányú átalakulását. A miR-501-5p upregulációja a gyomorrákos betegekben negatív prognózissal társult (Fan és mtsai, 2016).

Ezenkívül MCF-7 emlődaganatos sejtekben szintén leírták a let-7a, és a miR-26a expressziójának csökkenését E2 kezelést követően (Klinge, 2015). A let-7a targetje az ER α 36 alegysége. Amennyiben a let-7a expressziója csökken az ER α 36-on keresztül nem-genomiális ösztrogén jelátviteli útvonalak aktiválódhatnak, amelyek összefüggésbe hozhatóak a tamoxifen kezeléssel szemben kialakuló rezisztenciával (Klinge, 2015). Ezenfelül a miR-582-3p, E2 kezelés hatására megfigyelhető expressziós csökkenése szintén mérhető volt ZR-75-1 mellrákos sejtvonalon (Klinge, 2015). A miR-582-3p alacsony expressziós szintje a PI3K/Akt/mTOR útvonal aktiválását okozza, ami a sejtproliferáció és a migráció fokozódásához, végsősoron pedig kedvezőtlen kimenetelhez társul petefészekrákos esetekben. Ugyanakkor a miR-582-3p transzfekciója A2780 és SKOV3 petefészekrák sejtvonalaknál csökkentette a sejtproliferációt, valamint a migráció mértékét (Dai és mtsai, 2021). Feltételezésünk szerint ezen miRNS-ek szintjének változása hozzájárulhatott az ösztrogén kezeléseket proliferációs és migrációs képességre gyakorolt hatásának fokozásához.

7.2. Magas dózisú xenoösztrogén és E2 kezelések ovárium sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata

7.2.1. Nagy dózisú E2 ovárium sejtekre gyakorolt hatása

Az ösztrogének kétarcú molekuláknak tekinthetőek, ugyanis dózisfüggő módon képesek a sejtproliferáció fokozására és gátlására is. Míg az alacsonyabb, nanomoláris koncentrációjú E2 fokozza a sejtproliferációt, addig a magasabb, mikromoláris mennyiségek már gátolják azt, és

sejthalált idéznek elő. Az ER-ok mindkét folyamat szabályozásában meghatározó szereppel rendelkeznek (Hewitt és Korach, 2018; Jordan, 2015). Az ER α szerepe a sejthalál kiváltásában mellrákos sejtek esetében egy jól ismert folyamat. Egyrészt az ösztrogén kezelések hatására endoplazmatikus stressz alakul ki, amely a hibásan feltekeredett fehérjék sejten belüli felhalmozódásához vezet. Ez az endoplazmatikus retikulum stressz (UPR =unfolded protein response) kismértékű indukálását idézi elő, melynek a fenntartásában az ER α is közreműködik és segíti a sejtet a proliferációs kapacitás fenntartásában. Azonban, ha ezt a folyamatot gátoljuk, (pl. BHPI-vel, 3,3-bis(4-hydroxyphenyl)-7-methyl-1,3-dihydro-2H-indol-2-one), akkor az az UPR masszív indukálásához vezet, ezzel sejthalált idézve elő. A BHPI ugyanis hiperaktiválja a PLC γ -t, ami a PIP2-t DAF-ra és IP3-ra bontja. Az IP3 hatására kinyílnak az endoplazmatikus retikulum IP3R kalcium csatornái, ami az endoplazmatikus retikulum kalcium raktárainak gyors kiürülését váltja ki. Ez elősegíti a BiP disszociációját az IRE1, PERK és ATF6 membrán fehérjékről, amelyek az UPR három ágának aktiválódásáért felelős molekulák. A PERK ág aktiválódása következtében foszforilálódik az eIF2 α , ami a protein szintézis gyors blokkolását okozza (Andruska és mtsai, 2015/a; Andruska és mtsai, 2015/b; Krebs és mtsai, 2015). A nagymértékű endoplazmatikus stressz az apoptózis intrinzik folyamatának indukálódásához vezet. Az E2 szelektíven indukálja a pro-apoptotikus BCL2 család tagjait, a BAX-ot és a BIM-et, valamint a CASP4 kaszpázt. A BAX az ERN1-hez kötődve aktiválja annak endoplazmatikus retikulum transzmembrán kináz és endoribonukleáz aktivitását, ami az UPR aktiválódásához vezet. A BAX, BIM és CASP4 fontosságát az endoplazmatikus retikulum stressz általi apoptózis elindításában az is jelzi, hogy ezen fehérjéket kódoló mRNS-ek siRNS-ekkel való gátlása az E2 indukálta apoptózis elmaradását váltotta ki (Jordan, 2015). Ezenkívül az E2 hatására elinduló apoptózis ER-független útvonalait is azonosították, amely a foszfodiészteráz 3A és az SLFN12 fehérjéhez köthető. Ilyen esetekben az E2 közvetlenül képes hozzákötödni a foszfodiészteráz 3A-hoz, ami ezután megköti és stabilizálja az SLFN12-t. A megemelkedett mennyiségű SLFN12 a riboszómákhoz kötődve meggátolja az SRP-k (szignál felismerő részecskék) bekötődését, így gátolva az endoplazmatikus retikulumokon folyó folyamatos fehérje transzlációt. Ez a Bcl-2 és Mcl-1 fehérjék szintjének csökkenéséhez vezet, ami apoptózist vált ki (Li és mtsai, 2019/a).

Az ER-okkal rendelkező sejtek patofiziológiai jellemzőinek pontosabb megértése, valamint a potenciális klinikai alkalmazás lehetősége miatt megvizsgáltuk, hogyan reagálnak az általunk alkalmazott, PEO1 és A2780 ovárium sejtvonalak a nagy dózisu ösztrogén kezelésre. Nem meglepő módon, a magas, μ M-os koncentrációban alkalmazott kezelések blokkolták a proliferációt és sejthalált váltottak ki, amelyben feltehetőleg az apoptózis mellett az autofágia

is közreműködhetett. Az autofágia valószínűsíthetően markánsabb szerepet kaphatott az A2780 sejtvonalban, különösen a *BAG3* indukcióján keresztül. A *BAG3* fehérje hozzákötődik a hibásan feltekeredett fehérjékhez, ami fokozza az autofágia folyamatát a lizoszómákban, így segít fenntartani a sejthomeosztázist a sejtet ért stressz okán kialakuló UPR és sejt sérülések ellenére (Brenner és mtsai, 2023). Meg kell említeni azonban, hogy a PEO1 sejtvonal rendelkezik egy mutációval a *TP53* génben, így ugyan ezen gén dózisfüggő indukcióját figyeltük meg a nagydózisú E2 kezelés hatására, csupán óvatos következtetéseket vonhatunk le a *TP53*-mediált apoptózist illetően ezen sejtvonal esetében (Cooke és mtsai, 2010). Emellett a PEO1 sejtvonalban az E2 még magas dózisban is képes volt az ER α -mediált ösztrogén válasz elindítására, a *GREB1* és *CA12* gének megfigyelt indukciója alapján. Vizsgálataink talán legérdekesebb megfigyelése, hogy az ER α -által mediált ösztrogén válasz jelenléte nagyban befolyásolta a sejtek, nagy dózisú ösztrogén kezeléssel szemben mutatott toleranciáját. Annak hiánya, akár az ER α hiányából adódóan – mint az A2780 sejtvonalban –, vagy blokkolása esetén – a PEO1 sejtvonal esetében az MPP kezelések alkalmával – a sejtek proliferációs képességének és toleranciájának a szignifikáns mértékű csökkenését okozta, már 1-10 μ M E2 kezelés hatására. Ezen tolerancia szint jó összhangban van a más sejtvonalak esetén tapasztaltakkal (Li és mtsai, 2019/a; Wright és mtsai, 2003; Wright és mtsai, 2005). Majom petefészek epitélium sejteknél nagy dózisú (1-3 μ M) E2 kezelés a DNS szintézis blokkolását, valamint a sejtproliferáció gátlását vonta maga után (Wright és mtsai, 2003; Wright és mtsai, 2005). Emellett az E2 dózisfüggő módon már 1,2 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M és 10 μ M-os koncentrációkban a HeLa sejtek életképességének a csökkenését, valamint az SLFN12 fehérje által mediált apoptózist váltott ki (Li és mtsai, 2019/a). Ezzel szemben az ER α -t expresszáló PEO1 sejtvonal jól tolerálta ezen dóziseket, ami azzal lehet összefüggésben, hogy még 10 μ M E2 kezelés is képes volt az ER α -mediált ösztrogén válasz kiváltására, ami hozzájárulhatott a proliferáció fenntartásához ezen körülmények között. Érdeemes megemlíteni, hogy egy érésben lévő tüszőben jellemzően hasonló, 1-10 μ M koncentrációjú az E2 szintje (Fujiwara és mtsai, 2000). Ennélfogva tehát a petefészek felszíni hámja -ami kifejezi az ER α -t – fiziológiásan is ki van téve az ekkora dózisú E2 hatásának. Mindemellett azt is érdemes kiemelni, hogy az ER α -mediált jelátviteli útvonalak fontosnak bizonyultak az apoptotikus folyamatok gátlásában az endometrium sztróma sejteiben és a neuronokban. Továbbá azt is megfigyelték, hogy az MCF7 sejteknél az ER α kiütése nagyfokú autofágiát és sejtpusztulást váltott ki. Ugyanis az ER α kiütése megnövekedett ROS szintet, valamint az UPR gátlását okozta, ami csökkentette a sejtek stressztűrő képességét (Cook és mtsai, 2014).

7.2.2. Nagy dózisú xenoösztrogén kezelések ovárium sejtekre gyakorolt hatása

Korábbi munkánk folytatásaként megvizsgáltuk a nagy dózisú ZEA és BPA kezelések, ovárium sejtek fenotípusára gyakorolt hatását is. Az alacsony dózisú ösztrogén kezeléseknél kapott eredményeinkhez hasonlóan a ZEA által kifejtett hatás itt is nagyban hasonlított az E2 esetében tapasztaltnak, mind az alkalmazott dózisok, mind a fenotípus tekintetében. Eredményeink jó összhangban vannak korábbi vizsgálatok eredményeivel, ahol a ZEA nagy dózisban szintén toxikusnak bizonyult számos humán és állati sejtvonal esetén (Cai és mtsai, 2019; Fu és mtsai, 2019; Kowalska és mtsai, 2020; Zheng és mtsai, 2018; Zhu és mtsai, 2021). Csirke granulóza sejtekben a PI3K/Akt/mTOR és a MAPK útvonalakon keresztül a sejtek apoptózisát és autofágiáját indukálta az 1-80 μM -os ZEA kezelés alkalmazása (Zhu és mtsai, 2021). 30 μM ZEA a PCa prosztata sejtvonalban oxidatív stressz indukálta DNS károsodást és a sejtciklus blokkolását idézte elő (Kowalska és mtsai, 2020). A nagy dózisú ZEA apoptózist indukált továbbá a MAT-C szarvasmarha emlő epiteliális sejtvonalban (30 μM ZEA) az endoplazmatikus retikulum stressz indukálása, valamint patkány Sertoli sejtekben (5, 10, 20 $\mu\text{mol/l}$ ZEA) a Fas-Fas ligand mitokondriális útvonal aktiválásán keresztül (Cai és mtsai, 2019; Fu és mtsai, 2019). BEAS-2B epiteliális tüdő sejtvonalon pedig 40 μM ZEA alkalmazása mellett intenzív oxidatív stressz, a sejtosztódás gátlása, valamint apoptózis és gyulladási folyamatok voltak megfigyelhetőek (So és mtsai, 2014). A BPA kezelések munkánk során ugyancsak sejthalált idéztek elő, ami szintén jó összhangban van mások eredményeivel (Priego és mtsai, 2021; Reventun és mtsai, 2020; Wang és mtsai, 2021/b; Xie és mtsai, 2016). Egér aorta endotél sejtvonalon (MAEC) 100 μM BPA hatására apoptózis volt megfigyelhető, 40 μM mellett pedig a szívmuscle sejtek gyulladása és hipertrófiája jelentkezett (Reventun és mtsai, 2020). Ugyanakkor a BPA 50 μM -os koncentrációban alkalmazva a pozitív kontrollként használt rapamicinnel azonos mértékben volt képes autofágiát indukálni humán HK2 vese epiteliális sejtekben (Priego és mtsai, 2021). Emellett a BPA-t 0,125-4 μM koncentrációban alkalmazva csökkentette a RAW264.7 egér leukémia makrofág sejtvonalban a PI3K és az Akt fehérjék mennyiségét, ami kedvezett az autofágiának (Wang és mtsai, 2020). Érdekes továbbá megemlíteni, hogy kísérleteink során a ZEA sejthalált indukáló mértéke az E2-hoz hasonlóan alakult, ezzel szemben a BPA-t jobban tolerálták a sejtek. A BPA tehát gyengébb ösztrogénnek tekinthető nemcsak a sejtproliferáció, de a sejthalál indukálása tekintetében is (Sengupta és mtsai, 2013).

A kísérleteink során az alkalmazott, PEO1 és A2780 sejtvonalak között megfigyelhető érzékenységbeli különbségek a ZEA és BPA kezelések esetén is megmutatkoztak, ami szintén az ER α mediált ösztrogén válasszal állhat összefüggésben. Ezek alapján az ER α jelenlétében

megvalósuló ösztrogén válasz, ezen molekulák hatására is képes volt kifejteni a sejtproliferációra gyakorolt serkentő hatását, amely meghatározta a sejtek toleranciáját. Érdeemes megjegyezni, hogy ugyan az emberek ZEA és BPA kitettsége inkább nM-os dózisban jellemző, extrém esetekben, magasabb dózisokban is előfordulhat, pl. nagy mennyiségű műanyag hulladék közelében, vagy mikotoxinok termelődésének különösen kedvező éghajlati körülmények között élők esetében. Különösen nagy lehet a haszonállatok kitettsége, a mikotoxinokkal nagymértékben szennyezett takarmány elfogyasztása után. Becslések szerint Magyarországon a raktározott kukorica minden kilogrammjára több, mint 10.000 µg ZEA szennyeződés jut (Rai és mtsai, 2020). A Németországban kapható kukoricából készült készítmények 370-1362 µg/kg, a sörfőzés alapanyagául szolgáló árpamaláta 1,41-42,4 µg/kg ZEA-t tartalmazott a mérések során. Az állatok takarmányozására szánt terményekben még ennél is magasabb értékek voltak jellemzőek. A szarvasmarháknak szánt takarmány 1200-3060 µg/kg (Argentína), a sertés eledel 50 µg/kg (Spanyolország), ill. a baromfi táp 62 µg/kg (Kína) kontamináló ZEA-t tartalmazott (Mahato és mtsai, 2021).

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

7.3.1. A miR-30 molekulák expressziójának analízise

A miR-30 családba 6 miRNS tartozik (miR-30a, miR-30b, miR-30c-1, miR-30c-2, miR30d, miR-30e), melyek fontos szerepet töltenek be a szövetek és a szervek fejlődésében, a reprodukzív rendszer, a kardiovaszkuláris rendszer, továbbá a vese normál működésében. Éppen ezért ezen miRNS-ek expressziós szintjében bekövetkező változás számos megbetegedés hátterében húzódhat. Tumorszupresszor funkciójának köszönhetően csökkent expressziója számos daganatban is kimutatható (Mao és mtsai, 2018). Hiányos azonban a szakirodalom a miR-30 családba tartozó miRNS-ek petefészekrákban betöltött jelentőségét illetően. Ezért megvizsgáltuk ezen miRNS-eket kísérleti körülményeink között. Korábbi vizsgálataink alkalmával lényeges különbséget tapasztaltunk néhány miRNS alap expressziójában az általunk alkalmazott PEO1 és A2780 sejtvonalakban (Varga és mtsai, 2022). Ezért első lépésben összehasonlítottuk az általunk vizsgált miR-30 családba tartozó miRNS-ek alap expresszióját. A miR-30a-3p, miR-30a-5p, miR-30d-5p és a miR-30e-5p esetében egyaránt a PEO1-ben mutatkozott magasabb alap expresszió, amely arra enged következtetni, hogy ezen miRNS-ek nagyobb biológiai relevanciával rendelkezhetnek az ER α -t expresszáló sejtekben. Hasonló megállapításra jutottak mellrákos sejtek esetén is, ahol magasabb miR-30a-5p, miR-30b, miR-30c és miR-30d expresszió volt mérhető az ER $^{+}$ MCF-7 és T47D sejtvonalakban, az ER-t nem expresszáló MDA-MB-231 sejtekhez viszonyítva (Howard és Yang, 2018; Iorio és

mtsai, 2005). Megvizsgáltuk továbbá, hogy ezen miRNS-ek változott expressziót mutatnak-e, E2 kezelés hatására. Mivel expressziójuk nem mutatott változást az alacsony dózisu, proliferatív hatású E2 kezelések hatására, feltehetőleg nem vesznek részt az E2 által mediált proliferáció szabályozásában. Az a megfigyelésünk, hogy a miR-30a-5p, miR-30d-5p és a miR-30e-5p indukciót mutatott nagy dózisu E2 kezelés hatására, ahol intenzív sejthalál volt megfigyelhető, arra enged következtetni, hogy ezen miRNS-ek a sejthalál szabályozásában működhetnek közre, amelyet már vastagbél (HCT15, DLD-1, SW480) sejtvonalak esetén is felvetettek. Itt a miR-30d az ATG5, Beclin-1 és a PI3K fehérjéket kódoló mRNS-ek targetálásával apoptózist indukált (Mao és mtsai, 2018; Zhang és mtsai, 2017/b). A miR-30a-5p mimik humán colorectalis karcinóma sejtvonalakban (HepG2, SMMC-7221, HepB3, SNU449) az AEG-1 közvetlen targetálásával szintén apoptózis indukcióját váltotta ki (He és mtsai, 2015). A miR-30e-5p-vel való transzfektálás a SNAI1 közvetítésével a BxPC-3 és a PANC-1 prosztatatrák sejtvonalakban ugyancsak az apoptózis mértékének emelkedését indukálta (Liang és mtsai, 2022/b). Kiemelném továbbá, hogy a miR-30-as családba tartozó miRNS-ek és a *TP53* között szoros kapcsolat áll fenn a sejthalál szabályozásának tekintetében. Egyrészt a miR-30d közvetlenül képes kötődni a *TP53* gén 3'UTR régiójához, ezáltal pedig csökkenteni a fehérje képződését. A csökkent p53 szinttel párhuzamban megnő azon fehérjék koncentrációja, amelyek a p53 szabályozása alá esnek, így befolyásolva a sejthalál, a sejtciklus és a sejttöregedés folyamatait (Kumar és mtsai, 2011). Másrészt a p53 is képes befolyást gyakorolni a miR-30-as molekulák transzkripciójára azáltal, hogy a p53 a miR-30a promóteréhez kötődvé indukálja a miRNS átírását (di Gennaro és mtsai, 2019). A daganatok kialakulásában gyakori a driver-*TP53* mutáció, ami a HIF1 α /miR-30d tengely érintésével a tumorok kialakulásának és a metasztázis képzésnek kedvező állapot (Capaci és mtsai, 2020). Így ezek összehangolt aktivitása vezet a daganatos sejtek proliferációs és inváziós képességének szabályozásához (Capaci és mtsai, 2020; di Gennaro és mtsai, 2019; Laudato és mtsai, 2017).

7.3.2. A miR-30d-5p transzfektálásának hatása

A PEO1 és A2780 humán petefészek sejtvonalak miR-30d-5p-vel való transzfektálása csökkentette a sejtek proliferációs képességét, az ER α -t expresszáló és nem expresszáló sejtekben egyaránt. Eredményeinkkel összhangban a miR-30d-5p bevitelle a hasnyálmirigy-, petefészek granulóza-, vastagbél- és vese daganatos sejtekben ugyancsak a sejtproliferáció csökkenését és az apoptózis indukcióját idézte elő (Xu és mtsai, 2021; Yu és Liu, 2020; Zhang és mtsai, 2017/b). A miR-30d hasnyálmirigy daganat esetében a *SOX4* közvetlen targetálásával

gátolta a PI3K/Akt útvonalat, ezáltal pedig a sejtproliferációt és a tumorinváziót (Xu és mtsai, 2021). A Smad2 translációs gátlásával pedig a petefészek granulóza sejteinek az apoptózist indukálta (Yu és Liu, 2020). Vastagbél (HCT15, DLD-1, SW480) sejtvonalak esetén a miR-30d az ATG5, a Beclin-1 és a PI3K fehérjéket kódoló mRNS-ek targetálásával apoptózist indukált (Zhang és mtsai, 2017/b). Emellett a miR-30d-5p transzfektálása érzékenyebbé tette a sejteket a sejthalál-indukáló faktorokkal - a magas dózisú E2-lal szemben. Ez azzal állhatott összefüggésben, hogy a transzfektáláson átesett PEO1 sejtvonalban az E2 kezelés hatására kisebb mértékű *GREB1* és *CA12* indukció volt megfigyelhető. Ez alapján tehát a miR-30d-5p képes volt megzavarni az ER α szignalizációt, ezáltal pedig csökkentette az E2 hatására megvalósuló proliferáció mértékét. Feltételezésünk szerint ez a *SOX4*/PI3K/Akt tengelyen keresztül valósulhatott meg. Ugyanis a *SOX4*, a miR-30d-5p validált target molekulája (Xu és mtsai, 2021). A *SOX4* egy onkogén transzkripciós faktor, amelynek a magas expressziója mellrák és más egyéb daganatok esetében is rossz prognózissal társul. A *SOX4* a PI3K/Akt útvonal aktivitását képes növelni az Akt upregulációján keresztül. A *SOX4*/PI3K/Akt/mTOR tengely pedig olyan folyamatok felerősödéséért felelősek, mint a sejtproliferáció, túlélés, sejtmétabolizmus, és genom instabilitás. Ezen folyamatok mind a tumorképződésnek kedveznek, ezért mind a *SOX4*, mind a PI3K/Akt útvonal a daganatterápia ígéretes támadáspontjai (Mehta és mtsai, 2017). A PI3K/Akt útvonal aktivitásának szerepét az ER α mediált proliferáció fenntartásában alátámasztja azon eredményünk is, hogy a PI3K szelektív inhibitor AZD8835 alkalmazása ugyancsak csökkentette a sejtek nagy dózisú E2-lal szembeni toleranciáját az ER α szignalizáció blokkolásán keresztül. Érdeemes megemlíteni, hogy a PI3K/Akt-útvonal és az ER α -szignalizáció szoros kölcsönhatásban állnak egymással (Khatpe és mtsai, 2021; Vasán és mtsai, 2019). Az aktiválódó PI3K/Akt útvonal képes az ER α -t a S167 pozíciójú aminosav közvetlen foszforilálására. Ami a receptor ligand-független aktiválódásának és az endokrin terápiával szembeni rezisztencia kialakulásának kedvez (Khatpe és mtsai, 2021). Emellett érdemes megemlíteni, hogy a sejtek teljes ER α -jának 10 %-a sejtmembránba épülve helyezkedik el dimer formában. Ezen receptor E2 általi aktiválódását követően disszociál a membránról és interakcióba lép tk. a PI3K/Akt útvonallal, amellyel szintén a sejtproliferáció fokozódását váltja ki (Khatpe és mtsai, 2021).

7.4. Eredményeink feltételezett klinikai alkalmazhatósága

A kemoterápiás szerekkel szemben kialakuló rezisztencia jelenleg a legnagyobb kihívások egyike a daganatok kezelésében. A petefészekrák esetében ezt tovább nehezíti a daganatokra jellemző nagyfokú heterogenitás. Ezáltal a régebben alkalmazott, és új terápiás szerek

kombinálása ígéretes terápiás opció lehet a jövőben. Azok alapján, hogy a miR-30d-5p mimik sikeresen csökkentette a sejtproliferáció mértékét az általunk alkalmazott sejtvonalakban, felveti ezen miRNS alkalmazásának lehetőségét a petefészekrák kezelésében, az ER α -t expresszáló és nem expresszáló tumorok esetében egyaránt. Továbbá azon eredményünk, hogy a miR-30d-5p képes interakcióba lépni az ER α szignalizációs útvonallal, tovább növeli ezen miRNS relevanciáját. Ugyanis ezen útvonal gátlása számos nőgyógyászati daganat esetében ígéretes terápiás opciónak tekinthető (pl. antiösztrogének, aromatáz inhibitorok alkalmazása, vagy az ER α UPR-t indukáló hatásának kiaknázása által) (Andruska és mtsai, 2015; Tremont és mtsai, 2017). Ezen kezelések kombinálása tovább fokozza a terápia hatékonyságát. A tamoxifen rezisztens melldaganatok kezelésére a 2-es típusú, nem szteroid aromatáz inhibitor, anastrozole-t alkalmazzák a posztmenopauzában lévő, előrehaladott betegségben szenvedő betegeknél (Tremont és mtsai, 2017). A kemoterápia rezisztens emlőrák kezelésének másik lehetősége a BHPI alkalmazásán keresztül az endoplazmatikus retikulum stressz és UPR kiváltása, ami a daganatsejtek pusztulásához vezet (Andruska és mtsai, 2015/a). Érdeemes megemlíteni, hogy korábban a nagy dózisu E2 terápiás alkalmazása is felmerült tamoxifen rezisztens melldaganat esetében (Jordan, 2015). A PI3K/Akt útvonal gátlása ugyancsak ígéretes terápiás opció a platinarezisztens epiteliális petefészekdaganatok, ill. a multidrog rezisztens emlő-, endometrium-, tüdő és petefészek daganatok esetében (Liu és mtsai, 2020; Rinne és mtsai, 2021). Azonban az ER+ mellrákos esetek 40 %-ában megfigyelhető a PIK3CA mutációja, ami a PI3K komplex kináz aktivitását és membrán kötő képességét növeli. Ezen mutáció fennállása rossz prognózissal és az endokrin terápiával szembeni rezisztenciával társul. Ilyen esetekben az ER-t és a PI3K/Akt útvonalat gátló kombinációs terápia alkalmazása javasolt. Például a Fulvestrant és AZD9446 vagy az Everolimus és az Exemestane kombinációja (Khatpe és mtsai, 2021; Vasan és mtsai, 2019). Eredményeink alapján hasonló kombinációs terápiás stratégia hatékony lehet a petefészekrák esetében is, pl. a PI3K útvonal miR-30d-5p mimikkel, vagy AZD8835-el való gátlásával és további tamoxifen kezeléssel. Érdeemes megemlíteni továbbá, hogy az AZD8835 ciszplatinnal vagy karboplatinnal való együttes alkalmazása szinergikus hatásúnak bizonyult az OVCAR-8 humán szerózus ovárium sejtvonal esetében. Ezen kívül az AZD8835 csökkentette az OVCAR-8 sejtekben a *BRCA1/2* mRNS expresszióját, ami növeli a PARP inhibitorokkal szembeni válaszkészséget (Wu és mtsai, 2020).

8. Összefoglalás

Munkánk során az E2, ZEA és BPA petefészekrákban betöltött jelentőségét vizsgáltuk humán ovárium sejtvonalak segítségével. Első lépésben a PEO1 (ER α +) sejteket alacsony, fiziológiailag releváns dózisu E2 (10 nM), ZEA (10 nM) és BPA (100 nM) molekulákkal kezeltük, majd a transzkriptomban bekövetkező változásokat mRNS és miRNS szekvenálással monitoroztuk. A kezelések hatására 308, 288 és 63 gén indukálódott ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$), valamint 292, 260 és 45 gén represszálódott ($\text{Log}_2\text{FC} < -1$). Ezen felül 13, 11 és 10 miRNS expressziója mutatott szignifikáns elmozdulást ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$, vagy $\text{Log}_2\text{FC} < -1$). A funkcionális géndúsulási analízis alapján számos, a sejtproliferációhoz és migrációhoz köthető folyamat indukálódása volt megfigyelhető, ami jó összhangban van korábbi eredményeinkkel. Az E2 és a ZEA hatása azonos mértékűnek bizonyult, 407 gén mozdult el a 2 kezelés hatására. Azonosítottunk továbbá 83 gént, amely mindhárom kezelés hatására génexpressziós változást mutatott. Ezek expressziójának monitorozása diagnosztikus jelentőséggel bírhat az ovárium tumorok ösztrogén érzékenységét illetően. Megerősítettük továbbá a miR-501-5p, let-7a-2-3p, let-7g-3p, miR-26a-2-3p, miR-197-5p és miR-582-3p expressziós változását a qPCR-es vizsgálataink során is.

Munkánk folytatásaként megvizsgáltuk a nagy dózisu (1-100 μM) E2, ZEA és BPA kezelések PEO1 (ER α +) és A2780 (ER α -) ovárium sejtvonalak fenotípusára gyakorolt hatását. Az E2 és a ZEA kezelések már 30 μM dózisban az életképesség csökkenését és a sejthalál indukálását váltották ki a PEO1 sejtvonalon, amely hatás kifejtéséhez a BPA esetében 100 μM kezelésre volt szükség. A *GREB1* és *CA12* gének indukálódása alapján az E2 és a ZEA 1-10 μM dózisban is képesek voltak az ER α -mediált ösztrogén válasz elindítására, nagyobb dózisban azonban a sejthalál dominált, melyben szerepe lehetett a *TP53*, *ATG2B*, *ATG12* és *BAG3* gének indukációjának. Az ER α -mediált ösztrogén válasz hiányában csökkent a sejtek nagy dózisu E2-vel szembeni túlélése, mivel az A2780 sejtvonal, valamint a PEO1 sejtvonal MPP-vel (ER α szelektív antagonist) történő kezelése esetén már 1 μM dózis is az életképesség csökkenését és a sejthalál indukálódását vonta maga után. A PEO1 sejtvonal esetében a PI3K/Akt út vonal működésének megzavarása az AZD8835 (PI3K inhibitor), vagy miR-30d-5p mimikkel (a SOX4 targetálásával befolyásolja a PI3K/Akt működését) való transzfektálás által ugyancsak csökkentette a nagy dózisu E2-vel szembeni toleranciát, valamint a tamoxifénnel szembeni érzékenységet, feltehetően az ER α -mediált szignalizáció megzavarásán keresztül. Ez felveti hasonló kombinációs kezelések klinikumban való alkalmazásának lehetőségét petefészekrák esetén.

9. Summary

In this work, we investigated the role of E2, ZEA and BPA in the development of ovarian cancer using human ovarian cell lines. PEO1 (ER α +) cells were treated with low, physiologically relevant doses of E2 (10 nM), ZEA (10 nM) and BPA (100 nM) molecules and transcriptomic response was monitored by mRNA and miRNA sequencing. According to our analysis 308, 288 and 63 genes were induced (Log₂FC > 1) and 292, 260 and 45 genes were repressed (Log₂FC < -1) in response to E2, ZEA and BPA exposure, respectively. Furthermore, the expression of 13, 11 and 10 miRNAs altered significantly (Log₂FC > 1 or Log₂FC < -1). Functional gene enrichment analysis revealed the induction of several processes related to cell proliferation and migration that is in good agreement with our previous phenotypic results. The effect of ZEA was comparable to E2, the expression of 407 genes altered in response to these 2 treatments. We also identified 83 genes that showed altered gene expression as a result of all the three treatments. Their expression analysis might be an applicable tool for determining the estrogen sensitivity of ovarian tumors. The downregulation of miR-501-5p, let-7a-2-3p, let-7g-3p, miR-26a-2-3p, miR-197-5p and miR-582-3p was confirmed by qPCR experiments.

In the next phase of our work, we studied the effect of high-dose (1-100 μ M) E2, ZEA and BPA treatments on the phenotype of PEO1 (ER α +) and A2780 (ER α -) ovarian cell lines. E2 and ZEA exposure decreased cell viability and induced cell death in the PEO1 cell line in 30 μ M dose, which effect was observable in 100 μ M dose in the case of BPA. According to the induction of *GREB1* and *CA12* genes, E2 and ZEA were also able to initiate ER α -mediated estrogen response in 1-10 μ M doses. Higher doses induced cell death instead where the induction of *TP53*, *ATG2B*, *ATG12* and *BAG3* genes might have played important role. In the absence of the ER α -mediated estrogen response, as in A2780, or when it was blocked by MPP (selective ER α antagonist) in PEO1, the inhibition of cell viability and induction of cell death was observed in lower, 1 μ M dose. Furthermore, the inhibition of the PI3K/Akt pathway by AZD8835 (PI3K inhibitor) or by miR-30d-5p mimic (which affects PI3K/Akt by targeting *SOX4*) sensitized PEO1 cells to cell death induced by high-dose E2 as well as to tamoxifen via interfering with ER α -mediated signaling. This suggests the application of PI3K/Akt inhibitors and estrogen response blockers in combination in the future therapy of ovarian cancer.

10. Irodalomjegyzék

- Abu Samaan, T. M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules*, 9(12), 789. <https://doi.org/10.3390/biom9120789>
- Acconcia, F., Pallottini, V., & Marino, M. (2015). Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose-response: a publication of International Hormesis Society*, 13(4), 1559325815610582. <https://doi.org/10.1177/1559325815610582>
- Alfarsi, L. H., El-Ansari, R., Craze, M. L., Masisi, B. K., Mohammed, O. J., Ellis, I. O., Rakha, E. A., & Green, A. R. (2020). Co-Expression Effect of SLC7A5/SLC3A2 to Predict Response to Endocrine Therapy in Oestrogen-Receptor-Positive Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*, 21(4), 1407. <https://doi.org/10.3390/ijms21041407>
- Alles, J., Fehlmann, T., Fischer, U., Backes, C., Galata, V., Minet, M., Hart, M., Abu-Halima, M., Grässer, F. A., Lenhof, H. P., Keller, A., & Meese, E. (2019). An estimate of the total number of true human miRNAs. *Nucleic acids research*, 47(7), 3353–3364. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz097>
- Andersen, C. L., Sikora, M. J., Boisen, M. M., Ma, T., Christie, A., Tseng, G., Park, Y., Luthra, S., Chandran, U., Haluska, P., Mantia-Smaldone, G. M., Odunsi, K., McLean, K., Lee, A. V., Elishaev, E., Edwards, R. P., & Oesterreich, S. (2017). Active Estrogen Receptor- α Signaling in Ovarian Cancer Models and Clinical Specimens. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 23(14), 3802–3812. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1501>
- Andruska, N. D., Zheng, X., Yang, X., Mao, C., Cherian, M. M., Mahapatra, L., Helferich, W. G., & Shapiro, D. J. (2015). Estrogen receptor α inhibitor activates the unfolded protein response, blocks protein synthesis, and induces tumor regression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(15), 4737–4742. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403685112> (a)
- Andruska, N., Zheng, X., Yang, X., Helferich, W. G., & Shapiro, D. J. (2015). Anticipatory estrogen activation of the unfolded protein response is linked to cell proliferation and poor survival in estrogen receptor α -positive breast cancer. *Oncogene*, 34(29), 3760–3769. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.292> (b)
- Annese, T., Tamma, R., De Giorgis, M., & Ribatti, D. (2020). microRNAs Biogenesis, Functions and Role in Tumor Angiogenesis. *Frontiers in oncology*, 10, 581007. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.581007>
- Arias-Loza, P. A., Muehlfelder, M., & Pelzer, T. (2013). Estrogen and estrogen receptors in cardiovascular oxidative stress. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 465(5), 739–746. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1247-7>
- Aslan, K., Onan, M. A., Yilmaz, C., Bukan, N., & Erdem, M. (2020). Comparison of HE 4, CA 125, ROMA score and ultrasound score in the differential diagnosis of ovarian masses. *Journal of gynecology obstetrics and human reproduction*, 49(5), 101713. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101713>
- Ban, E., Kwon, T. H., & Kim, A. (2019). Delivery of therapeutic miRNA using polymer-based formulation. *Drug delivery and translational research*, 9(6), 1043–1056. <https://doi.org/10.1007/s13346-019-00645-y>
- Bennesch, M. A., & Picard, D. (2015). Minireview: Tipping the balance: ligand-independent activation of steroid receptors. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 29(3), 349–363. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1315>
- Berger, C. E., Qian, Y., Liu, G., Chen, H., & Chen, X. (2012). p53, a target of estrogen receptor (ER) α , modulates DNA damage-induced growth suppression in ER-positive breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry*, 287(36), 30117–30127. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.367326>
- Biller, V. S., Leitzmann, M. F., Sedlmeier, A. M., Berger, F. F., Ortmann, O., & Jochem, C. (2021). Sedentary behaviour in relation to ovarian cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *European journal of epidemiology*, 36(8), 769–780. <https://doi.org/10.1007/s10654-020-00712-6>
- Böckers, M., Paul, N. W., & Efferth, T. (2020). Bisphenolic compounds alter gene expression in MCF-7 cells through interaction with estrogen receptor α . *Toxicology and applied pharmacology*, 399, 115030. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115030> (b)
- Böckers, M., Paul, N. W., & Efferth, T. (2020). Organophosphate ester tri-o-cresyl phosphate interacts with estrogen receptor α in MCF-7 breast cancer cells promoting cancer growth. *Toxicology and applied pharmacology*, 395, 114977. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.114977> (a)
- Brenner, C. M., Choudhary, M., McCormick, M. G., Cheung, D., Landesberg, G. P., Wang, J. F., Song, J., Martin, T. G., Cheung, J. Y., Qu, H. Q., Hakonarson, H., & Feldman, A. M. (2023). BAG3: Nature's Quintessential Multi-

- Functional Protein Functions as a Ubiquitous Intra-Cellular Glue. *Cells*, 12(6), 937. <https://doi.org/10.3390/cells12060937>
- Bulun, S. E., Wan, Y., & Matei, D. (2019). Epithelial Mutations in Endometriosis: Link to Ovarian Cancer. *Endocrinology*, 160(3), 626–638. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00794>.
- Cai, G., Si, M., Li, X., Zou, H., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Liu, Z., & Bian, J. (2019). Zearalenone induces apoptosis of rat Sertoli cells through Fas-Fas ligand and mitochondrial pathway. *Environmental toxicology*, 34(4), 424–433. <https://doi.org/10.1002/tox.22696>
- Capaci, V., Bascetta, L., Fantuz, M., Beznoussenko, G. V., Sommaggio, R., Cancila, V., Bisso, A., Campaner, E., Mironov, A. A., Wiśniewski, J. R., Ulloa Severino, L., Scaini, D., Bossi, F., Lees, J., Alon, N., Brunga, L., Malkin, D., Piazza, S., Collavin, L., Rosato, A., Del Sal, G. (2020). Mutant p53 induces Golgi tubulo-vesiculation driving a prometastatic secretome. *Nature communications*, 11(1), 3945. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17596-5>
- Casa, A. J., Potter, A. S., Malik, S., Lazard, Z., Kuitatse, I., Kim, H. T., Tsimelzon, A., Creighton, C. J., Hilsenbeck, S. G., Brown, P. H., Oesterreich, S., & Lee, A. V. (2012). Estrogen and insulin-like growth factor-I (IGF-I) independently down-regulate critical repressors of breast cancer growth. *Breast cancer research and treatment*, 132(1), 61–73. <https://doi.org/10.1007/s10549-011-1540-0>
- Chen, I. C., Hsiao, L. P., Huang, I. W., Yu, H. C., Yeh, L. C., Lin, C. H., Wei-Wu Chen, T., Cheng, A. L., & Lu, Y. S. (2017). Phosphatidylinositol-3 Kinase Inhibitors, Buparlisib and Alpelisib, Sensitize Estrogen Receptor-positive Breast Cancer Cells to Tamoxifen. *Scientific reports*, 7(1), 9842. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10555-z>
- Chen, S., Li, Y., Qian, L., Deng, S., Liu, L., Xiao, W., & Zhou, Y. (2021). A Review of the Clinical Characteristics and Novel Molecular Subtypes of Endometrioid Ovarian Cancer. *Frontiers in oncology*, 11, 668151. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.668151>
- Cheng, C. H., Chen, L. R., & Chen, K. H. (2022). Osteoporosis Due to Hormone Imbalance: An Overview of the Effects of Estrogen Deficiency and Glucocorticoid Overuse on Bone Turnover. *International journal of molecular sciences*, 23(3), 1376. <https://doi.org/10.3390/ijms23031376>
- Cheng, M., Michalski, S., & Kommagani, R. (2018). Role for Growth Regulation by Estrogen in Breast Cancer 1 (GREB1) in Hormone-Dependent Cancers. *International journal of molecular sciences*, 19(9), 2543. <https://doi.org/10.3390/ijms19092543>
- Cheng, R., Qi, L., Kong, X., Wang, Z., Fang, Y., & Wang, J. (2020). Identification of the Significant Genes Regulated by Estrogen Receptor in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer and Their Expression Pattern Changes When Tamoxifen or Fulvestrant Resistance Occurs. *Frontiers in genetics*, 11, 538734. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.538734>
- Chow, L. W. C., Morita, S., Chow, C. Y. C., Ng, W. K., & Toi, M. (2018). Neoadjuvant palbociclib on ER+ breast cancer (N007): clinical response and EndoPredict's value. *Endocrine-related cancer*, 25(2), 123–130. <https://doi.org/10.1530/ERC-17-0396>
- Colorado-Yohar, S. M., Castillo-González, A. C., Sánchez-Meca, J., Rubio-Aparicio, M., Sánchez-Rodríguez, D., Salamanca-Fernández, E., Ardanaz, E., Amiano, P., Fernández, M. F., Mendiola, J., Navarro-Mateu, F., & Chirlaque, M. D. (2021). Concentrations of bisphenol-A in adults from the general population: A systematic review and meta-analysis. *The Science of the total environment*, 775, 145755. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145755>
- Contiliani, D. F., Ribeiro, Y. A., de Moraes, V. N., & Pereira, T. C. (2021). MicroRNAs in Prion Diseases-From Molecular Mechanisms to Insights in Translational Medicine. *Cells*, 10(7), 1620. <https://doi.org/10.3390/cells10071620>
- Cook, K. L., Clarke, P. A., Parmar, J., Hu, R., Schwartz-Roberts, J. L., Abu-Asab, M., Wärrri, A., Baumann, W. T., & Clarke, R. (2014). Knockdown of estrogen receptor- α induces autophagy and inhibits antiestrogen-mediated unfolded protein response activation, promoting ROS-induced breast cancer cell death. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 28(9), 3891–3905. <https://doi.org/10.1096/fj.13-247353>
- Cooke, S. L., Ng, C. K., Melnyk, N., Garcia, M. J., Hardcastle, T., Temple, J., Langdon, S., Huntsman, D., & Brenton, J. D. (2010). Genomic analysis of genetic heterogeneity and evolution in high-grade serous ovarian carcinoma. *Oncogene*, 29(35), 4905–4913. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.245>
- Cortez, A. J., Tudrej, P., Kujawa, K. A., & Lisowska, K. M. (2018). Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 81(1), 17–38. <https://doi.org/10.1007/s00280-017-3501-8>

- Cuesta, R., Gritsenko, M. A., Petyuk, V. A., Shukla, A. K., Tsai, C. F., Liu, T., McDermott, J. E., & Holz, M. K. (2019). Phosphoproteome Analysis Reveals Estrogen-ER Pathway as a Modulator of mTOR Activity Via DEPTOR. *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 18(8), 1607–1618. <https://doi.org/10.1074/mcp.RA119.001506>
- Cui, J., Shen, Y., & Li, R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends in molecular medicine*, 19(3), 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.12.007>
- Dai, T., Liang, J., Liu, W., Zou, Y., Niu, F., Li, M., Zhang, H., Li, C., Fan, M., & Cui, G. (2021). The miRNA mir-582-3p suppresses ovarian cancer progression by targeting AKT/MTOR signaling via lncRNA TUG1. *Bioengineered*, 12(2), 10771–10781. <https://doi.org/10.1080/21655979.2021.2003662>
- de Aguiar Greca, S. C., Kyrou, I., Pink, R., Randeva, H., Grammatopoulos, D., Silva, E., & Karteris, E. (2020). Involvement of the Endocrine-Disrupting Chemical Bisphenol A (BPA) in Human Placentation. *Journal of clinical medicine*, 9(2), 405. <https://doi.org/10.3390/jcm9020405>
- Deb, B., Uddin, A., & Chakraborty, S. (2018). miRNAs and ovarian cancer: An overview. *Journal of cellular physiology*, 233(5), 3846–3854. <https://doi.org/10.1002/jcp.26095>
- Deng, P., Tan, M., Zhou, W., Chen, C., Xi, Y., Gao, P., Ma, Q., Liang, Y., Chen, M., Tian, L., Xie, J., Liu, M., Luo, Y., Li, Y., Zhang, L., Wang, L., Zeng, Y., Pi, H., Yu, Z., & Zhou, Z. (2021). Bisphenol A promotes breast cancer cell proliferation by driving miR-381-3p-PTTG1-dependent cell cycle progression. *Chemosphere*, 268, 129221. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129221>
- di Gennaro, A., Damiano, V., Brisotto, G., Armellin, M., Perin, T., Zucchetto, A., Guardascione, M., Spink, H. P., Doglioni, C., Snaar-Jagalska, B. E., Santarosa, M., & Maestro, R. (2019). Correction to: A p53/miR-30a/ZEB2 axis controls triple negative breast cancer aggressiveness. *Cell death and differentiation*, 26(11), 2493. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0249-6>
- Di Leva, G., Garofalo, M., & Croce, C. M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*, 9, 287–314. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012513-104715>
- Dias, P., Tvrđý, V., Jirkovský, E., Dolenc, M. S., Peterlin Mašič, L., & Mladěnka, P. (2022). The effects of bisphenols on the cardiovascular system. *Critical reviews in toxicology*, 52(1), 66–87. <https://doi.org/10.1080/10408444.2022.2046690>
- Dochez, V., Caillon, H., Vaucel, E., Dimet, J., Winer, N., & Ducarme, G. (2019). Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *Journal of ovarian research*, 12(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0503-7>
- Doubeni, C. A., Doubeni, A. R., & Myers, A. E. (2016). Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *American family physician*, 93(11), 937–944.
- Dumitrascu, M. C., Mares, C., Petca, R. C., Sandru, F., Popescu, R. I., Mehedintu, C., & Petca, A. (2020). Carcinogenic effects of bisphenol A in breast and ovarian cancers. *Oncology letters*, 20(6), 282. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12145>
- Faltas, C. L., LeBron, K. A., & Holz, M. K. (2020). Unconventional Estrogen Signaling in Health and Disease. *Endocrinology*, 161(4), bqaa030. <https://doi.org/10.1210/endo/bqaa030>
- Fan, D., Ren, B., Yang, X., Liu, J., & Zhang, Z. (2016). Upregulation of miR-501-5p activates the wnt/β-catenin signaling pathway and enhances stem cell-like phenotype in gastric cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*, 35(1), 177. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0432-x>
- Farkas, S., Szabó, A., Hegyi, A. E., Török, B., Fazekas, C. L., Ernszt, D., Kovács, T., & Zelena, D. (2022). Estradiol and Estrogen-like Alternative Therapies in Use: The Importance of the Selective and Non-Classical Actions. *Biomedicines*, 10(4), 861. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040861>
- Fathalla M. F. (2013). Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis re-visited. *Facts, views & vision in ObGyn*, 5(4), 292–297.
- Felzen, V., Hiebel, C., Koziollek-Drechsler, I., Reißig, S., Wolfrum, U., Kögel, D., Brandts, C., Behl, C., & Morawe, T. (2015). Estrogen receptor α regulates non-canonical autophagy that provides stress resistance to neuroblastoma and breast cancer cells and involves BAG3 function. *Cell death & disease*, 6(7), e1812. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.181>
- Flores, V. A., Pal, L., & Manson, J. E. (2021). Hormone Therapy in Menopause: Concepts, Controversies, and Approach to Treatment. *Endocrine reviews*, 42(6), 720–752. <https://doi.org/10.1210/endo/bnab011>

- Franke, C. M., Gu, V. W., Grimm, B. G., Cassady, V. C., White, J. R., Weigel, R. J., & Kulak, M. V. (2020). TFAP2C regulates carbonic anhydrase XII in human breast cancer. *Oncogene*, *39*(6), 1290–1301. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1062-5>
- Fu, Y., Jin, Y., Zhao, Y., Shan, A., Fang, H., Shen, J., Zhou, C., Yu, H., Zhou, Y. F., Wang, X., Wang, J., Li, R., Wang, R., & Zhang, J. (2019). Zearalenone induces apoptosis in bovine mammary epithelial cells by activating endoplasmic reticulum stress. *Journal of dairy science*, *102*(11), 10543–10553. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16216>
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology*, *116*, 135–170. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Fujiwara, T., Lambert-Messerlian, G., Sidis, Y., Leykin, L., Isaacson, K., Toth, T., & Schneyer, A. (2000). Analysis of follicular fluid hormone concentrations and granulosa cell mRNA levels for the inhibin-activin-follistatin system: relation to oocyte and embryo characteristics. *Fertility and sterility*, *74*(2), 348–355. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)00652-x](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)00652-x)
- Gadducci, A., Sergiampietri, C., Lanfredini, N., & Guiggi, I. (2014). Micro-RNAs and ovarian cancer: the state of art and perspectives of clinical research. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, *30*(4), 266–271. <https://doi.org/10.3109/09513590.2013.871525>
- Gao, J., Song, T., Che, D., Li, C., Jiang, J., Pang, J., Yang, Y., Goma, & Li, P. (2019). The effect of bisphenol a exposure onto endothelial and decidualized stromal cells on regulation of the invasion ability of trophoblastic spheroids in in vitro co-culture model. *Biochemical and biophysical research communications*, *516*(2), 506–514. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.06.066>
- Gao, S., Bian, T., Su, M., Liu, Y., & Zhang, Y. (2020). miR-26a inhibits ovarian cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting TCF12. *Oncology reports*, *43*(1), 368–374. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7417>
- Gaona-Luviano, P., Medina-Gaona L.A., Magaña-Pérez, K. (2020). Epidemiology of ovarian cancer. *Chin Clin Oncol*, *9*(4):47. doi: 10.21037/cco-20-34
- García, J., Hurwitz, H. I., Sandler, A. B., Miles, D., Coleman, R. L., Deurloo, R., & Chinot, O. L. (2020). Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer treatment reviews*, *86*, 102017. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102017>
- Gargallo, P., Yáñez, Y., Segura, V., Juan, A., Torres, B., Balaguer, J., Oltra, S., Castel, V., & Cañete, A. (2020). Li-Fraumeni syndrome heterogeneity. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, *22*(7), 978–988. <https://doi.org/10.1007/s12094-019-02236-2>
- Geisler, A., & Fechner, H. (2016). MicroRNA-regulated viral vectors for gene therapy. *World journal of experimental medicine*, *6*(2), 37–54. <https://doi.org/10.5493/wjem.v6.i2.37>
- Gertz, J., Reddy, T. E., Varley, K. E., Garabedian, M. J., & Myers, R. M. (2012). Genistein and bisphenol A exposure cause estrogen receptor 1 to bind thousands of sites in a cell type-specific manner. *Genome research*, *22*(11), 2153–2162. <https://doi.org/10.1101/gr.135681.111>
- Ghafouri-Fard, S., Shoorei, H., & Taheri, M. (2020). miRNA profile in ovarian cancer. *Experimental and molecular pathology*, *113*, 104381. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2020.104381>
- Ghini, F., Rubolino, C., Climent, M., Simeone, I., Marzi, M. J., & Nicassio, F. (2018). Endogenous transcripts control miRNA levels and activity in mammalian cells by target-directed miRNA degradation. *Nature communications*, *9*(1), 3119. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05182-9>
- Ghosh, D., Nandi, S., & Bhattacharjee, S. (2018). Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances. *Clinical and translational medicine*, *7*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0211-8>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *15*(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- He, R., Yang, L., Lin, X., Chen, X., Lin, X., Wei, F., Liang, X., Luo, Y., Wu, Y., Gan, T., Dang, Y., & Chen, G. (2015). MiR-30a-5p suppresses cell growth and enhances apoptosis of hepatocellular carcinoma cells via targeting AEG-1. *International journal of clinical and experimental pathology*, *8*(12), 15632–15641.
- Heneweer, M., Houtman, R., Poortman, J., Groot, M., Maliepaard, C., & Peijnenburg, A. (2007). Estrogenic effects in the immature rat uterus after dietary exposure to ethinylestradiol and zearalenone using a systems biology

- approach. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 99(1), 303–314. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfm151>
- Herzog, S. K., & Fuqua, S. A. W. (2022). ESR1 mutations and therapeutic resistance in metastatic breast cancer: progress and remaining challenges. *British journal of cancer*, 126(2), 174–186. <https://doi.org/10.1038/s41416-021-01564-x>
- Hewitt, S. C., & Korach, K. S. (2018). Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. *Endocrine reviews*, 39(5), 664–675. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00087>
- Hill, M., & Tran, N. (2021). miRNA interplay: mechanisms and consequences in cancer. *Disease models & mechanisms*, 14(4), dmm047662. <https://doi.org/10.1242/dmm.047662>
- Hisada, T., Kondo, N., Wanifuchi-Endo, Y., Osaga, S., Fujita, T., Asano, T., Uemoto, Y., Nishikawa, S., Katagiri, Y., Terada, M., Kato, A., Sugiura, H., Okuda, K., Kato, H., Komura, M., Morita, S., Takahashi, S., & Toyama, T. (2022). Co-expression effect of LLGL2 and SLC7A5 to predict prognosis in ER α -positive breast cancer. *Scientific reports*, 12(1), 16515. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20225-4>
- Ho, P. T. B., Clark, I. M., & Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International journal of molecular sciences*, 23(13), 7167. <https://doi.org/10.3390/ijms23137167>
- Hodgkinson, K., Forrest, L. A., Vuong, N., Garson, K., Djordjevic, B., & Vanderhyden, B. C. (2018). GREB1 is an estrogen receptor-regulated tumour promoter that is frequently expressed in ovarian cancer. *Oncogene*, 37(44), 5873–5886. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0377-y>
- Hong, D. S., Kang, Y. K., Borad, M., Sachdev, J., Ejadi, S., Lim, H. Y., Brenner, A. J., Park, K., Lee, J. L., Kim, T. Y., Shin, S., Becerra, C. R., Falchook, G., Stoudemire, J., Martin, D., Kelnar, K., Peltier, H., Bonato, V., Bader, A. G., Smith, S., Beg, M. S. (2020). Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *British journal of cancer*, 122(11), 1630–1637. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0802-1>
- Howard, E. W., & Yang, X. (2018). microRNA Regulation in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer and Endocrine Therapy. *Biological procedures online*, 20, 17. <https://doi.org/10.1186/s12575-018-0082-9>
- Hudson, K., Hancox, U. J., Trigwell, C., McEwen, R., Polanska, U. M., Nikolaou, M., Morentin Gutierrez, P., Avivar-Valderas, A., Delpuech, O., Dudley, P., Hanson, L., Ellston, R., Jones, A., Cumberbatch, M., Cosulich, S. C., Ward, L., Cruzalegui, F., & Green, S. (2016). Intermittent High-Dose Scheduling of AZD8835, a Novel Selective Inhibitor of PI3K α and PI3K δ , Demonstrates Treatment Strategies for PIK3CA-Dependent Breast Cancers. *Molecular cancer therapeutics*, 15(5), 877–889. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0687>
- Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C. G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer research*, 65(16), 7065–7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>
- Jain, N., Roy, J., Das, B., & Mallick, B. (2019). miR-197-5p inhibits sarcomagenesis and induces cellular senescence via repression of KIAA0101. *Molecular carcinogenesis*, 58(8), 1376–1388. <https://doi.org/10.1002/mc.23021>
- Jansson, M. D., & Lund, A. H. (2012). *MicroRNA and cancer*. *Molecular Oncology*, 6(6), 590–610. doi:10.1016/j.molonc.2012.09.006
- Jiao, L., Liu, Y., Yu, X. Y., Pan, X., Zhang, Y., Tu, J., Song, Y. H., & Li, Y. (2023). Ribosome biogenesis in disease: new players and therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*, 8(1), 15. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01285-4>
- Jordan V. C. (2015). The new biology of estrogen-induced apoptosis applied to treat and prevent breast cancer. *Endocrine-related cancer*, 22(1), R1–R31. <https://doi.org/10.1530/ERC-14-0448>
- Jun, J. H., Oh, J. E., Shim, J. K., Kwak, Y. L., & Cho, J. S. (2021). Effects of bisphenol A on the proliferation, migration, and tumor growth of colon cancer cells: In vitro and in vivo evaluation with mechanistic insights related to ERK and 5-HT3. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 158, 112662. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112662>
- Karantza V. (2011). Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. *Oncogene*, 30(2), 127–138. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.456>
- Khatpe, A. S., Adebayo, A. K., Herodotou, C. A., Kumar, B., & Nakshatri, H. (2021). Nexus between PI3K/AKT and Estrogen Receptor Signaling in Breast Cancer. *Cancers*, 13(3), 369. <https://doi.org/10.3390/cancers13030369>

- Kim, C. H., Kim, M. J., Park, J., Kim, J., Kim, J. Y., An, M. J., Shin, G. S., Lee, H. M., & Kim, J. W. (2021). Bisphenol A Exposure Changes the Transcriptomic and Proteomic Dynamics of Human Retinoblastoma Y79 Cells. *Genes*, *12*(2), 264. <https://doi.org/10.3390/genes12020264> (a)
- Kim, H. J., Choi, W. J., & Lee, C. H. (2015). Phosphorylation and Reorganization of Keratin Networks: Implications for Carcinogenesis and Epithelial Mesenchymal Transition. *Biomolecules & therapeutics*, *23*(4), 301–312. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.032>
- Kim, S., You, D., Jeong, Y., Yoon, S. Y., Kim, S. A., & Lee, J. E. (2021). Inhibition of platelet-derived growth factor receptor synergistically increases the pharmacological effect of tamoxifen in estrogen receptor α positive breast cancer. *Oncology letters*, *21*(4), 294. <https://doi.org/10.3892/ol.2021.12555> (b)
- Klinge C. M. (2012). miRNAs and estrogen action. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, *23*(5), 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.002>
- Klinge C. M. (2015). miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. *Molecular and cellular endocrinology*, *418 Pt 3*(0 3), 273–297. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.035>
- Kohn, G. E., Rodriguez, K. M., Hotaling, J., & Pastuszak, A. W. (2019). The History of Estrogen Therapy. *Sexual medicine reviews*, *7*(3), 416–421. <https://doi.org/10.1016/j.sxmr.2019.03.006>
- Kossai, M., Leary, A., Scoazec, J. Y., & Genestie, C. (2018). Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, *85*(1-2), 41–49. <https://doi.org/10.1159/000479006>
- Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2016). Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental toxicology and pharmacology*, *48*, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.015>
- Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., Domińska, K., Urbanek, K. A., & Piastowska-Ciesielska, A. W. (2020). ER β and NF κ B-Modulators of Zearalenone-Induced Oxidative Stress in Human Prostate Cancer Cells. *Toxins*, *12*(3), 199. <https://doi.org/10.3390/toxins12030199>
- 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. <https://doi.org/10.3390/toxins10030098>
- Köbel, M., & Kang, E. Y. (2022). The Evolution of Ovarian Carcinoma Subclassification. *Cancers*, *14*(2), 416. <https://doi.org/10.3390/cancers14020416>
- Krebs, J., Agellon, L. B., & Michalak, M. (2015). Ca(2+) homeostasis and endoplasmic reticulum (ER) stress: An integrated view of calcium signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, *460*(1), 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.02.004>
- Kroeger, P. T., Jr, & Drapkin, R. (2017). Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, *29*(1), 26–34. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000340>
- Kumar, M., Lu, Z., Takwi, A. A., Chen, W., Callander, N. S., Ramos, K. S., Young, K. H., & Li, Y. (2011). Negative regulation of the tumor suppressor p53 gene by microRNAs. *Oncogene*, *30*(7), 843–853. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.457>
- Kyuno, D., Takasawa, A., Kikuchi, S., Takemasa, I., Osanai, M., & Kojima, T. (2021). Role of tight junctions in the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, *1863*(3), 183503. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183503>
- La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., Guyton, K. Z., Kortenkamp, A., Coglianò, V. J., Woodruff, T. J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K. S., Gore, A. C., Zeise, L., & Zoeller, R. T. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature reviews. Endocrinology*, *16*(1), 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- La Vecchia C. (2017). Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*, *26*(1), 55–62. <https://doi.org/10.1097/CEJ.0000000000000217>
- Landrigan, P. J., Raps, H., Cropper, M., Bald, C., Brunner, M., Canonizado, E. M., Charles, D., Chiles, T. C., Donohue, M. J., Enck, J., Fenichel, P., Fleming, L. E., Ferrier-Pages, C., Fordham, R., Gozt, A., Griffin, C., Hahn, M. E., Haryanto, B., Hixson, R., Ianelli, H., ... Dunlop, S. (2023). The Minderoo-Monaco Commission on Plastics and Human Health. *Annals of global health*, *89*(1), 23. <https://doi.org/10.5334/aogh.4056>

- Langdon, S. P., Gourley, C., Gabra, H., & Stanley, B. (2017). Endocrine therapy in epithelial ovarian cancer. *Expert review of anticancer therapy*, *17*(2), 109–117. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1272414>
- Langdon, S. P., Herrington, C. S., Hollis, R. L., & Gourley, C. (2020). Estrogen Signaling and Its Potential as a Target for Therapy in Ovarian Cancer. *Cancers*, *12*(6), 1647. <https://doi.org/10.3390/cancers12061647>
- Langer, R. D., Hodis, H. N., Lobo, R. A., & Allison, M. A. (2021). Hormone replacement therapy - where are we now?. *Climacteric: the journal of the International Menopause Society*, *24*(1), 3–10. <https://doi.org/10.1080/13697137.2020.1851183>
- Laudato, S., Patil, N., Abba, M. L., Leupold, J. H., Benner, A., Gaiser, T., Marx, A., & Allgayer, H. (2017). P53-induced miR-30e-5p inhibits colorectal cancer invasion and metastasis by targeting ITGA6 and ITGB1. *International journal of cancer*, *141*(9), 1879–1890. <https://doi.org/10.1002/ijc.30854>
- Lecomte, S., Demay, F., Pham, T. H., Moulis, S., Efstathiou, T., Chalmel, F., & Pakdel, F. (2019). Deciphering the Molecular Mechanisms Sustaining the Estrogenic Activity of the Two Major Dietary Compounds Zearalenone and Apigenin in ER-Positive Breast Cancer Cell Lines. *Nutrients*, *11*(2), 237. <https://doi.org/10.3390/nu11020237>
- Lheureux, S., Braunstein, M., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA: a cancer journal for clinicians*, *69*(4), 280–304. <https://doi.org/10.3322/caac.21559>
- Li, B., Cao, Y., Sun, M., & Feng, H. (2021). Expression, regulation, and function of exosome-derived miRNAs in cancer progression and therapy. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *35*(10), e21916. <https://doi.org/10.1096/fj.202100294RR> (a)
- Li, D., Chen, J., Ai, Y., Gu, X., Li, L., Che, D., Jiang, Z., Li, L., Chen, S., Huang, H., Wang, J., Cai, T., Cao, Y., Qi, X., & Wang, X. (2019). Estrogen-Related Hormones Induce Apoptosis by Stabilizing Schlafen-12 Protein Turnover. *Molecular cell*, *75*(6), 1103–1116.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.040> (a)
- Li, M., Zhang, F., Su, Y., Zhou, J., & Wang, W. (2018). Nanoparticles designed to regulate tumor microenvironment for cancer therapy. *Life sciences*, *201*, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.03.044>
- Li, Y., Burns, K. A., Arao, Y., Luh, C. J., & Korach, K. S. (2012). Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor α and β in vitro. *Environmental health perspectives*, *120*(7), 1029–1035. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104689>
- Li, Y., Lei, B., Zou, J., Wang, W., Chen, A., Zhang, J., Fu, Y., & Li, Z. (2019). High expression of carbonic anhydrase 12 (CA12) is associated with good prognosis in breast cancer. *Neoplasma*, *66*(3), 420–426. https://doi.org/10.4149/neo_2018_180819N624 (b)
- Li, Z., Lyu, C., Ren, Y., & Wang, H. (2020). Role of TET Dioxygenases and DNA Hydroxymethylation in Bisphenols-Stimulated Proliferation of Breast Cancer Cells. *Environmental health perspectives*, *128*(2), 27008. <https://doi.org/10.1289/EHP5862>
- Li, Z., Yin, H., Chen, K., Ding, B., Xu, J., Ren, M., Zhang, C., & Shen, Y. (2022). Effects of bisphenol A on uterine leiomyoma: In vitro and in vivo evaluation with mechanistic insights related to XBP1. *Ecotoxicology and environmental safety*, *247*, 114201. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114201>
- Li, Z., Yin, H., Shen, Y., Ren, M., & Xu, X. (2021). The influence of phenolic environmental estrogen on the transcriptome of uterine leiomyoma cells: A whole transcriptome profiling-based analysis. *Ecotoxicology and environmental safety*, *211*, 111945. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111945> (b)
- Liang, J., & Shang, Y. (2013). Estrogen and cancer. *Annual review of physiology*, *75*, 225–240. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-030212-183708>
- Liang, X., Zhao, Y., Fang, Z., Shao, N., Zhai, D., Zhang, M., Yu, L., & Shi, Y. (2022). DLGAP1-AS2 promotes estrogen receptor signalling and confers tamoxifen resistance in breast cancer. *Molecular biology reports*, *49*(5), 3939–3947. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07244-0> (a)
- Liang, Z., Tang, S., He, R., Luo, W., Qin, S., & Jiang, H. (2022). The effect and mechanism of miR-30e-5p targeting SNAI1 to regulate epithelial-mesenchymal transition on pancreatic cancer. *Bioengineered*, *13*(4), 8013–8028. <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2050880> (b)
- Liew, W. P., & Mohd-Redzwan, S. (2018). Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *8*, 60. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00060>
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, *15*(6), 321–333. doi:10.1038/nrc3932

- Liu, R., Chen, Y., Liu, G., Li, C., Song, Y., Cao, Z., Li, W., Hu, J., Lu, C., & Liu, Y. (2020). PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers. *Cell death & disease*, *11*(9), 797. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-02998-6>
- Lo, E. K. K., Lee, J. C., Turner, P. C., & El-Nezami, H. (2021). Low dose of zearalenone elevated colon cancer cell growth through G protein-coupled estrogenic receptor. *Scientific reports*, *11*(1), 7403. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86788-w>
- Loi, M., Fanelli, F., Liuzzi, V. C., Logrieco, A. F., & Mulè, G. (2017). Mycotoxin Biotransformation by Native and Commercial Enzymes: Present and Future Perspectives. *Toxins*, *9*(4), 111. <https://doi.org/10.3390/toxins9040111>
- Mahato, D. K., Devi, S., Pandhi, S., Sharma, B., Maurya, K. K., Mishra, S., Dhawan, K., Selvakumar, R., Kamle, M., Mishra, A. K., & Kumar, P. (2021). Occurrence, Impact on Agriculture, Human Health, and Management Strategies of Zearalenone in Food and Feed: A Review. *Toxins*, *13*(2), 92. <https://doi.org/10.3390/toxins13020092>
- Makhlouf, S., Quinn, C., Toss, M., Alsaleem, M., Atallah, N. M., Ibrahim, A., Rutland, C. S., Mongan, N. P., & Rakha, E. A. (2024). Quantitative expression of oestrogen receptor in breast cancer: Clinical and molecular significance. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*, *197*, 113473. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2023.113473>
- Mao, J., Kinkade, J. A., Bivens, N. J., & Rosenfeld, C. S. (2021). miRNA changes in the mouse placenta due to bisphenol A exposure. *Epigenomics*, *13*(24), 1909–1919. <https://doi.org/10.2217/epi-2021-0339>
- Mao, L., Liu, S., Hu, L., Jia, L., Wang, H., Guo, M., Chen, C., Liu, Y., & Xu, L. (2018). miR-30 Family: A Promising Regulator in Development and Disease. *BioMed research international*, *2018*, 9623412. <https://doi.org/10.1155/2018/9623412>
- Markovics, A., Tóth, K. F., Sós, K. E., Magi, J., Gyöngyösi, A., Benyó, Z., Zouboulis, C. C., Bíró, T., & Oláh, A. (2019). Nicotinic acid suppresses sebaceous lipogenesis of human sebocytes via activating hydroxycarboxylic acid receptor 2 (HCA₂). *Journal of cellular and molecular medicine*, *23*(9), 6203–6214. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14505>
- Márton, É., Varga, A., Penyige, A., Birkó, Z., Balogh, I., Nagy, B., & Szilágyi, M. (2023). Comparative Analysis of Transcriptomic Changes including mRNA and microRNA Expression Induced by the Xenoestrogens Zearalenone and Bisphenol A in Human Ovarian Cells. *Toxins*, *15*(2), 140. <https://doi.org/10.3390/toxins15020140>
- Márton, É., Varga, A., Soltész, B., Penyige, A., Lukács, J., Póka, R., ... & Szilágyi, M. (2021). Comparative analysis of cell-free miR-205-5p, let-7f-5p, and miR-483-5p expression in ovarian cell cultures and plasma samples of patients with ovarian cancer. *Applied Sciences*, *11*(4), 1735.
- Márton, É., Varga, A., Széles, L., Göczi, L., Penyige, A., Nagy, B., & Szilágyi, M. (2020). The cell-free expression of miR200 family members correlates with estrogen sensitivity in human epithelial ovarian cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(24), 9725.
- Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J., & Karlan, B. Y. (2016). *Ovarian cancer. Nature Reviews Disease Primers*, *2*, 16061. doi:10.1038/nrdp.2016.61
- Mehta, G. A., Parker, J. S., Silva, G. O., Hoadley, K. A., Perou, C. M., & Gatz, M. L. (2017). Amplification of SOX4 promotes PI3K/Akt signaling in human breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, *162*(3), 439–450. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4139-2>
- Men, X., Ma, J., Wu, T., Pu, J., Wen, S., Shen, J., Wang, X., Wang, Y., Chen, C., & Dai, P. (2017). Transcriptome profiling identified differentially expressed genes and pathways associated with tamoxifen resistance in human breast cancer. *Oncotarget*, *9*(3), 4074–4089. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23694>
- Menon, A., Abd-Aziz, N., Khalid, K., Poh, C. L., & Naidu, R. (2022). miRNA: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *International journal of molecular sciences*, *23*(19), 11502. <https://doi.org/10.3390/ijms231911502>
- Mi, Y., Liu, F., Liang, X., Liu, S., Huang, X., Sang, M., & Geng, C. (2019). Tumor suppressor let-7a inhibits breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting MAGE-A1. *Neoplasma*, *66*(1), 54–62. https://doi.org/10.4149/neo_2018_180302N146
- Michałowicz J. (2014). Bisphenol A--sources, toxicity and biotransformation. *Environmental toxicology and pharmacology*, *37*(2), 738–758. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.02.003>
- Mitra, R., Lin, C. C., Eischen, C. M., Bandyopadhyay, S., & Zhao, Z. (2015). Concordant dysregulation of miR-5p and miR-3p arms of the same precursor microRNA may be a mechanism in inducing cell proliferation and

- tumorigenesis: a lung cancer study. *RNA (New York, N.Y.)*, 21(6), 1055–1065. <https://doi.org/10.1261/rna.048132.114>
- Muthamilselvan, S., Ramasami Sundhar Baabu, P., & Palaniappan, A. (2023). Microfluidics for Profiling miRNA Biomarker Panels in AI-Assisted Cancer Diagnosis and Prognosis. *Technology in cancer research & treatment*, 22, 15330338231185284. <https://doi.org/10.1177/15330338231185284>
- Niaz, S., & Hussain, M. U. (2018). Role of GW182 protein in the cell. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 101, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.05.009>
- Nicholson, K., MacLusky, N. J., & Leranath, C. (2020). Synaptic effects of estrogen. *Vitamins and hormones*, 114, 167–210. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2020.06.002>
- Nishi, K., Fu, W., & Kiyama, R. (2022). Novel estrogen-responsive genes (ERGs) for the evaluation of estrogenic activity. *PloS one*, 17(8), e0273164. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273164>
- Nsengimana, B., Khan, F. A., Ngowi, E. E., Zhou, X., Jin, Y., Jia, Y., Wei, W., & Ji, S. (2022). Processing body (P-body) and its mediators in cancer. *Molecular and cellular biochemistry*, 477(4), 1217–1238. <https://doi.org/10.1007/s11010-022-04359-7>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, 9, 402. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Orr, B., & Edwards, R. P. (2018). Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer. *Hematology/oncology clinics of North America*, 32(6), 943–964. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2018.07.010>
- Paleari, L., & DeCensi, A. (2018). Endocrine therapy in ovarian cancer: where do we stand?. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 30(1), 17–22. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000423>
- Parveen, M., Zhu, Y., & Kiyama, R. (2009). Expression profiling of the genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen-responsive genes. *FEBS letters*, 583(14), 2377–2384. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.06.035>
- Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in cell biology*, 29(3), 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>
- Patel, S., Homaei, A., Raju, A. B., & Meher, B. R. (2018). Estrogen: The necessary evil for human health, and ways to tame it. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 102, 403–411. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.078>
- Paterni, I., Granchi, C., & Minutolo, F. (2017). Risks and benefits related to alimentary exposure to xenoestrogens. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(16), 3384–3404. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1126547>
- Pelletier, J., Thomas, G., & Volarević, S. (2018). Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. *Nature reviews. Cancer*, 18(1), 51–63. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.104>
- Pinton, G., Nilsson, S., & Moro, L. (2018). Targeting estrogen receptor beta (ER β) for treatment of ovarian cancer: importance of KDM6B and SIRT1 for ER β expression and functionality. *Oncogenesis*, 7(2), 15. <https://doi.org/10.1038/s41389-018-0027-9>
- Piryaei, Z; Salehi, Z; Tahsili, MR; Ebrahimie, Esmail; Ebrahimi, M; Kavousi, K (2022). Agonist/antagonist compounds' mechanism of action on estrogen receptor-positive breast cancer: A system-level investigation assisted by meta-analysis. La Trobe. Journal contribution. <https://doi.org/10.26181/21266490.v1>
- Priego, A. R., Parra, E. G., Mas, S., Morgado-Pascual, J. L., Ruiz-Ortega, M., & Rayego-Mateos, S. (2021). Bisphenol A Modulates Autophagy and Exacerbates Chronic Kidney Damage in Mice. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 7189. <https://doi.org/10.3390/ijms22137189>
- Rai, A., Das, M., & Tripathi, A. (2020). Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Critical reviews in food science and nutrition*, 60(16), 2710–2729. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655388>
- Ranganathan, P., Nadig, N., & Nambiar, S. (2019). Non-canonical Estrogen Signaling in Endocrine Resistance. *Frontiers in endocrinology*, 10, 708. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00708>
- Rasdi, Z., Kamaludin, R., Ab Rahim, S., Syed Ahmad Fuad, S.B., Othman, M.H.D., Siran, R., Mohd Nor, N.S., Abdul Hamid Hasani, N., Sheikh Abdul Kadir, S.H. (2020). The impacts of intrauterine Bisphenol A exposure on pregnancy and expression of miRNAs related to heart development and diseases in animal model. *Sci. Rep.*, 10, 5882. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62420-1>.

- Ray, S., Johnston, R., Campbell, D. C., Nugent, S., McDade, S. S., Waugh, D., & Panov, K. I. (2013). Androgens and estrogens stimulate ribosome biogenesis in prostate and breast cancer cells in receptor dependent manner. *Gene*, *526*(1), 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.04.018>
- Reid, B. M., Permeth, J. B., & Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer biology & medicine*, *14*(1), 9–32. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>
- Reventun, P., Sanchez-Esteban, S., Cook, A., Cuadrado, I., Roza, C., Moreno-Gomez-Toledano, R., Muñoz, C., Zaragoza, C., Bosch, R. J., & Saura, M. (2020). Bisphenol A induces coronary endothelial cell necroptosis by activating RIP3/CamKII dependent pathway. *Scientific reports*, *10*(1), 4190. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61014-1>
- Rinne, N., Christie, E. L., Ardasheva, A., Kwok, C. H., Demchenko, N., Low, C., Tralau-Stewart, C., Fotopoulou, C., & Cunnea, P. (2021). Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in epithelial ovarian cancer, therapeutic treatment options for platinum-resistant ovarian cancer. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif.)*, *4*(3), 573–595. <https://doi.org/10.20517/cdr.2021.05>
- Rojas, K., & Stuckey, A. (2016). Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. *Clinical obstetrics and gynecology*, *59*(4), 651–672. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239>
- Rosenfeld C. S. (2021). Transcriptomics and Other Omics Approaches to Investigate Effects of Xenobiotics on the Placenta. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 723656. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.723656>
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, *16*(3), 203–222. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- Russell, J. K., Jones, C. K., & Newhouse, P. A. (2019). The Role of Estrogen in Brain and Cognitive Aging. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, *16*(3), 649–665. <https://doi.org/10.1007/s13311-019-00766-9>
- Saczko, J., Michel, O., Chwiłkowska, A., Sawicka, E., Mączyńska, J., & Kulbacka, J. (2017). Estrogen Receptors in Cell Membranes: Regulation and Signaling. *Advances in anatomy, embryology, and cell biology*, *227*, 93–105. https://doi.org/10.1007/978-3-319-56895-9_6
- Saha, T., Makar, S., Swetha, R., Gutti, G., & Singh, S. K. (2019). Estrogen signaling: An emanating therapeutic target for breast cancer treatment. *European journal of medicinal chemistry*, *177*, 116–143. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.023>
- Saito, Y., & Soga, T. (2021). Amino acid transporters as emerging therapeutic targets in cancer. *Cancer science*, *112*(8), 2958–2965. <https://doi.org/10.1111/cas.15006>
- Samuel, D., Diaz-Barbe, A., Pinto, A., Schlumbrecht, M., & George, S. (2022). Hereditary Ovarian Carcinoma: Cancer Pathogenesis Looking beyond *BRCA1* and *BRCA2*. *Cells*, *11*(3), 539. <https://doi.org/10.3390/cells11030539>
- Sang, C., Song, Y., Jin, T. W., Zhang, S., Fu, L., Zhao, Y., Zou, X., 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 international*, *28*(27), 36060–36068. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13267-0>
- Santen, R. J., & Simpson, E. (2019). History of Estrogen: Its Purification, Structure, Synthesis, Biologic Actions, and Clinical Implications. *Endocrinology*, *160*(3), 605–625. <https://doi.org/10.1210/en.2018-00529>
- Savant, S. S., Sriramkumar, S., & O'Hagan, H. M. (2018). The Role of Inflammation and Inflammatory Mediators in the Development, Progression, Metastasis, and Chemoresistance of Epithelial Ovarian Cancer. *Cancers*, *10*(8), 251. <https://doi.org/10.3390/cancers10080251>
- Savenkova, D. A., Makarova, A. A., Shalik, I. K., & Yudkin, D. V. (2022). miRNA Pathway Alteration in Response to Non-Coding RNA Delivery in Viral Vector-Based Gene Therapy. *International journal of molecular sciences*, *23*(23), 14954. <https://doi.org/10.3390/ijms232314954>
- Sengupta, S., Obiorah, I., Maximov, P. Y., Curpan, R., & Jordan, V. C. (2013). Molecular mechanism of action of bisphenol and bisphenol A mediated by oestrogen receptor alpha in growth and apoptosis of breast cancer cells. *British journal of pharmacology*, *169*(1), 167–178. <https://doi.org/10.1111/bph.12122>
- Shafei, A., Ramzy, M. M., Hegazy, A. I., Husseny, A. K., El-Hadary, U. G., Taha, M. M., & Mosa, A. A. (2018). The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. *Gene*, *647*, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.016>

- Shajahan-Haq, A. N., Boca, S. M., Jin, L., Bhuvaneshwar, K., Gusev, Y., Cheema, A. K., Demas, D. D., Raghavan, K. S., Michalek, R., Madhavan, S., & Clarke, R. (2017). EGR1 regulates cellular metabolism and survival in endocrine resistant breast cancer. *Oncotarget*, *8*(57), 96865–96884. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.18292>
- Shi, Y., Zhao, Y., Zhang, Y., AiErken, N., Shao, N., Ye, R., Lin, Y., & Wang, S. (2018). AFF3 upregulation mediates tamoxifen resistance in breast cancers. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, *37*(1), 254. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0928-7>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2020). Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*, *70*(1), 7–30. <https://doi.org/10.3322/caac.21590>
- Silva, S. S., Lopes, C., Teixeira, A. L., Carneiro de Sousa, M. J., & Medeiros, R. (2015). Forensic miRNA: potential biomarker for body fluids?. *Forensic science international. Genetics*, *14*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2014.09.002>
- So, M. Y., Tian, Z., Phoon, Y. S., Sha, S., Antoniou, M. N., Zhang, J., Wu, R. S., & Tan-Un, K. C. (2014). Gene expression profile and toxic effects in human bronchial epithelial cells exposed to zearalenone. *PloS one*, *9*(5), e96404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096404>
- Sonavane, M., & Gassman, N. R. (2019). Bisphenol A co-exposure effects: a key factor in understanding BPA's complex mechanism and health outcomes. *Critical reviews in toxicology*, *49*(5), 371–386. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1621263>
- Stewart, C., Ralyea, C., & Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Seminars in oncology nursing*, *35*(2), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>
- Sun, J., Huang, Y. R., Harrington, W. R., Sheng, S., Katzenellenbogen, J. A., & Katzenellenbogen, B. S. (2002). Antagonists selective for estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, *143*(3), 941–947. <https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8704>
- 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*, *71*(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- 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. <https://doi.org/10.3390/ijms21186827>
- Taranu, I., Braicu, C., Marin, D. E., Pistol, G. C., Motiu, M., Balacescu, L., Beridan Neagoe, I., & Burlacu, R. (2015). Exposure to zearalenone mycotoxin alters in vitro porcine intestinal epithelial cells by differential gene expression. *Toxicology letters*, *232*(1), 310–325. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.10.022>
- Temkin, S. M., Bergstrom, J., Samimi, G., & Minasian, L. (2017). Ovarian Cancer Prevention in High-risk Women. *Clinical obstetrics and gynecology*, *60*(4), 738–757. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000318>
- Thakkar, A. D., Raj, H., Chakrabarti, D., Ravishankar, Saravanan, N., Muthuvelan, B., Balakrishnan, A., & Padigaru, M. (2010). Identification of gene expression signature in estrogen receptor positive breast carcinoma. *Biomarkers in cancer*, *2*, 1–15. <https://doi.org/10.4137/BIC.S3793>
- Thakkar, A., Raj, H., Ravishankar, Muthuvelan, B., Balakrishnan, A., & Padigaru, M. (2015). High Expression of Three-Gene Signature Improves Prediction of Relapse-Free Survival in Estrogen Receptor-Positive and Node-Positive Breast Tumors. *Biomarker insights*, *10*, 103–112. <https://doi.org/10.4137/BMI.S30559>
- Thiebaut, C., Vlaeminck-Guillem, V., Trédan, O., Poulard, C., & Le Romancer, M. (2021). Non-genomic signaling of steroid receptors in cancer. *Molecular and cellular endocrinology*, *538*, 111453. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2021.111453>
- Tirado-Garibay, A. C., Falcón-Ruiz, E. A., Ochoa-Zarzosa, A., & López-Meza, J. E. (2023). GPER: An Estrogen Receptor Key in Metastasis and Tumoral Microenvironments. *International journal of molecular sciences*, *24*(19), 14993. <https://doi.org/10.3390/ijms241914993>
- Torres-García, J. L., Ahuactzin-Pérez, M., Fernández, F. J., & Cortés-Espinosa, D. V. (2022). Bisphenol A in the environment and recent advances in biodegradation by fungi. *Chemosphere*, *303*(Pt 1), 134940. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134940>
- Tremont, A., Lu, J., & Cole, J. T. (2017). Endocrine Therapy for Early Breast Cancer: Updated Review. *Ochsner journal*, *17*(4), 405–411.

- Tzanakakis, G., Kavasi, R. M., Voudouri, K., Berdiaki, A., Spyridaki, I., Tsatsakis, A., & Nikitovic, D. (2018). Role of the extracellular matrix in cancer-associated epithelial to mesenchymal transition phenomenon. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, 247(3), 368–381. <https://doi.org/10.1002/dvdy.24557>
- Urli, S., Corte Pause, F., Crociati, M., Baufeld, A., Monaci, M., & Stradaoli, G. (2023). Impact of Microplastics and Nanoplastics on Livestock Health: An Emerging Risk for Reproductive Efficiency. *Animals: an open access journal from MDPI*, 13(7), 1132. <https://doi.org/10.3390/ani13071132>
- van Zandwijk, N., Pavlakis, N., Kao, S. C., Linton, A., Boyer, M. J., Clarke, S., Huynh, Y., Chrzanowska, A., Fulham, M. J., Bailey, D. L., Cooper, W. A., Kritharides, L., Ridley, L., Pattison, S. T., MacDiarmid, J., Brahmbhatt, H., & Reid, G. (2017). Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. *The Lancet. Oncology*, 18(10), 1386–1396. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30621-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30621-6)
- Varga, A., Márton, É., Markovics, A., Penyige, A., Balogh, I., Nagy, B., & Szilágyi, M. (2022). Suppressing the PI3K/AKT Pathway by miR-30d-5p Mimic Sensitizes Ovarian Cancer Cells to Cell Death Induced by High-Dose Estrogen. *Biomedicines*, 10(9), 2060. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092060>
- Vasan, N., Toska, E., & Scaltriti, M. (2019). Overview of the relevance of PI3K pathway in HR-positive breast cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology*, 30(Suppl_10), x3–x11. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz281>
- Vishnoi, A., & Rani, S. (2016). *MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. MicroRNA Profiling*, 1–10. doi:10.1007/978-1-4939-6524-3_1
- Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., & Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochimica medica*, 24(3), 329–342. <https://doi.org/10.11613/BM.2014.035>
- Wang, J., Shidfar, A., Ivancic, D., Ranjan, M., Liu, L., Choi, M. R., Parimi, V., Gursel, D. B., Sullivan, M. E., Najor, M. S., Abukhdeir, A. M., Scholtens, D., & Khan, S. A. (2017). Overexpression of lipid metabolism genes and PBX1 in the contralateral breasts of women with estrogen receptor-negative breast cancer. *International journal of cancer*, 140(11), 2484–2497. <https://doi.org/10.1002/ijc.30680>
- Wang, K., Huang, D., Zhou, P., Su, X., Yang, R., Shao, C., Ma, A., & Wu, J. (2022). Individual and Combined Effect of Bisphenol A and Bisphenol AF on Prostate Cell Proliferation through NF-κB Signaling Pathway. *International journal of molecular sciences*, 23(20), 12283. <https://doi.org/10.3390/ijms232012283>
- Wang, L. H., Chen, L. R., & Chen, K. H. (2021). In Vitro and Vivo Identification, Metabolism and Action of Xenoestrogens: An Overview. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4013. <https://doi.org/10.3390/ijms22084013> (a)
- Wang, M., Wu, W., Li, L., He, J., Huang, S., Chen, S., Chen, J., Long, M., Yang, S., & Li, P. (2019). Analysis of the miRNA Expression Profiles in the Zearalenone-Exposed TM3 Leydig Cell Line. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 635. <https://doi.org/10.3390/ijms20030635> (a)
- Wang, S., Yang, Y., Luo, D., Zhai, L., Bai, Y., Wei, W., Sun, Q., & Jia, L. (2021). Bisphenol A increases TLR4-mediated inflammatory response by up-regulation of autophagy-related protein in lung of adolescent mice. *Chemosphere*, 268, 128837. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128837> (b)
- Wang, X., Ha, D., Yoshitake, R., Chan, Y. S., Sadava, D., & Chen, S. (2021). Exploring the Biological Activity and Mechanism of Xenoestrogens and Phytoestrogens in Cancers: Emerging Methods and Concepts. *International journal of molecular sciences*, 22(16), 8798. <https://doi.org/10.3390/ijms22168798>. (a)
- Wang, Y., Pringle, K. G., & Lumbers, E. R. (2013). The effects of cyclic AMP, sex steroids and global hypomethylation on the expression of genes controlling the activity of the renin-angiotensin system in placental cell lines. *Placenta*, 34(3), 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.12.018>
- Wang, Z., Alderman, M. H., Asgari, C., & Taylor, H. S. (2020). Fetal Bisphenol-A Induced Changes in Murine Behavior and Brain Gene Expression Persisted in Adult-aged Offspring. *Endocrinology*, 161(12), bqaa164. <https://doi.org/10.1210/endoct/bqaa164>
- Witten, L., & Slack, F. J. (2020). miR-155 as a novel clinical target for hematological malignancies. *Carcinogenesis*, 41(1), 2–7. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgz183>
- Wright, J. W., Stouffer, R. L., & Rodland, K. D. (2003). Estrogen inhibits cell cycle progression and retinoblastoma phosphorylation in rhesus ovarian surface epithelial cell culture. *Molecular and cellular endocrinology*, 208(1-2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2003.08.001>

- Wright, J. W., Stouffer, R. L., & Rodland, K. D. (2005). High-dose estrogen and clinical selective estrogen receptor modulators induce growth arrest, p21, and p53 in primate ovarian surface epithelial cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *90*(6), 3688–3695. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-2456>
- Wu, Y. H., Huang, Y. F., Chen, C. C., Huang, C. Y., & Chou, C. Y. (2020). Comparing PI3K/Akt Inhibitors Used in Ovarian Cancer Treatment. *Frontiers in pharmacology*, *11*, 206. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00206>
- Wu, Y., Zhang, Z., Cenciarini, M. E., Proietti, C. J., Amasino, M., Hong, T., Yang, M., Liao, Y., Chiang, H. C., Kaklamani, V. G., Jeselsohn, R., Vadlamudi, R. K., Huang, T. H., Li, R., De Angelis, C., Fu, X., Elizalde, P. V., Schiff, R., Brown, M., & Xu, K. (2018). Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Is Regulated by the EZH2-ER α -GREB1 Transcriptional Axis. *Cancer research*, *78*(3), 671–684. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-1327>
- Xiang, D., Liu, Y., Zhou, S., Zhou, E., & Wang, Y. (2021). Protective Effects of Estrogen on Cardiovascular Disease Mediated by Oxidative Stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, *2021*, 5523516. <https://doi.org/10.1155/2021/5523516>
- Xiang, J., Liu, X., Ren, J., Chen, K., Wang, H. L., Miao, Y. Y., & Qi, M. M. (2019). How does estrogen work on autophagy?. *Autophagy*, *15*(2), 197–211. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1520549>
- Xie, M., Bu, P., Li, F., Lan, S., Wu, H., Yuan, L., & Wang, Y. (2016). Neonatal bisphenol A exposure induces meiotic arrest and apoptosis of spermatogenic cells. *Oncotarget*, *7*(9), 10606–10615. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7218>
- Xu, J., Zheng, T., Hong, W., Ye, H., Hu, C., & Zheng, Y. (2018). Mechanism for the Decision of Ovarian Surface Epithelial Stem Cells to Undergo Neo-Oogenesis or Ovarian Tumorigenesis. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, *50*(1), 214–232. <https://doi.org/10.1159/000494001>
- Xu, X., Zong, K., Wang, X., Dou, D., Lv, P., Zhang, Z., & Li, H. (2021). miR-30d suppresses proliferation and invasiveness of pancreatic cancer by targeting the SOX4/PI3K-AKT axis and predicts poor outcome. *Cell death & disease*, *12*(4), 350. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03576-0>
- Yan, Y., Liu, X. Y., Lu, A., Wang, X. Y., Jiang, L. X., & Wang, J. C. (2022). Non-viral vectors for RNA delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, *342*, 241–279. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.008>
- Ye, L., Li, F., Song, Y., Yu, D., Xiong, Z., Li, Y., Shi, T., Yuan, Z., Lin, C., Wu, X., Ren, L., Li, X., & Song, L. (2018). Overexpression of CDCA7 predicts poor prognosis and induces EZH2-mediated progression of triple-negative breast cancer. *International journal of cancer*, *143*(10), 2602–2613. <https://doi.org/10.1002/ijc.31766>
- Yip, K. Y., Wan, M. L. Y., Wong, A. S. T., Korach, K. S., & El-Nezami, H. (2017). Combined low-dose zearalenone and aflatoxin B1 on cell growth and cell-cycle progression in breast cancer MCF-7 cells. *Toxicology letters*, *281*, 139–151. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.09.022>
- Yoshida R. (2021). Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, *28*(6), 1167–1180. <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01148-2>
- Yu, M., & Liu, J. (2020). MicroRNA-30d-5p promotes ovarian granulosa cell apoptosis by targeting Smad2. *Experimental and therapeutic medicine*, *19*(1), 53–60. <https://doi.org/10.3892/etm.2019.8184>
- Zahra, A., Dong, Q., Hall, M., Jeyaneethi, J., Silva, E., Karteris, E., & Sisu, C. (2021). Identification of Potential Bisphenol A (BPA) Exposure Biomarkers in Ovarian Cancer. *Journal of clinical medicine*, *10*(9), 1979. <https://doi.org/10.3390/jcm10091979>
- Zamwar, U. M., & Anjankar, A. P. (2022). Aetiology, Epidemiology, Histopathology, Classification, Detailed Evaluation, and Treatment of Ovarian Cancer. *Cureus*, *14*(10), e30561. <https://doi.org/10.7759/cureus.30561>
- Zhang, C., Xu, C., Gao, X., & Yao, Q. (2022). Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. *Theranostics*, *12*(5), 2115–2132. <https://doi.org/10.7150/thno.69424> (b)
- Zhang, G. L., Feng, Y. L., Song, J. L., & Zhou, X. S. (2018). Zearalenone: A Mycotoxin With Different Toxic Effect in Domestic and Laboratory Animals' Granulosa Cells. *Frontiers in genetics*, *9*, 667. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00667>
- Zhang, G. L., Zhang, R. Q., Sun, X. F., Cheng, S. F., Wang, Y. F., Ji, C. L., Feng, Y. Z., Yu, J., Ge, W., Zhao, Y., Sun, S. D., Shen, W., & Li, L. (2017). RNA-seq based gene expression analysis of ovarian granulosa cells exposed

- to zearalenone *in vitro*: significance to steroidogenesis. *Oncotarget*, 8(38), 64001–64014. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19699> (a)
- Zhang, R., Siu, M. K. Y., Ngan, H. Y. S., & Chan, K. K. L. (2022). Molecular Biomarkers for the Early Detection of Ovarian Cancer. *International journal of molecular sciences*, 23(19), 12041. <https://doi.org/10.3390/ijms231912041> (a)
- Zhang, R., Xu, J., Zhao, J., & Bai, J. (2017). Mir-30d suppresses cell proliferation of colon cancer cells by inhibiting cell autophagy and promoting cell apoptosis. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 39(6), 1010428317703984. <https://doi.org/10.1177/1010428317703984>. (b)
- Zhang, W., Qiu, X., Sun, D., Zhang, D., Qi, Y., Li, X., Liu, B., Liu, J., & Lin, B. (2020). Systematic Analysis of the Clinical Relevance of Cell Division Cycle Associated Family in Endometrial Carcinoma. *Journal of Cancer*, 11(19), 5588–5600. <https://doi.org/10.7150/jca.46324>
- Zheng, W., Feng, N., Wang, Y., Noll, L., Xu, S., Liu, X., Lu, N., Zou, H., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Zhu, G., Bian, J., Bai, J., & Liu, Z. (2019). Effects of zearalenone and its derivatives on the synthesis and secretion of mammalian sex steroid hormones: A review. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 126, 262–276. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.031>
- Zheng, W., Wang, B., Li, X., Wang, T., Zou, H., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Bai, J., Bian, J., & Liu, Z. (2018). Zearalenone Promotes Cell Proliferation or Causes Cell Death?. *Toxins*, 10(5), 184. <https://doi.org/10.3390/toxins10050184>
- Zhu, Y., Wang, H., Wang, J., Han, S., Zhang, Y., Ma, M., Zhu, Q., Zhang, K., & Yin, H. (2021). Zearalenone Induces Apoptosis and Cytoprotective Autophagy in Chicken Granulosa Cells by PI3K-AKT-mTOR and MAPK Signaling Pathways. *Toxins*, 13(3), 199. <https://doi.org/10.3390/toxins13030199>

11. Tárgyszavak

Petefészekrák, xenoösztrogén, ösztradiol, biszfenol A, zearalenon, mikroRNS, miR-30d-5p, PI3k/Akt útvonal, rákterápia, rákdiagnosztika

12. Key words

Ovarian cancer, xenoestrogen, estradiol, bisphenol A, zearalenon, microRNA, miR-30d-5p, PI3k/Akt pathway, cancer therapy, cancer diagnostics

13. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni hálámat a témavezetőm, **Dr. Szilágyi-Bónizs Melinda** felé. Szakmai felkészültsége és a kutatómunkához való hozzáállása példaértékű. Azon kívül, hogy messzemenően számíthattam a segítségére a munkám irányítása terén, magánjellegű problémákkal is bátran fordulhattam hozzá. Mindenkinek hozzá hasonló témavezetőt kívánok.

Hálásan köszönöm a Humánogenetikai Tanszék jelenlegi és nyugalmazott vezetőjének, **Prof. Dr. Balogh Istvánnak** és **Prof. Dr. Nagy Bálintnak**, hogy mindvégig támogatták a tanszéken folytatott munkámat, valamint amiért lehetővé tették, hogy eredményeimet két nemzetközi konferencián is bemutathassam.

Hálásan köszönöm **Dr. Márton-Deme Évának**, hogy igazi csapatként, egymást segítve dolgozhattunk együtt. TDK szakdolgozóként az ő segítségével tanultam bele a laboratóriumi munka rejtelmeibe. A munkám során technikai és elméleti tanácsokért is mindig fordulhattam hozzá. Ezenkívül a munkacsoportunk negyedik tagjának, **Magyarné Trefán Katalinnak** szeretném megköszönni a pótolhatatlan segítségét, amivel a mindennapi laboratóriumi munkámat nagyban megkönnyítette. Szeretném megköszönni a TDK hallgatóimnak, akikkel az évek során együtt dolgozhattam, és akikkel az együtt végzett munka alatt kölcsönösen sokat tanulhattunk egymástól, név szerint **Carina Inoue, Grimplinyi Fatime, Biri Dalma,** és **Domoszlai Dóra** hallgatóknak.

Külön köszönet illeti **Dr. Markovics Arnoldot**, aki mindig önzetlenül segített nekem akár felmerülő problémák megoldásáról, akár mérések kivitelezéséről volt szó. Köszönöm **Dr. Póliszka Szilárdnak** a szekvenálások elvégzését, valamint a bioinformatikai elemzésekben nyújtott elengedhetetlen segítségét.

Hálával tartozom a Humánogenetikai Tanszéki minden oktató kollegájának, hogy hasznos tanácsaikkal támogatták a munkámat, ők név szerint **Dr. Penyige András, Dr. Széles Lajos, Dr. Buglyó Gergely, Dr. Keserű Judit, Hádáné Dr. Birkó Zsuzsanna, Dr. Soltész Beáta** és **Szentesiné Dr. Szirák Krisztina**. Köszönet illeti még a tanszék további munkatársait, úgy, mint **Guba Erikát, Kompár Csillát, Menyhátrné Solymosi Líviát, Ujszászi Sándort** és **Varga Juditot**.

És végül külön köszönöm a férjemnek, a családomnak és a barátaimnak, hogy támogattak ezen az úton és lehetővé tették, hogy a tudományos pályára lépjek.

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

14. Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**
H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

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

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

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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





További közlemények

3. Márton, É., **Beke-Varga, A. E.**, Soltész, B., Penyige, A., Lukács, J., Póka, R., Nagy, B., Szilágyi, M.: Comparative Analysis of Cell-Free miR-205-5p, let-7f-5p, and miR-483-5p Expression in Ovarian Cell Cultures and Plasma Samples of Patients with Ovarian Cancer.
Appl. Sci.-Basel. 11 (4), 1-10, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/app11041735>
IF: 2.838
4. Márton, É., **Beke-Varga, A. E.**, Széles, L., Göczi, L., Penyige, A., Nagy, B., Szilágyi, M.: The Cell-Free Expression of MiR200 Family Members Correlates with Estrogen Sensitivity in Human Epithelial Ovarian Cells.
Int. J. Mol. Sci. 21 (24), 1-19, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21249725>
IF: 5.924

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 17,362

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

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

Debrecen, 2024.08.23.

