

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Márton Éva

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

DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2021

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

MiRNS-ek biomarkerként való alkalmazhatóságának vizsgálata a petefészekrák diagnosztikájában

Márton Éva

Témavezető: Prof. Dr. Nagy Bálint



DEBRECENI EGYETEM

Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	1
2. Bevezetés	2
3. Irodalmi áttekintés	4
3.1 Petefészekrák	4
3.1.1 A petefészekrák előfordulása és az azt befolyásoló kockázati tényezők.....	4
3.1.2 A petefészek tumorok típusai	6
3.1.3 A petefészekrák diagnosztikája	8
3.1.4 A petefészekrák terápiája	9
3.2 Az ösztrogének és a xenoösztrogének	10
3.2.1 Az ösztrogén szignalizáció	13
3.2.2 Ösztrogének, mint karcinogén és endokrin zavarokat okozó molekulák	15
3.3 MikroRNS-ek	17
3.3.1 A mikroRNS-ek biogenezise és általános jellemzése.....	17
3.3.2 A mikroRNS-ek tumorok kialakulásában betöltött szerepe	19
3.3.3 A miR-200, miR-34 család, a miR-203a, illetve a miR-205	21
3.4 MikroRNS-ek alkalmazása a klinikumban	24
3.4.1 MikroRNS-ek mint biomarkerek.....	24
3.4.2 MikroRNS-ek mint terápiás targetek.....	26
4. Célkitűzések	29
5. Anyagok és módszerek	30
5.1 A felhasznált vérminták jellemzése	30
5.2 Sejttenyészetek vizsgálata	31
5.2.1 Felhasznált sejtvonalak és fenntartásuk.....	31
5.2.2 A sejtenyészetek ösztrogénekkal való kezelése	32
5.2.3 Sejtproliferáció vizsgálata	32
5.2.4 Migráció vizsgálata	33
5.2.5 Apoptózis vizsgálat	33
5.2.6 Sejtlízis mértékének meghatározása.....	33

5.2.7 Ko-kultúra	34
5.3 Transzkripciós vizsgálatok – mRNS izolálás és expressziós analízis	34
5.3.1 Totál RNS izolálás sejttenyészetekből	34
5.3.2 Génexpresszió meghatározása qPCR segítségével.....	35
5.4 Transzkripciós vizsgálatok – miRNS izolálás és expressziós analízis	36
5.4.1 A szabad miRNS-ek izolálása vérplazmából.....	36
5.4.2 Intracelluláris és szabad miRNS izolálás sejttenyészetekből	37
5.4.3 MiRNS koncentráció meghatározása	37
5.4.4 Az érett miRNS-ek reverz transzkripciója.....	38
5.4.5 A cDNS koncentráció meghatározása	38
5.4.6 Érett miRNS-ek expressziójának meghatározása qPCR segítségével	38
5.5 A vizsgált miRNS-ek bioinformatikai elemzése	40
5.6 Az eredmények statisztikai elemzése	40
6. Eredmények	42
6.1 Szabad miRNS szintek összehasonlítása petefészekrákban szenvedő és egészséges egyének vérmintáiban	42
6.1.1 A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 relatív expressziójának vizsgálata.....	42
6.1.2 A vizsgált miRNS-ek diagnosztikai potenciáljának jellemzése	44
6.1.3 A vizsgált miRNS-ek közötti funkcionális kapcsolat vizsgálata.....	46
6.1.4 A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 bioinformatikai elemzése.....	50
6.2 A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 expressziójának vizsgálata humán epitéliális ovárium sejt kultúrákban	57
6.2.1 A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 expressziója a PEO1 és A2780 sejt vonalakban	57
6.2.2 Az E2, ZEA és a BPA fenotípusra gyakorolt hatásának vizsgálata	59
6.2.3 Génexpressziós vizsgálatok.....	66
6.2.4 A miR-200, miR-203a és miR-205 expressziójának változása ösztrogén kezelés hatására .	68
6.2.5 Az ER α szerepe a miR-200, miR-203a és miR-205 expressziójában	70
6.2.6 Szabad miRNS-ek környező sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata ko-kultúra segítségével	71
7. Diskusszió	72
7.1 Szabad miRNS szintek összehasonlítása petefészekrákban szenvedő és egészséges egyének vérmintáiban	72

7.2 A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 expressziójának vizsgálata humán epitéliális ovárium sejt kultúrákban	75
8. Összefoglalás	81
9. Summary	82
10. Értekezés új megállapításai	83
11. Irodalomjegyzék	84
11. Tárgyszavak	106
12. Key words	107
13. Köszönetnyilvánítás	108
14. Függelék	109
14.1 Kiegészítő táblázatok	109
14.2 Saját közlemények jegyzéke	115

1. Rövidítések jegyzéke

3'UTR:	3' nem kódoló régió (3' Untranslated Region)
AUC:	ROC görbe alatti terület (Area Under the ROC Curve)
BPA:	biszfenol A (bisphenol A)
CA125:	szénhidrát antigén 125 (Carbohydrate Antigen-125)
CCCP:	karbonil-cianid-m-klór-fenil-hidrazin
cDNS:	komplementer DNS (complementary DNA)
DCC-FBS:	dextran-coated charcoal-treated fetal bovine serum
DMSO:	dimetil-szulfoxid
E2:	17 β -ösztadiol (17 β -estradiol)
EMT:	epiteliális-mezenchimális átalakulás (epithelial-mesenchymal transition)
ER:	ösztrogén receptor (Estrogen receptor)
ERE:	ösztrogén válasz elemek (Estrogen Response Elements)
ER α/β :	ösztrogén receptor α/β (Estrogen Receptor α/β)
FBS:	magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)
FIGO:	International Federation of Gynecology and Obstetrics
GO-BP:	Gene Ontology Biological Processes
HE4:	humán epididymis-protein 4
KEGG:	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
miRNS:	mikroRNS (microRNA)
MPP:	methyl-piperidino-pyrazole
mRNS:	hírvivő RNS (messenger RNA)
NPV:	negatív prediktív érték (negative predictive value)
PBS:	foszfát puffer (Phosphate Buffered Saline)
PPV:	pozitív prediktív érték (positive predictive value)
Pre-miRNA:	prekursor mikroRNS (precursor microRNA)
PRF-RPMI:	fenol-red mentes RPMI (phenol-red free RPMI)
pri-miRNS:	primer mikroRNS (precursor microRNA)
RISC:	RNS-indukálta csendesítő komplex (RNA-induced silencing complex)
ROC:	receiver operating characteristic curve
RT-PCR:	valós idejű polimeráz láncreakció (real time- polymerase chain reaction)
ZEA:	zearalenon

2. Bevezetés

A tumoros megbetegedések súlyos egészségügyi problémát képviselnek világszerte. 2020-ban megközelítőleg 19,3 millió új esetet és csaknem 10 millió daganatos megbetegedéshez köthető halálesetet regisztráltak világszerte. Ez a szám alatta marad a korábbi években tapasztaltaknak, amelyért elsősorban a világban dúló koronavírus járvány miatt visszaszorult szűrővizsgálatok tehetőek felelőssé (Richards és mtsai, 2020; Sung és mtsai, 2021). Ezen okból a felismert daganatos megbetegedések számának jelentős emelkedése várható az elkövetkező években. Továbbá a várható életkor folyamatos emelkedésének velejárója a daganatos megbetegedések egyre gyakoribb előfordulása. Egyes becslések alapján a rákos megbetegedések száma 2040-re globálisan elérheti a 28,4 millió új esetet évente, ami 47%-os emelkedést jelent 2020-hoz viszonyítva (Sung és mtsai, 2021). Érdeemes azonban megemlíteni, hogy a legtöbb daganat típus hatékonyan kezelhető, ha a betegség diagnózisa a korai stádiumokban történik, ezért kiemelt jelentőségű a szűrővizsgálatok infrastruktúrájának kiépítése mellett a hatékonyabb diagnosztikát lehetővé tevő módszerek fejlesztése (Santucci és mtsai, 2020; Sung és mtsai, 2021).

Jelenleg a legszélesebb körben elfogadott diagnosztikai módszer a szövettani vizsgálat, mely elvégzéséhez biopsziával vagy műtéti kimetszéssel nyernek mintát az érintett szövetből. Ezen eljárás azonban meglehetősen invazív, így kockázatot jelent a beteg számára, ezen felül költséges, időigényes, továbbá nem alkalmazható a betegség nyomon követésére sem (Larrea és mtsai, 2016; Nimmagadda és mtsai, 2020; Szilagyi és mtsai, 2020). A folyadékbiopszia egy új, rohamosan fejlődő diagnosztikai eljárás, amely ígéretes alternatíva lehet az invazív diagnosztikai technikák mellett. E módszer a testfolyadékokban jelenlévő biomarkerek (olyan molekulák, melyek testfolyadékokban, illetve szövetekben való előfordulása egy adott kór állapot fennállását tételezi fel) monitorozásán alapul. A folyadékbiopszia alkalmazásának számos előnye van az invazív diagnosztikai módszerekkel szemben: 1) a mintavételi eljárás egyszerű, olcsó, könnyen kivitelezhető; 2) ismételtősége miatt alkalmas a kezeléseket nyomon követésére, ezáltal lehetővé teszi az esetlegesen kialakuló rezisztencia, vagy a betegség újbóli előfordulásának gyors diagnózisát; 3) a tumor egészéről szolgáltat információt, így nem befolyásolja a daganatok esetén gyakran jellemző heterogenitást, amely a szöveti biopsziák megbízhatóságának legfőbb korlátja (Montagnana és mtsai, 2017; Otandault és mtsai, 2019; Szilagyi és mtsai, 2020). A folyadékbiopszia során a biomarkerek lehetnek például fehérjék, cirkuláló tumor sejtek, de ún. szabad nukleinsavak is.

Ezen utóbbiak csoportjába tartoznak a tumorokból származó DNS fragmentek (genomi, vagy mitokondriális), illetve nem-kódoló RNS molekulák. A szabad nukleinsavak vizsgálata nemcsak a betegség előrehaladottságának, valamint a tumor lokalizációjának a megállapításában segíthet, de információt szolgáltat a tumorsejtek fiziológiájáról, kemoterápiás szerekre mutatott érzékenységről, valamint a betegség várható prognózisáról is. Ezáltal a szabad nukleinsavakon alapuló diagnosztikai módszerek nagyban hozzájárulhatnak a személyre szabott orvoslás megvalósulásához (Larrea és mtsai, 2016; Szilagyi és mtsai, 2020). Az alkalmas biomarker jelöltek azonosítása, azonban nagy kihívás. Munkánk során célul tűztük ki olyan miRNS-alapú biomarker jelöltek azonosítását, amelyek segíthetik a petefészekrák jelenleginél hatékonyabb diagnosztikáját.

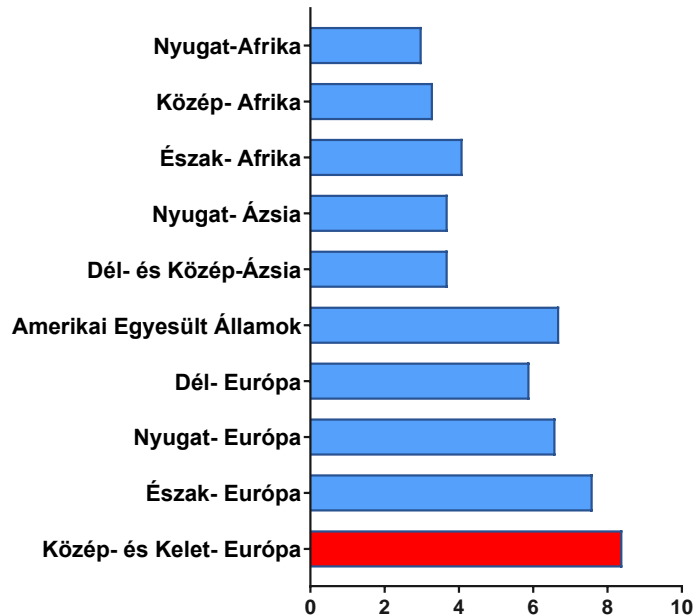
3. Irodalmi áttekintés

3.1 Petefészekrák

3.1.1 A petefészekrák előfordulása és az azt befolyásoló kockázati tényezők

A nők körében a petefészekrákot tekintik a 8. leggyakoribb rákos megbetegedésre visszavezethető haláloknak, és a nőgyógyászati daganatok legsúlyosabb formája (Sung és mtsai, 2021). 2018-ban világszerte az újonnan diagnosztizált tumoros megbetegedések 3,4%-áért, valamint az abból fakadó halálesetek 4,4%-áért volt felelős (Bray és mtsai, 2018; Lheureux és mtsai, 2019). A petefészekrákos megbetegedések eloszlását és halálozási arányát tekintve, az eltérő földrajzi térségek között jelentős különbségek figyelhetők meg (1. ábra). Az ázsiai és afrikai régiókra lényegesen alacsonyabb előfordulás jellemző, mint a fejlett országokat magukba foglaló térségekre (1. ábra). Bár az ázsiai régióban alacsonyabb a betegség viszonylagos előfordulása, azonban a nagy populáció okából fakadóan megközelítőleg minden ötödik beteget itt diagnosztizálnak a világon (Chen és mtsai, 2016; Reid és mtsai, 2017). A legmagasabb halálozási statisztikákat mutató térségek közé sorolhatóak például Észak-Európa (7,6/100.000) vagy az Egyesült Államok (6,7/100.000) (Ferlay és mtsai, 2018; Torre és mtsai, 2018), azonban a Közép- és Kelet-Európai térség (8,4/100.000) rendelkezik a legrosszabb statisztikákkal (1. ábra) (Ferlay és mtsai, 2018). Ez egyrészt a kevésbé egészségtudatos életmódból fakadó kockázatok nagyobb mértékével magyarázható, de érdemes további okként megjelölni, hogy a legújabb diagnosztikai és terápiás módszerek bevezetése – ami a mortalitás nagymértékű csökkenéséhez vezetett az észak-európai országokban – szintén elmaradottabb ebben a térségben (Malvezzi és mtsai, 2016). Fontos továbbá megjegyezni, hogy a meglehetősen rossz túlélési statisztikák ellenére kevés tanulmány érhető el a térségben.

A petefészekrák fejlődő és fejlett térségekben való látványosan eltérő előfordulási aránya elsősorban azzal van összefüggésben, hogy az alacsony szülésszámot, ezáltal az ovuláció nélküli periódus csökkenését jelentős kockázati tényezőként tartják számon. Becslések alapján minden gyermekszülés megközelítőleg 16-22%-kal csökkenti az ovárium karcinóma kialakulásának kockázatát (Holschneider és Berek, 2000).



1. ábra: A petefészekrák különböző térségekben mutatott halálozási aránya 100.000 női lakosra vonatkoztatva (Weiderpass és Tyczynski, 2015; Torre és mtsai, 2018; Ferlay és mtsai, 2018).

Szintén az ovuláció szünetelésének preventív hatásával hozható összefüggésbe, hogy a hosszabb idejű szoptatási periódus és a hormon alapú fogamzásgátló tabletták szedése szintén csökkenti a petefészekrák kialakulásának kockázatát – ezen gyógyszerek 4, 8 és 12 évig tartó alkalmazása 40, 53 illetve 60%-kal csökkentik a petefészek tumorok kialakulásának a kockázatát (Holschneider és Berek, 2000). Ennek molekuláris okára ad magyarázatot az ún. „folytonos ovuláció” hipotézis, mely szerint az ovulációk során a tüszőrepedés következtében megsérült epitélium helyreállítása sejtosztódást igénylő folyamatok segítségével megy végbe. Ráadásul az esetlegesen előforduló DNS károsodás repair rendszerek működését igényli. Amennyiben ezen folyamatok zavart szenvednek, az a károsodott epitéliális sejtek túléléséhez és/vagy korlátlan osztódásához, ezáltal pedig tumor kialakulásához vezethet (Murdoch és mtsai, 2001; 2002). Ebből következően az ovuláció minden egyes ciklusával egyre több mutációval rendelkező sejt halmozódhat fel a petefészekben, ezzel növelve a daganatképződés kockázatát (Ho, 2003; Mungenast és Thalhammer 2014; Reid és mtsai, 2017). A korai pubertás, vagy késői menopauza miatt megnyúló ovulációs szakasz szintén megnöveli a betegség kialakulásának a kockázatát. Az ovulációs hipotézis mellett manapság egyre inkább elfogadottabb az ún. „retrográd menstruáció” hipotézis, amely a menstruáció nem megfelelő mechanizmusát teszi felelőssé a petefészek tumorok kialakulásáért. A retrográd menstruáció

során a menstruációs vér a szervezetből történő távozása helyett visszafelé áramlik a petevezetéseken keresztül. Így a vérrel kapcsolatba kerülő sejtek (a petevezeték fimbriái) ki vannak téve az eritrociták hemolízise következtében szabaddá váló vas kiváltotta oxidatív stressz genotoxikus hatásának (Vercellini és mtsai, 2011; Mungenast és Thalhammer, 2014).

A pozitív családi anamnézis szintén magas rizikófaktort képvisel a betegség kialakulásában, mivel a családi halmozódást mutató génmutációk megléte esetén akár 10 évvel hamarabb is kialakulhat a petefészekrák (Holschneider és Berek, 2000). Több mutációt is összefüggésbe hoztak a petefészekrák kialakulásával, többek között a DNS javító mechanizmusokban részt vevő *BRIP1*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BRCA1* és *BRCA2* génekét (Shih és Kurman, 2004; Ramus és mtsai, 2015; Song és mtsai, 2015). A petefészekdaganatok megjelenését leggyakrabban a *TP53*, *BRCA1* és a *BRCA2* génekben bekövetkezett mutációkkal hozzák összefüggésbe (Shih és Kurman, 2004). A *TP53* gént érintő mutációk az előrehaladott petefészekrákos esetek 50-80%-ban figyelhetőek meg, de a korai stádiumokban is kimutathatóak az esetek 37%-ában (Shih és Kurman, 2004). Érdeemes továbbá megemlíteni, hogy a betegség kialakulásának a kockázata a *BRCA1* mutációt hordozók esetében akár a 44%-ot, míg a *BRCA2* mutációval rendelkezők esetében a 27%-ot is elérheti (Reid és mtsai, 2017). A petefészekdaganatokban kialakult mutációk azonosítása kiemelt fontosságú, mivel hozzájárulhat a megfelelő terápia kiválasztásához (Jonsson és mtsai, 2019; lásd még 3.1.4 fejezet).

További kockázati tényezőnek számít az előrehaladott életkor, a magas BMI érték, a dohányzás, a mozgásszegény életmód, a túlzott alkoholfogyasztás, valamint a különböző jóindulatú elváltozások megléte (pl. endometriózis, PCOS- Policisztás ovárium szindróma) (Reid és mtsai, 2017, Yarmolinsky és mtsai, 2019). Az ösztrogén alapú hormonkezelések proliferatív hatásukon keresztül szintén növelik a petefészekrák kialakulásának kockázatát (Armitage és mtsai, 2003; Ho, 2003; Reid és mtsai, 2017; lásd még a 3.1.4 fejezet).

3.1.2 A petefészekdaganatok típusai

A petefészekrák egy klinikailag változatos, morfológiailag és molekulárisan heterogén betegségnek tekinthető. A petefészekdaganatos elváltozásai szövettanilag a kiindulási sejtípus alapján 3 fő kategóriába sorolhatóak, melyek az epiteliális, a csírasejtes és a sztrómasejtes daganatok (1. táblázat) (Chen és mtsai, 2003; Rojas és mtsai, 2016). Az összes malignus petefészekdaganat több mint 90% -a epiteliális eredetű, mely típusnak a 68-70%-át

szerozus eredetű tumorok alkotják. Ezen daganatok molekuláris jellemzőik alapján két különálló csoportra bonthatóak tovább (Walker és mtsai, 2015; Rojas és mtsai, 2016). Az I. típusba az alacsony malignitású szerozus daganatok tartoznak, melyek az epiteliális petefészekrákos megbetegedések kevesebb, mint 5% -át teszik ki és általában jó prognózissal rendelkeznek. Az erre a típusra jellemző genetikai mutációk közé tartoznak a *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*, *PIK3CA*, *CTNNB1* és az *ARID1A* gének mutációi (Kurman és mtsai, 2016; Rojas és mtsai, 2016). A II. típusba a magas malignitású szerozus daganatok tartoznak, melyek az összes epiteliális malignus elváltozás 70-80%-át adják. Ezen daganatok rendkívül agresszívok, magas proliferációs képességgel rendelkeznek és az esetek 90%-ban halálos kimenetelűek. Erre a típusra a *TP53* gén mutációja a legjellemzőbb (Rojas és mtsai, 2016; Kurman és mtsai, 2016; Stewart és mtsai, 2019).

1. táblázat: Az ovárium tumorok szövettanilag meghatározható csoportosítása (Chen és mtsai, 2003; Rojas és mtsai, 2016).

	Epiteliális daganatok	Csírasejtes daganatok	Ovariális sztrómasejtes daganatok	Egyéb, illetve kevert típusú daganatok
Összes malignus tumoron belüli gyakoriság	60%	25%	8%	7%
Malignus petefészek tumorokon belüli arányuk	90%	3%-7%	7%	
Érintett korcsoport	20+ év	minden életkor	minden életkor	minden életkor
Altípusok	szerozus tumor mucinózus tumor endometroid tumor világos sejtes tumor Brenner-tumor vegyes szövettanú	teratoma dysgerminoma endodermális sinus tumor choriocarcinoma	fibroma granulosa-theca sejtes tumor, Sertoli-Leydig sejtes tumor	vegyes szövettanú

A csírasejtes daganatok a primer csírasejtekből fejlődnek ki, és megközelítőleg az összes daganatos eset 25%-át, míg a rosszindulatú petefészek daganatok 3–7% -át teszik ki. A gyermek és serdülőkorú fiataloknál kialakuló daganatok több mint 50%-a csírasejt eredetű, melyek megközelítőleg 1/3-a rosszindulatú. Ezzel szemben a felnőttekben viszonylag ritkán

jellemző ez a daganat típus és általában jóindulatú. Hisztopatológiai szempontból 5 alcsoportba sorolhatók tovább (1. táblázat) (Chen és mtsai, 2003; Stewart és mtsai, 2019). Az ovariális- sztrómasejtes daganatok megközelítőleg a 8%-át teszik ki az összes petefészek daganatoknak és mintegy 7%-át a rosszindulatú petefészek elváltozásoknak. Abból adódóan, hogy ezen tumorerő olyan sejtekből képződnek, melyek egyébként részt vesznek a petefészek szteroid hormontermelésében, gyakran magas ösztrogén szintet, ezáltal pedig ehhez társuló tünetegyüttest eredményeznek (korai pubertást gyerekeknél, vérzési zavarokat, vagy az endometrium kóros megvastagodását). Ezen daganattípus szintén további altípusokra bontható (1. táblázat) (Chen és mtsai, 2003; Horta és Cunha, 2015; Stewart és mtsai, 2019).

3.1.3 A petefészekrák diagnosztikája

A petefészekrák esetén tapasztalható magas halálozási arányért elsősorban a betegség kései diagnosztizálása tehető felelőssé, amelyet a nem specifikus, későn jelentkező tünetek nehezítenek (pl.: puffadás, alhasi fájdalom). Így megközelítőleg az esetek 50%-át előrehaladott állapotban diagnosztizálják, amikor a korai stádiumokkal (93%) ellentétben az 5 éves túlélés esélye rendkívül alacsony (29%) (Siegel és mtsai, 2018; Nimmagadda és mtsai, 2020). A jelenleg alkalmazott rutin diagnosztikai eljárások közé tartozik a medence tapintásos vizsgálata mellett a transzvaginális ultrahang. Ezen technikák azonban azon túl, hogy költséges UH készüléket igényelnek, már csak a nagy, feltehetően előrehaladott állapotban lévő daganatok felismerésére alkalmasak (Nimmagadda és mtsai, 2020). A diagnosztizált daganat malignitásának meghatározását, illetve FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) stádiumokba történő besorolását a szövettani vizsgálat eredménye teszi lehetővé (Larrea és mtsai, 2016; Nimmagadda és mtsai, 2020).

Rendelkezésre áll továbbá néhány biomarker, amelyek segítenek a jó és rosszindulatú petefészek tumorerő elkülönítésében, ezek a CA125 (Carbohydrate Antigen-125), más néven MUC16 (Mucin-16), illetve a HE4 (Human Epididymis Protein 4). A CA125, amely egy, az ovárium tumor sejtek membránjának felszínén megtalálható mucin típusú-O-glikoprotein, a petefészekrákban leggyakrabban alkalmazott szérumbiomarker (Montagnana és mtsai, 2017; Nimmagadda és mtsai, 2020). Szintjének vizsgálata segítséget nyújt a betegség korai felismerésében, a terápiára adott válasz monitorozásában, továbbá a megbetegedés esetleges kiújulásának gyors észlelésében, azonban számos korlát jellemzi. (Jelovac és mtsai, 2011; Nimmagadda és mtsai, 2020). Ismert, hogy a CA125 felszabadulása eltérő a különböző hisztotípusokban, ebből adódóan a tumorerő akár 20%-ának esetén, nem alkalmazható ezen

marker. Ezen felül nem kellően specifikus a petefészekrákra, mivel más rosszindulatú megbetegedés esetén is emelkedett szintet mutat (pl.: méhnyak, emlő-, vastagbél-, hasnyálmirigy- és gyomorrák esetén). Érdemes továbbá kiemelni, hogy számos, nem rosszindulatú kórállapot (pl.: endometriózis, vagy a medence más gyulladásoos betegségei) fennállása során is fals diagnózishoz vezethet (Kappelmayer és mtsai, 2015; Montagnana és mtsai, 2017). Mindezek alapján a CA125 az ideálisnál alacsonyabb szenzitivitással (50-62% a korai szakaszban) és specificitással (73-77%) rendelkezik (Sölétormos és mtsai, 2016; Montagnana és mtsai, 2017).

A HE4 egy 13kDa méretű fehérje, amelyet a *WFDC2* gén kódol és magas expresszió jellemzi az epiteliális petefészekrákban szenvedő betegek esetében (Zhu és mtsai, 2016). A CA125 markerhez viszonyítva nagyobb szenzitivitást (72-80%) és specificitást (90-96%) mutat a betegség korai diagnózisában (Zhu és mtsai, 2016; Montagnana és mtsai, 2017). Szintjének monitorozása alkalmas lehet továbbá a kemoterápiás szerekre mutatott érzékenység meghatározásában is (Angioli és mtsai, 2014). Ezen marker sem kellően specifikus azonban a petefészekrákra, szintje más tumortípusok esetén is megemelkedik, mint például az endometrium, a petevezeték, és a tüdő rosszindulatú elváltozásai során. Ezen markerre is jellemző továbbá, hogy néhány, nem rosszindulatú kórállapot (például veseelégtelenség) vagy menstruáció, illetve egyes hormonkezelések fennállása esetén is fals diagnózist eredményez (Montagnana és mtsai, 2017).

3.1.4 A petefészekrák terápiaja

A petefészekrák mellett, hogy az egyik legnehezebben diagnosztizálható, és ezáltal az egyik legrosszabb prognózissal járó nőgyógyászati daganat típus, heterogenitása miatt kezelése komplex terápiát és radikális sebészeti beavatkozást igényel. A petefészekrák diagnosztizálását követően a jelenlegi kezelési protokoll alapján a citoreduktív műtéti eljárás javasolt, melynek során eltávolítják a tumoros szöveteket (ez legtöbbször mindkét petefészek és a méh eltávolítását is magában foglalja), majd ezt követően a betegeket intravénás platina (pl.: Cisplatin, Carboplatin) és taxán (pl.: Taxol, Taxotere) alapú kemoterápiás kezelésben részesítik. Előrehaladott stádiumok esetén a tumorméret csökkentése okán a műtétet megelőzően indukciós (neoadjuváns) kemoterápiában is részesül az érintett személy (Rojas és mtsai, 2016; Cortez és mtsai, 2018). Érdemes megemlíteni, hogy egyes klinikai vizsgálatok alapján az antiösztrogének (pl. Tamoxifen) és aromatáz-gátlók (pl. Letrozol) hatékonyak lehetnek önmagukban vagy más kemoterápiás szerekkel kombinálva a kiújuló petefészekrák

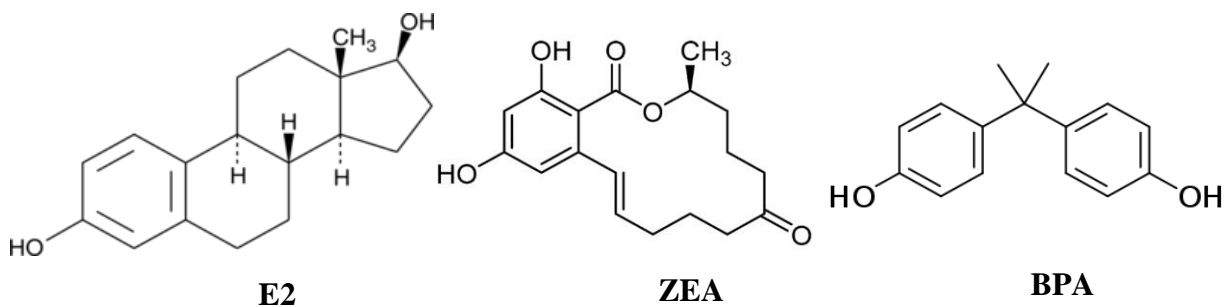
kezelésében. A tamoxifen egy szelektív ösztrogén antagonist, amely meggátolja az ösztrogén kötődését az ösztrogén receptorhoz (ER), ezáltal meggátolva annak rákos sejtek növekedését elősegítő hatását. A letrozol pedig egy aromatáz inhibitor, amely az androgének ösztrogénekké történő átalakulásáért felelős aromatáz gátlásával vagy inaktíválásával csökkenti a plazma ösztrogénszintjét a menopauzán átesett nők esetén. Fontos kiemelni, hogy bár a petefészek daganatok többségére jellemző az ösztrogén érzékenység, ezen terápiás módszerek alkalmazása mégsem elterjedt a klinikai gyakorlatban (Ho, 2003; George és mtsai, 2017).

A daganat sejtekre jellemző mutációk azonosítása lehetővé teszi továbbá azok célzott terápiáját (Meric-Bernstam és mtsai, 2012). A *BRCA1* és *BRCA2* mutációk jelenléte esetén az ún. poli-ADP-ribóz polimeráz (PARP)-gátlók (pl.: Oliparib, Veliparib, Niraparib, Rucaparib) alkalmazása elősegítheti a sejtburjánzás visszaszorítását azáltal, hogy ezen molekulák a DNS törések felhalmozódásához vezethetnek, amely a *BRCA* mutációk következtében eleve sérült repair rendszerrel rendelkező sejtek halálát idézi elő. A PARP-gátlók, platina alapú kemoterápiás szerekkel (amelyek szintén DNS károsodásokat idéznek elő) való kombinálása tovább növeli azok hatékonyságát (Coleman és mtsai, 2015; Liu és Matulonis, 2016; Rojas és mtsai, 2016). Számos kutatás folyik továbbá a *TP53* mutációkat célzó terápiák kidolgozását illetően, ilyen például az AZD1775, amely a Wee1, G2 ellenőrző pontban közreműködő kináz inhibitora, vagy a Hsp90 inhibitor, amely a mutálódott p53 fehérjével komplexet képezve megakadályozza annak degradációját, ezáltal a sejtben való felhalmozódásához vezet. Alkalmazásuk ígéretesnek bizonyult a klinikai vizsgálatok során (Rojas és mtsai, 2016).

3.2 Az ösztrogének és a xenoösztrogének

Az ösztrogének fiziológiai szempontból fontos szteroidhormonok, melyek kulcsszerepet játszanak a női reproduktív ciklus szabályozásában (Hewitt és Korach 2018). Az ösztrogének csoportjába sorolhatóak az ösztron (E1), a 17β -ösztradiol (E2) (2. ábra), az ösztriol (E3) és az ösztrolin (E4), mely molekulák közül az E2 rendelkezik a legerősebb fiziológiai hatással. Ezen molekula kritikus jelentőséggel rendelkezik többek között az endometrium megvastagodásának elősegítésében, ezáltal a terhesség kialakulásának lehetővé tételében, valamint az emlőmirigy fejlődésében (Mungenast és Thalhammer 2014; Fuentes, 2019). A menopauzát megelőzően a nőkben a petefészkekben található granulóza sejtek az E2 szintézisének elsődleges forrásai. Az ösztrogén bioszintézisében kulcsfontosságú a citokróm

P450-aromatáz enzim (P450AROM), amely az E2-t reproduktív korú nőknél koleszterolból, posztmenopauzában lévő nők vagy férfiak esetén pedig C₁₉ prekursorokból (tesztoszteron, androsztendion) szintetizálja. Az aromatáz megtalálható számos extragonadális sejtben is (pl.: zsírszövet mezenchimális sejtjei, az oszteoblasztok, a kondrociták, az erek endotélium sejtjei, valamint az idegsejtek), amelyek így szintén képesek E2 előállítására. Ezen sejtek tekinthetőek az E2 fő forrásának a menopauzán átesett nők esetében (Nilsson és Gustafsson, 2011; Vrtačnik és mtsai, 2014). A menopauza után azonban jelentősen csökken a szérumban lévő E2 szintje, ami megközelítőleg 0,04 nM, míg a menopauzát megelőzően a ciklus adott szakaszától függően 0,11-2,20 nM között változik (Vrtačnik és mtsai, 2014).



2. ábra: Az E2 (17β –ösztadiol), a ZEA (zearalenon) és a BPA (bisphenol A) molekulák szerkezete (Baker és mtsai, 2009; Jalal és mtsai, 2018; Cavaliere és mtsai, 2019).

Ismert, hogy az E2 fontos szerepet tölt be számos extragonadális sejt normál működésében, ezáltal hozzájárulva a csonthomeosztázis, a lipid- és szénhidrát-anyagcsere, az elektrolit-egyensúly és a bőr normál fiziológiájának a fenntartásához, továbbá a kardiovaszkuláris és a központi idegrendszer megfelelő működéséhez (Vrtačnik és mtsai, 2014; Hewitt és Korach 2018). Ebből adódóan a menopauzát követő ösztrogén szint csökkenés következtében számos időskorral összefüggésbe hozható betegség alakulhat ki, mint az oszteoporózis, a miokardiális infarktus, agyvérzés, demencia és egyes esetekben az Alzheimer-kór. Ezen ún. időskori megbetegedések megelőzése céljából széles körben alkalmazzák az ösztrogén alapú hormonpótló terápiát a posztmenopauzában lévő nők esetében (Ho, 2003; Armitage és mtsai, 2003; Greiser és mtsai, 2007). A xenoösztrogének, olyan szteroid molekulák, amelyek a fiziológiás ösztrogénekhez hasonló hatással rendelkeznek (Paterni és mtsai, 2017).

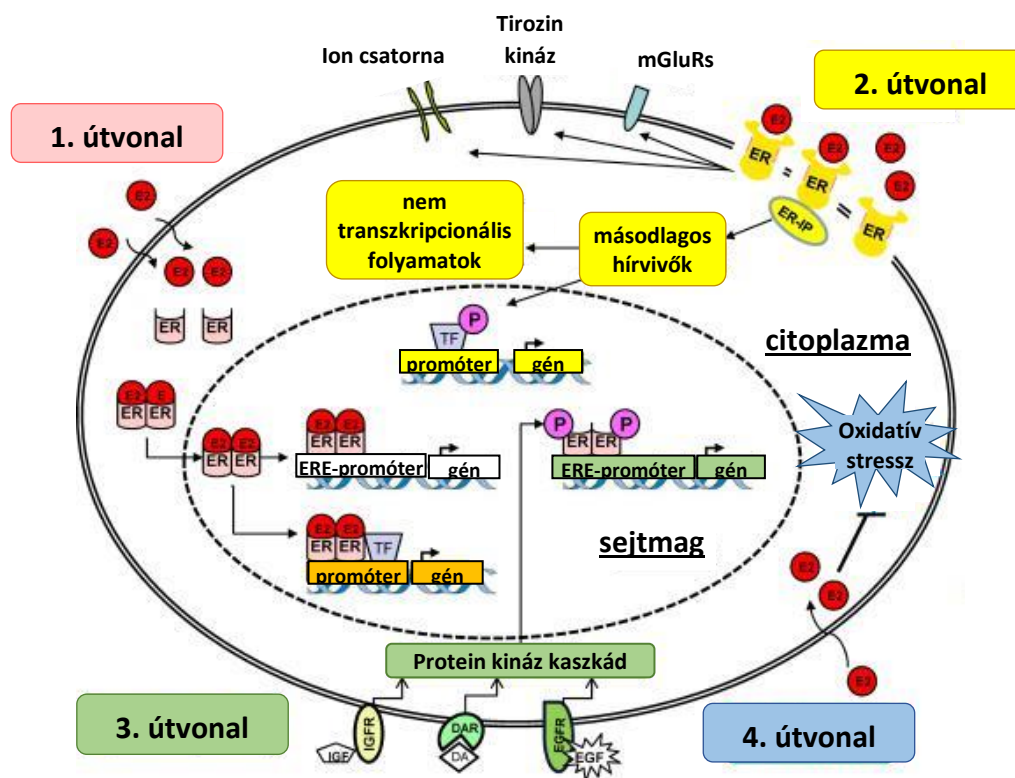
A xenoösztrogének lehetnek természetes formában előforduló, növények által termelt fitoösztrogének (pl. genistein), gombák által termelt mikoösztrogének (pl. Zearalenon; ZEA), vagy szintetikus eredetűek (pl. BPA) (Paterni és mtsai, 2017). A legismertebb mikoösztrogén a ZEA (2. ábra), mely molekula az ún. mikotoxinok csoportjába sorolható. A mikotoxinok fonalas gombák által előállított szekunder metabolitok, amelyek képesek hatást gyakorolni a magasabb rendű élőlények fiziológiájára (Alshannaq és Yu, 2017; Paterni és mtsai, 2017). A ZEA a *Fusarium* fajok (pl.: *F. graminearum*, *F. culmorum*) által előállított rezorcikus lakton (Paterni és mtsai, 2017). Ezen gombák szántóföldi és raktári kártevőknek tekinthetők, amelyek képesek a gabonanövényeken (pl.: árpa, kukorica, rizs, búza) növekedni. Ezáltal nemcsak hatalmas termékvesztést okoznak a mezőgazdaságban, hanem az általuk előállított metabolitok (beleértve a mikotoxinokat is) kontaminálják a takarmányt, valamint a gabonából készült feldolgozott élelmiszereket. Ezáltal súlyos kockázatot jelentenek nemcsak az állatok, hanem az emberek számára is (Zinedine és mtsai, 2007; Paterni és mtsai, 2017). A ZEA szervezetbe kerülését követően felszívódik a gyomor-bél traktuson keresztül, majd metabolizmusát követően akkumulálódhat a különböző szervekben. Haszonállatokkal végzett kutatások alapján a ZEA kimutatható mennyiségben jelen van többek között a májban, a vesében, a zsírszövetekben, a reproduktív szervek szöveteiben és a vérszérumban is (Rai és mtsai, 2019). Érdekes azonban megemlíteni, hogy a ZEA-t kimutatták már emberi endometrium tumorokból is (Gadzała-Kopciuch és mtsai, 2011; Kowalska és mtsai, 2016; Pajewska és mtsai, 2018). Egészségügyi kockázata miatt a ZEA kontaminációt folyamatosan monitorozzák a gabona eredetű élelmiszerekben, alapanyagokban és takarmányokban. A WHO élelmiszer-adalékanyagokkal foglalkozó szakértői bizottsága (JECFA- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) a napi tolerálható beviteli mennyiségét (PMTDI- provisional maximum tolerable daily intake) 0,2 és 0,5 µg/testsúly kg-ban határozták meg (Zinedine és mtsai, 2007; Metzler és mtsai, 2010).

A mesterséges xenoösztrogének csoportjába tartozik a BPA (2. ábra). Ezen 2,2-Bisz(4-hidroxifenil)propán molekulát széles körben alkalmazzák adalékanyagként a műanyagok előállításánál, ezért a műanyag termékek széles választékában megtalálható, beleértve az újra hasznosítható palackokat, polikarbonát tartalmú tárolóedényeket, az orvosi és sportfelszereléseket, az epoxigyantákat, az élelmiszer- és italdobozok bélését, a fogászati tömítőanyagokat, továbbá tartalmazhatják a különböző festékek, és az élelmiszeriparban alkalmazott hőpapírok is. Ebből adódóan az egyik legnagyobb mennyiségben előállított vegyi anyagnak tekinthető világszerte (több mint $2,7 \times 10^9$ kg/év). A BPA azonban képes

kiszivárogni a műanyag termékekből, ezáltal kontaminálhatja az abban tárolt italokat/élelmiszereket, továbbá az óriási mennyiségű műanyag hulladékból kiszivárogha a talajvizet. Ezáltal az emberek nagymértékben ki vannak téve a BPA egészségkárosító hatásának (Rochester, 2013; Gao és mtsai, 2015). A probléma súlyosságát jelzi, hogy a BPA kimutatható mennyiségben van jelen az emberi szérumban és vizeletben, de kimutatták már a magzatvízben, az anyatejben, a köldökzsinórvérben és a méhlepényben is (Rochester, 2013; Gao és mtsai, 2015). Az Egyesült Államokban a felnőtt lakosság körében a vizeletben mért koncentrációja 1,28 mg/L, míg a szérumban 0,2–1,6 ng/ml körül mozgott. Az Európai Unió napi 5 mg/kg-ban határozta meg azt a koncentrációt, aminek még feltehetőleg nincs megfigyelt káros hatása (NOAEL- no-observed adverse-effect level) (Gao és mtsai, 2015).

3.2.1 Az ösztrogén szignalizáció

Az ösztrogének fiziológiai hatásukat ER függő, és független útvonalakon keresztül egyaránt kifejthetik (3. ábra) (Cui és mtsai, 2013; Vrtačnik és mtsai, 2014; Hewitt és Korach, 2018). Az ER-függő útvonalon belül megkülönböztetünk ún. genomikus és nem genomikus mechanizmusokat, attól függően, hogy bekövetkeznek-e génexpresszióban megmutatkozó változások. A genomikus útvonalban közreműködő ER-oknak két típusát különböztethetjük meg, az ER α -t és az ER β -t, melyek sejttípus-függő kifejeződést mutatnak (Vrtačnik és mtsai, 2014; Hewitt és Korach 2018). Mindkét típus megtalálható a petefészek, az emlő, a prosztata, a herék, a csontváz, a szív- és érrendszer, valamint az agy szöveteinek sejtjeiben. Ezen felül az ER α kifejeződik a méh, a mellékhere, a máj, a vese és a fehér zsírszövet sejtjeiben, ezzel szemben az ER β a vastagbél, a nyálmirigy, az érrendszeri endotélium, a tüdő, és a húgyhólyag sejtjeiben mutat expressziót (Nilsson és Gustafsson, 2011). Ezen receptorok kifejeződése az ösztrogének széleskörű fiziológiai hatásának az alapja. Ezt támasztja alá, hogy például endotél sejtek esetén megfigyelték, hogy a posztmenopauzában levő nőknél nemcsak az ösztrogéntermelés, de az ER α expressziója is visszaesik (~33%-kal) (Gavin és mtsai, 2009; Nilsson és Gustafsson, 2011). Az ER aktivációjának alapja, hogy az ösztrogének, lipidoldékony természetük révén képesek átdiffundálni a sejtmembránon, ezáltal pedig a citoplazmában helyet foglaló ER-okhoz kötődni (1. útvonal). Ennek következtében az ER-ok szerkezete konformációs változáson megy keresztül, a receptor dimerizálódik, majd a sejtmagba transzlokálódik. Ezt követően képesek azon célgének átírásának az indukciójára, amelyek regulációs régiójában megtalálhatóak az ún. ösztrogén válasz elemek (ERE- Estrogen Response Element) (3. ábra) (Vrtačnik és mtsai, 2014; Hewitt és Korach 2018).



3. ábra: Az E2 hatásmechanizmusában szerepet játszó útvonalak csoportosítása. **1. útvonal:** az E2 ER-hoz való kapcsolódásán keresztül meginduló transzkripcionális változások. **2. útvonal:** az E2 membránhoz kötött ER-hoz való kötődésén keresztül elinduló, ion csatornákat, másodlagos hírvivők képződését, egyéb membrán receptorok vagy transzkripció faktorok működését szabályozó mechanizmusok. **3. útvonal:** ER-ok ligand független aktiválódása következtében elinduló transzkripcionális változások. **4. útvonal:** az E2, ER-független módon megvalósuló antioxidáns hatása (Cui és mtsai, 2013).

Kimutatták azt is, hogy az E2 képes olyan gének átírását is indukálni, amelyek regulációs régiójában nem található meg az ERE mintázat, mely gének az ösztrogén induktív gének 1/3-át teszik ki. Ezen gének átírása fehérje-fehérje kölcsönhatások révén, transzkripció faktorok közreműködésével valósul meg (3. ábra) (Bjornstrom és Sjoberg, 2005; Vrtačnik és mtsai, 2014).

Az ún. nem genomikus válasz az ösztrogének sejtfelszíni receptorokhoz való kötődésén (pl. G-proteinnel asszociált receptorok GPER1- G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1) keresztül valósul meg (2. útvonal). Ezen útvonal gyorsabb válasz elindítására alkalmas, és kritikus szerepet tölt be az ideg- és vázrendszer mellett egyéb szervek (pl. máj) működésében is (Cui és mtsai 2013). Hatásuk egyéb membrán receptorokkal (pl. glutamát

receptor – mGluR) való együttműködésük, vagy jelátviteli útvonalak közreműködésével valósul meg (3. ábra). Utóbbi, protein-kináz kaszkádok négy fő csoportba sorolhatóak: 1) a foszfolipáz C (PLC)/protein kináz C (PKC) útvonal; 2) a Ras/Raf/MAPK kaszkád; 3) a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K)/Akt-kináz kaszkád; 4) cAMP/protein kináz A (PKA) jelátviteli útvonalak. Érdeemes azonban megemlíteni, hogy ezen protein kináz útvonalak közvetve - transzkripciós faktorok foszforilációján keresztül – ugyancsak hatást gyakorolhatnak a sejtből zajló génexpresszióra (3. ábra) (Vrtačnik és mtsai, 2014; Fuentes és mtsai, 2019). Érdeemes továbbá megjegyezni, hogy az ER-ok agonisták hiányában is képesek aktiválódni (3. útvonal). Ez az ún. ligand-független ER aktiváció növekedési faktorok (pl. epidermális vagy inzulinszerű növekedési faktorok), vagy neurotranszmitterek (pl. dopamin) által aktivált protein kináz útvonalak közreműködésével bekövetkező ER foszforiláció következménye (3. ábra) (Vrtačnik és mtsai, 2014; Fuentes és mtsai, 2019). Az E2 képes továbbá az oxidatív stressz mértékének csökkentésére, melyet ER-független módon vizsgál (4. útvonal) (3. ábra) (Cui és mtsai, 2013). Ezen felül az ösztrogén válasz számos epigenetikai mechanizmust is magában foglal, mely hiszton módosításokon, DNS metilálási mintázat kialakításán és kromatin átrendeződésen keresztül valósulhat meg (Vrtačnik és mtsai, 2014). Az ösztrogén válasz közvetítésében ezen felül a miRNS-ek által közvetített poszt-transzkripcionális mechanizmusok is szerepet játszanak. Ezt az alábbi megfigyelések bizonyítják: 1) számos miRNS expressziója mutat indukciót, vagy repressziót ösztrogén kezelés hatására; 2) az ER α feltehetően szerepet tölt be a miRNS érésében közreműködő enzimek (pl.: a Drosha, Dicer) transzkripcionális indukciójában; 3) az ER α feltehetőleg közvetlenül indukálhatja a miRNS kódoló régiók transzkripcióját; 4) az ER α expressziójára több miRNS is hatást gyakorolhat (Klinge, 2015; Cohen és mtsai, 2016).

3.2.2 Ösztrogének, mint karcinogén és endokrin zavarokat okozó molekulák

Régóta ismert tény, hogy az ösztrogén alapú hormonterápiában részesülő nők körében nagyobb gyakorisággal fordulnak elő nőgyógyászati ráktípusok, mint például a petefészekrák (Mungenast és Thalhammer 2014). Az ösztrogén kezelések 5 évnél hosszabb ideig tartó alkalmazása már szignifikánsan megemeli a daganatképződés esélyét, mely kockázat még 10 évvel az alkalmazás befejezését követően is érzékelhető (Hildebrand és mtsai, 2010; Reid és mtsai, 2017). Ráadásul a meddőségi kezelések során alkalmazott szerek (pl.: a klomifen-citrát, melyet a petefészek hiperstimulációjának indukálására alkalmaznak) szintén súlyos kockázati tényezőt jelentenek a nőgyógyászati daganatos elváltozások kialakulására, mely

részben az ösztrogénszintre gyakorolt hatásukkal magyarázható (Tomao és mtsai, 2014). Ezek alapján az ösztrogénekre kiemelkedő fiziológiai jelentőségük ellenére karcinogén molekulákként kell tekinteni. Ezen hatásuk, egyrészt a rájuk érzékeny sejtekre gyakorolt proliferatív hatásukkal hozható összefüggésbe, de bizonyos koncentráció fölött reaktív oxigén gyök (ROS- reactive oxygen species) generáló képességük által DNS-károsodást, ezen keresztül pedig mutációk kialakulását indukálhatják (Ho, 2003; Yager és Davidson 2006; Mungenast és Thalhammer 2014). Az ösztrogének petefészekrák kialakulásában betöltött jelentőségét bizonyítja továbbá, hogy a rosszindulatú petefészek tumorok esetében gyakran megemelkedik az ER α expressziója (Mungenast és Thalhammer, 2014).

A xenoösztrogének szintén képesek ösztrogén válasz kiváltására. Ennek fő oka, hogy a ZEA és a BPA alacsonyabb affinitással ugyan, de képes az ER α és ER β mellett a GPER1 receptorokhoz is kötődni, ezáltal a fiziológiás ösztrogénhez hasonló hatást kiváltani (Viñas és mtsai, 2012; Rochester, 2013; Paterni és mtsai, 2017; Jalal és mtsai, 2018). Így, e molekulák endogén ösztrogénnel való interferáló képességük révén endokrin zavarokat okozhatnak emberben és haszonállatokban egyaránt. A nagymértékű ZEA kontamináció az állattenyésztés ágazatában nagy károkért tehető felelőssé, mivel a haszonállatoknál (pl.: sertés, szarvasmarha, juh) reproduktív rendellenességek kialakulásához vezet. Ide sorolható az ún. hiperösztrogén szindróma, ami álterhességet, meddőséget, illetve laktációs zavart foglal magában, továbbá halvaszületést is okozhat (Malekinejad és mtsai, 2005; Metzler és mtsai, 2010). A xenoösztrogénnel nagymértékben kontaminált élelmiszerek fogyasztása emberek esetében növeli az elhízás és cukorbetegség kialakulásának kockázatát, de a reproduktív rendszer működésének a zavarát is kiválthatják. Az utóbbi hatásra különösen érzékenyek a prepubertás időszakában lévő gyermekek, akik esetében az alacsony endogén nemi hormon szintek miatt az akár kis mennyiségben kívülről érkező hormon hatású molekulák is a hormonális egyensúly felborulásához vezethetnek, ezáltal például korai pubertás alakul ki. Érdeemes továbbá megemlíteni, hogy állatkísérletek alapján a xenoösztrogéneknek magzati korban való kitettség növeli az idegrendszeri és anyagcsere-rendellenességek kialakulásának kockázatát (Zinedine és mtsai, 2007; Leonardi és mtsai, 2017; Paterni és mtsai, 2017; La Merrill és mtsai, 2020).

A xenoösztrogéneknek való kitettség befolyást gyakorol a rákos megbetegedések kialakulásának valószínűségére is. Ezt bizonyítja, hogy a BPA számos olyan gén expressziójára gyakorol hatást petefészek, mell és prosztatata sejtvonalakban, amelyek szorosan

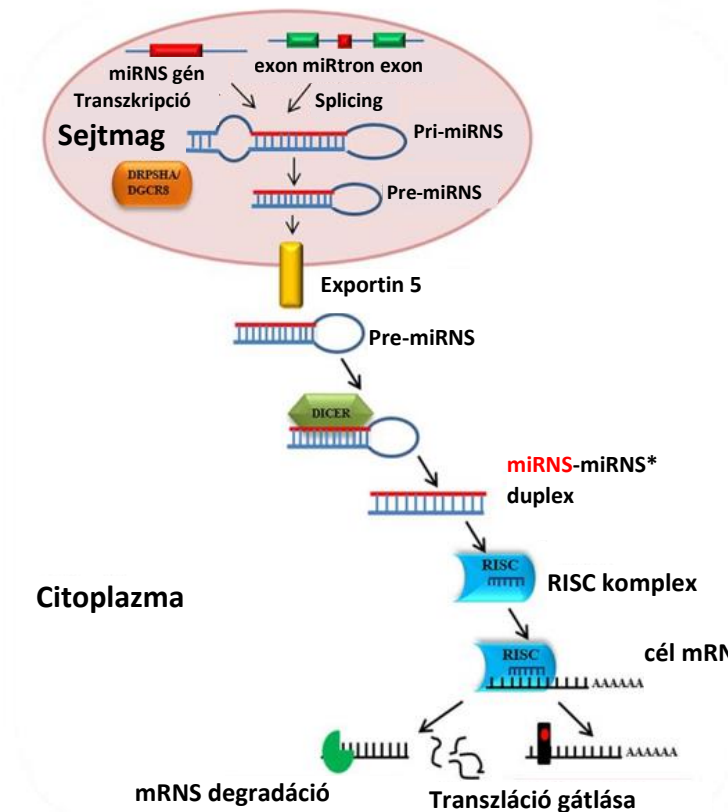
kapcsolódnak a rák progressziójához (La Merrill és mtsai, 2020). A ZEA szintén karcinogén hatásának bizonyult egér kísérletek alkalmával, valamint toxikusnak egyes sejttényészetek esetében (Rai és mtsai, 2019). Ennek ellenére a ZEA-t a Nemzetközi Rákkutatási Ügynökség az emberre gyakorolt karcinogenitása szempontjából továbbra is a 3. csoportba sorolja (azaz nem karcinogén) (Ostry és mtsai, 2017), ami főleg ezen molekula hatásáról rendelkezésre álló információ hiányával magyarázható. Érdeemes továbbá megemlíteni, hogy a ZEA kimutatható mennyiségben jelen lehet emberi endometriális daganatokban, ami arra enged következtetni, hogy e molekula hajlamos felhalmozódni a reproduktív szervekben és ezáltal hozzájárulhat a tumorsejtek proliferációjához (Pajewska és mtsai, 2018).

3.3 MikroRNS-ek

3.3.1 A mikroRNS-ek biogenezeise és általános jellemzése

A miRNS-ek kisméretű (19-25nt hosszúak), nem kódoló, egyszálú RNS-molekulák, melyek fontos szerepet töltenek be a gének poszt-transzkripcionális szabályozásában. 1993-as felfedezésük óta mostanáig több mint 2500 miRNS-t azonosítottak az emberi genomban, és feltételezések szerint az emberi gének ~60%-ának expressziójára gyakorolhatnak hatást (Di Leva és mtsai, 2014; Cui és Shu 2020). Előalakjaik a genomban előfordulhatnak önálló egységként kódolva, vagy klaszterekbe rendeződve (policisztronos) egyaránt, az intergénikus régiókban, a fehérjekódoló gének intronjaiban (intronikus), továbbá egyes esetekben az exonikus régiókban is (Hussain, 2012; Forterre és mtsai, 2020). A miRNS-ek egy többlépéses érési folyamaton mennek keresztül, melynek eredményeképp a kettős szálú prekursor alakból kialakul az ún. érett, egyszálú alak (4. ábra). A miRNS kódoló géneket főként az RNS polimeráz II, egyes esetekben a polimeráz III írja át. A miRNS-ek többsége intergénikus és saját promóterrel rendelkezik, így független egységekként kerülnek átírásra, míg az intronikus miRNS-ek általában gazdagénjeikkel együtt íródnak át. A miRNS klaszterek tagjai együtt kerülnek átírásra egy hosszú transzkriptumot eredményezve. A transzkripció eredményeképp egy hajtúszerű struktúra, a primer miRNS (pri-miRNS) keletkezik, melyen megtalálható a jellegzetes 5' sapka struktúra, a 3' poli-A farok, illetve intronokat is tartalmazhatnak (Hussain, 2012; Yates és mtsai, 2013; O'Brien és mtsai, 2018; Forterre és mtsai, 2020). A sejtmagban a pri-miRNS molekulából egy endonukleáz hasítás során létrejön egy ~70 nukleotid hosszúságú, hurkos szerkezetű prekursor miRNS (pre-miRNS), amely 3' végén egyszálú struktúrával rendelkezik (4. ábra). A reakciót az endonukleáz aktivitású Drosha enzimkomplex (mikroprocesszor komplex) hajtja végre, mely az enzim vágási helyének

kijelölésében közreműködő fehérjékkel alkot komplexet (pl. DGCR8- DiGeorge Syndrome Critical Region 8). A Drosha enzimkomplex érzékenységét, ezáltal a hasítás hatékonyságát, illetve helyét számos egyéb molekula befolyásolhatja (pl.: snRNP- small nuclear ribonucleoprotein, vagy HP1BP3 hiszton) (Creugny és mtsai, 2018). Érdeemes továbbá megemlíteni, hogy néhány pre-miRNS, az úgynevezett mirtronok, közvetlenül egy rövidebb intronikus régióból történnek kivágásra, így megkerülve a Drosha- közvetítette feldolgozást.



4. ábra: A miRNS-ek érése és működési mechanizmusa (Melone és mtsai, 2018).

A pre-miRNS-t az Exportin-5 (Exp5) szállítja ki a sejtmagból a citoplazmába melyet követően a pre-miRNS egy második, a Dicer enzim által közvetített érési folyamaton megy keresztül. Ekkor a Dicer enzimmel való hasítás következtében a terminális hurok eltávolításával egy kb. 22 nukleotid hosszúságú, kettősszálú miRNS duplex keletkezik (4. ábra). Bár a duplex mindkét szála képes funkcionális miRNS-ként működni, csak az egyik, az ún. vezető szál épül be az RNS-indukálta csendesítő komplexbe (RISC- RNA-induced silencing complex) az Argonuta 2 (AGO2) fehérjéhez kötődve. A másik, az ún. utasszál lebomlik. A vezető szálat a miRNS szál irányultsága határozza meg. Az ún. 5p-szál a pre-miRNS hajtú 5'-végéből, míg az ún. 3p-szál a 3'-végéből származik. Az 5p vagy a 3p szál

kijelölése részben a miRNS duplex 5' végén elhelyezkedő 5' U termodinamikai stabilitásán alapul (Yates és mtsai, 2013; Chakraborty és Das, 2016; O'Brien és mtsai, 2018).

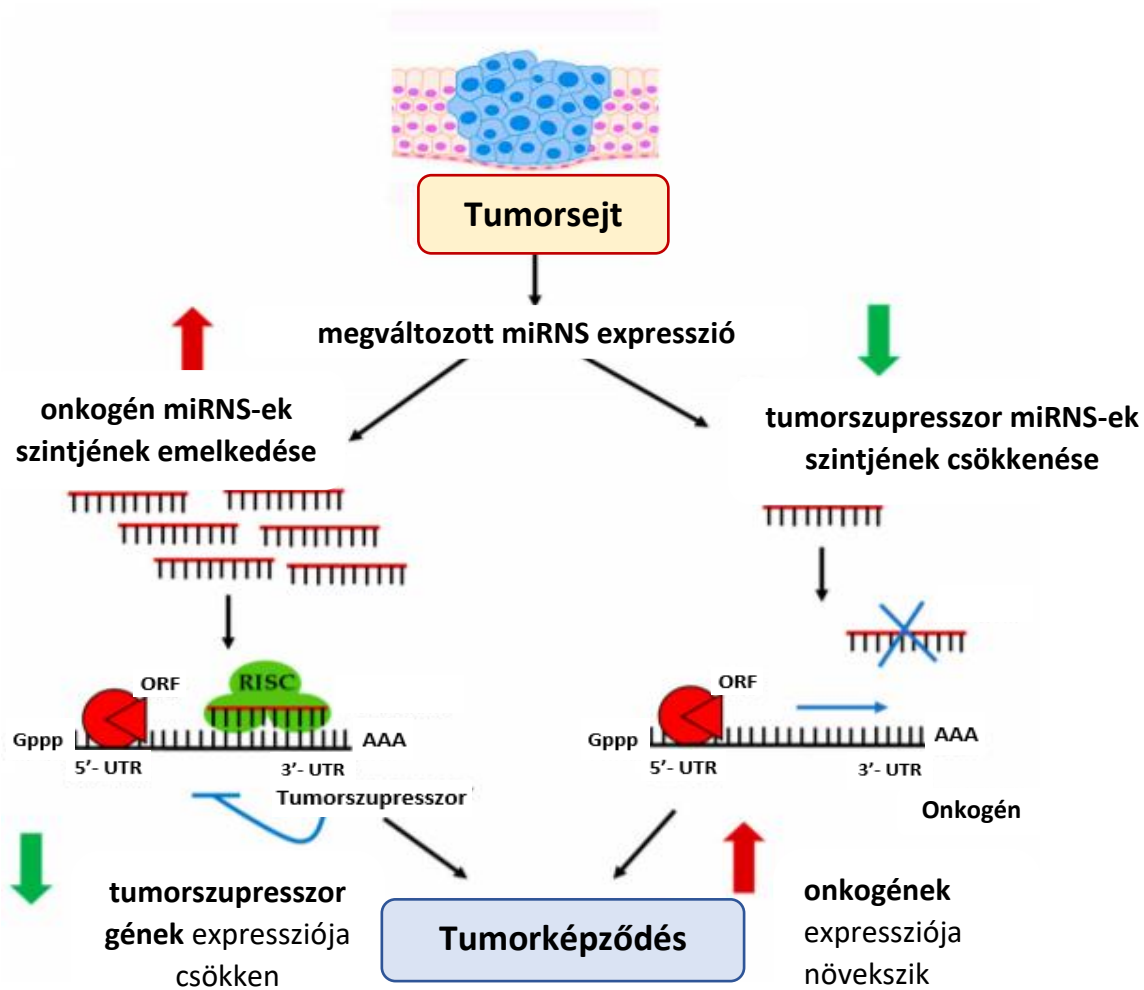
A RISC komplexbe beépült érett miRNS-ek hatásukat a cél mRNS-ek 3'UTR (Untranslated Region) régiójához való, komplementaritás szabályain alapuló kötődésükön keresztül fejtik ki. Ha a komplementaritás nagyfokú, az a cél mRNS degradációjának kedvez. Ezzel szemben az alacsonyabb fokú komplementaritás a transláció gátlásához vezet. Mindkét folyamat a cél mRNS-ről történő fehérje expressziót szünteti meg. A komplementer – legalább 7 nukleotidot érintő - bázispárosodás szempontjából a miRNS-ek ún. seed szekvenciájának van nagy jelentősége (Lim és mtsai, 2005; Yates és mtsai, 2013; Loh és mtsai, 2019). Annak következtében, hogy a miRNS-ek nem igényelnek tökéletes komplementaritást cél mRNS molekulájukra gyakorolt hatásuk kifejtéséhez, egy mRNS molekula számos miRNS-nek lehet cél mRNS molekulája, illetve egy miRNS is rendelkezhet több különböző cél mRNS molekulával. Ezáltal egy rendkívül komplex szabályozási hálózat alakul ki, ami lehetővé teszi a génexpresszió poszt-transzkripcionális finomhangolását. A rendszert bonyolítja továbbá, hogy számos nem-kódoló RNS, mint például a hosszú nem kódoló RNS-ek (lncRNS), vagy a cirkuláris RNS-ek (circRNS) fő funkciója a rendelkezésre álló miRNS-ek szintjének szabályozása, melynek alapja, hogy több miRNS cél hellyel is rendelkeznek, ezáltal a miRNS-eket megkötvén azok cél mRNS-ükhöz való kapcsolódását akadályozzák meg. Ezáltal egy komplex, nem-kódoló RNS-eken alapuló szabályozási hálózat alakul ki a sejten belül (Ulitsky, 2018; Ramón és mtsai, 2019; Szilágyi és mtsai, 2020).

3.3.2 A mikroRNS-ek tumorok kialakulásában betöltött szerepe

A miRNS-ek számos biológiai folyamat szabályozásában vesznek részt, úgymint a sejtproliferáció, differenciálódás, migráció, apoptózis, sejtciklus, valamint a különböző stresszválaszok (Di Leva és mtsai, 2014). Központi jelentőségüket jelzi, hogy a szintézisükben bekövetkező mennyiségi vagy minőségi változások a sejtek diszfunkciójához vezethetnek. A miRNS-ek normál expressziója megváltozhat kromoszóma átrendeződések, kópiaszám eltérések, epigenetikai módosulások (pl.: hisztonmódosulás, hipo, ill. hipermetiláció), illetve a miRNS bioszintetikus útvonalak meghibásodása következtében, de a normál miRNS-mRNS kapcsolat létrejöttét is gátolhatják egyes, a cél mRNS 3'UTR régiójában bekövetkezett mutációk (Di Leva és mtsai, 2014). Számos betegség esetén figyelhető meg a normálistól eltérő miRNS mintázat, többek között gyulladással, szív és érrendszeri betegségek, illetve idegrendszeri és anyagcsere-rendellenességek fennállása alatt

(Jiang és mtsai, 2009; Kabekkodu és mtsai, 2018). A miRNS-ek az utóbbi időben a rákkutatás középpontjába kerültek, mivel rákos megbetegedések esetén jellemző a miRNS mintázat nagymértékű megváltozása. A miRNS-ek szerepét számos ráktípus esetén bizonyították, köztük az emlő-, vastagbél-, gyomor-, tüdő-, prosztatata- és pajzsmirigy tumorokban. A miRNS-ek eltérő expresszióját petefészekrákban (miR-200 és let7f család tagjai, miR-93, miR-21, miR-187, miR-221, miR-410, miR-16, miR-205) is megerősítették (Zaman és mtsai, 2012; Kinose és mtsai, 2014; Bracken és mtsai, 2015; Reddy, 2015). Becslések szerint a miRNS kódoló gének több mint 50%-a a tumorok keletkezésével összefüggésbe hozható genomi régiókban vagy mutációkra érzékeny helyeken található, mely arra utal, hogy a miRNS-ek fontosabb szerepet játszhatnak a rákos megbetegedések patogenezisében, mint azt korábban gondolták (Zhang és mtsai, 2007).

Tumorok képződésében betöltött funkciójukat tekintve a miRNS-ek lehetnek onkogének (onkomiR-ek), vagy tumor szupresszorok (5. ábra) (Zaman és mtsai, 2012; Di Leva és mtsai, 2014; Larrea és mtsai, 2016; Loh és mtsai, 2019). Az onkomiR-ek emelkedett expressziót mutatnak a daganatos elváltozások esetén, és a tumorok fejlődését azáltal segítik elő, hogy gátolják a tumorszupresszor hatású fehérjék képződését. Hatásukat több különböző módon is kifejezhetik: 1) érzéketlenné tehetik a sejtet a növekedésgátlókkal szemben (pl. miR-17-92 klaszter miRNS-ei), 2) elősegíthetik az apoptózis kikerülését (pl. miR-21), 3) megnövelhetik a korlátlan replikációra való képességüket (pl. miR-372/373), 4) támogathatják az angiogenezist (pl. miR-210), 5) növelhetik az inváziós képességet, ezáltal pedig támogatják a metasztázis képzést (pl. miR-10b) (Zhang és mtsai, 2007; Di Leva és mtsai, 2014). A tumorszupresszor funkcióval rendelkező miRNS-ek szintje ezzel szemben lecsökken a rákos sejtekben. Ezen miRNS-ek azáltal akadályozzák a daganatok képződését, hogy gátolják az onkogén fehérjék expresszióját és/vagy elősegítik az apoptózist. Számos miRNS rendelkezik tumor szupresszor funkcióval, pl.: a let7-család tagjai, a miR-200 család tagjai, a miR-15a, vagy a miR-16-1 (Zhang és mtsai, 2007, Di Leva és mtsai, 2014; Loh és mtsai, 2019). Legtöbbször nehéz azonban az egyes miRNS-ek onkomiR-ként, vagy tumor szupresszorként való be kategorizálása. Ez egyrészt azzal magyarázható, hogy egy miRNS számos cél mRNS rendelkezik, amelyek funkciója eltérő lehet. A helyzetet tovább bonyolítja, hogy az egyes miRNS-ek szerepe sejttípusonként, ezáltal pedig tumortípusonként is eltérő lehet. Például a miR-125b onkomiR-ként funkcionál a hematológiai rosszindulatú daganatokban, de solid tumorok esetén sok esetben tumorszupresszor hatásának bizonyult (Svoronos és mtsai, 2016).

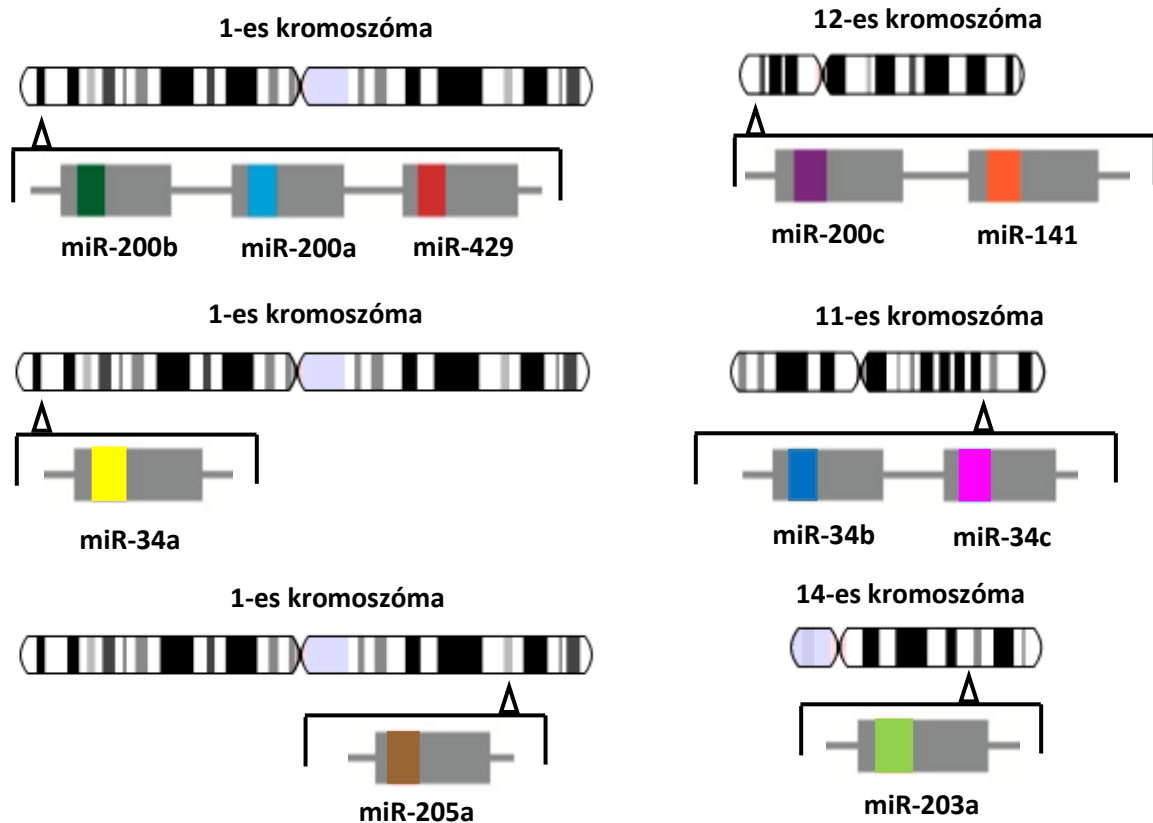


5. ábra: Onkogén és tumorszuppresszor funkciójú miRNS-ek hatásmechanizmusa (Loh és mtsai; 2019).

3.3.3 A miR-200, miR-34 család, a miR-203a, illetve a miR-205

A miR-200 család öt tagból áll, melyek a miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 és miR-429. Ezek közül a miR-200a, miR-200b és miR-429, illetve a miR-200c és a miR-141 miRNS egy előalak formájában íródik át. Előbbiek az 1-es (1p36.33), míg utóbbiak a 12-es (12p13.31) kromoszómákon kódoltak (6. ábra) (Bracken és mtsai, 2015; Humphries és Yang, 2015; Muralidhar és Barbolina, 2015). A miR-34 család három miRNS-t (miR-34a, miR-34b és miR-34c) tartalmaz, amelyek két különböző kromoszómán lokalizálódnak. A miR-34a az 1-es kromoszómán (1p36) található és önálló egységként, míg a miR-34b és a miR-34c a 11-es kromoszómán (11q23) helyezkednek el és egy közös transzkripciós egységből íródnak át (6. ábra) (Wong és mtsai, 2011; Li és mtsai, 2014). A miR-203a a mirBase adatbázis alapján a

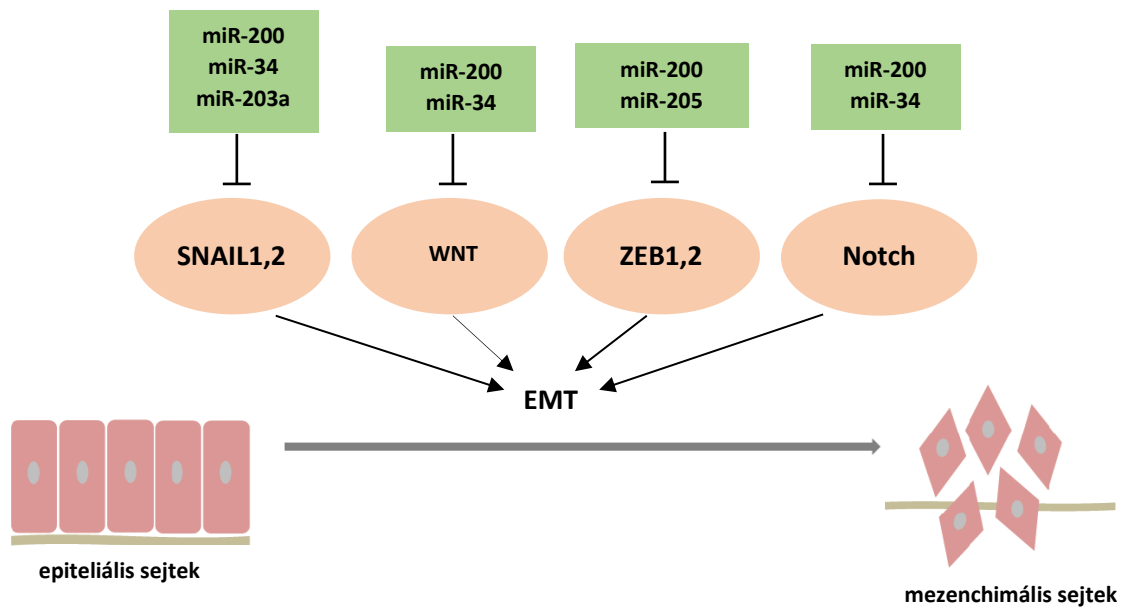
14-es kromoszómán, míg a miR-205 az 1-es kromoszómán (1q32.2) található (6. ábra) (Qin és mtsai, 2013; Xiao és mtsai, 2019). Megváltozott expressziójukat több tumortípus esetén kimutatták, többek között tüdő-, vastagbél-, máj-, emlő-, endometriális-, prosztata-, hólyag- és petefészekrák esetén (Boll és mtsai, 2013; Doll és mtsai, 2015; Humphries és Yang, 2015; Larrea és mtsai, 2016; Chen és mtsai, 2018; Zhang és mtsai, 2019; Chauhan és mtsai, 2020).



6. ábra: A miR-200 és miR-34 családba tartozó miRNS-ek, valamint a miR-203a és miR-205 molekulák előalakjait kódoló gének/génklaszterek lokalizációja (Li és mtsai, 2014; Muralidhar és Barbolina, 2015; Xiao és mtsai, 2019).

Ezen miRNS családok közös tulajdonsága, hogy feltehetőleg tumor szupresszor funkcióval rendelkeznek és hatásukat többek között az ún. epiteliális-mezenchimális átalakulás (EMT) (7. ábra) szabályozásán keresztül fejtik ki. Az EMT fontos szerepet tölt be az embrionális fejlődés mellett a sebgyógyulás folyamatában, illetve az ovulációt követően a petefészek epitélium helyreállításában (Koutsaki és mtsai, 2014; Bracken és mtsai, 2015). Malignus állapot fennállása esetén az EMT támogatja a metasztázis képzés folyamatát. Ekkor az epiteliális tulajdonsággal rendelkező sejtek elveszítik affinitásukat a sejt-sejt közötti adhéziós kapcsolatok iránt, ezáltal mezenchimális tulajdonságokra tesznek szert. Ezen sejtek a

keringésbe kerülve, annak segítségével képesek akár a szervezet távoli pontjaira is eljutni, ahol visszanyerve epiteliális jellegüket újra letapadnak (ekkor MET játszódik le) (Koutsaki és mtsai, 2014; Bracken és mtsai, 2015; Yeung és Yang, 2017). Ezen folyamat különösen nagy jelentőségű epiteliális típusú daganatok, többek között az epiteliális petefészekrák esetében, mely nagyban hozzájárul ezen daganattípus erős metasztázis képző tulajdonságának kialakításához, ezáltal pedig a túlélési esélyek romlásához (Takai és mtsai, 2014; Loret és mtsai, 2019).



7. ábra: A miR-200 és miR-34 család tagjainak, valamint a miR-203a és miR-205 miRNS-ek szerepe az EMT szabályozásában (Bracken és mtsai, 2015; Sekhon és mtsai, 2016 alapján).

Molekuláris mechanizmusát tekintve az EMT szabályozásában több transzkripciós faktor (pl.: SNAIL 1,2; ZEB 1,2; WNT; NOTCH), illetve miRNS (pl.: miR-200- és miR-34-család tagjai, illetve miR-203a és miR-205) is részt vesz (7. ábra) (Koutsaki és mtsai, 2014; Zheng és Kang, 2014; Bracken és mtsai, 2015; Vosgha és mtsai, 2018). Ezek egy része az E-kadherin (CDH1) expressziójára gyakorol hatást, amely egy sejtfelszíni glikoprotein, és kiemelkedő szerepe van a sejt-sejt közötti kapcsolatok kialakításában (Zheng és Kang, 2014; Yeung és Yang, 2017). Ezen gén expressziójának a gátlása elősegíti az EMT folyamatát, ezáltal pedig az epiteliális eredetű tumorok invázióját (Zheng és Kang, 2014; Yeung és Yang, 2017).

A tumor progressziója során az E-kadherin kifejeződésének gátlásában központi szerepet töltenek be a SNAIL 1,2, illetve a ZEB 1,2 transzkripciós faktorok, melyek közvetlenül kötődnek annak promóter régiójához. Ezen represszorok indukálása pedig többek között a TGF- β (tumour-growth factor) -hoz, illetve a TNF- α (tumour necrosis factor) -hoz köthető (Koutsaki és mtsai, 2014; Bracken és mtsai, 2015; Loret és mtsai, 2019).

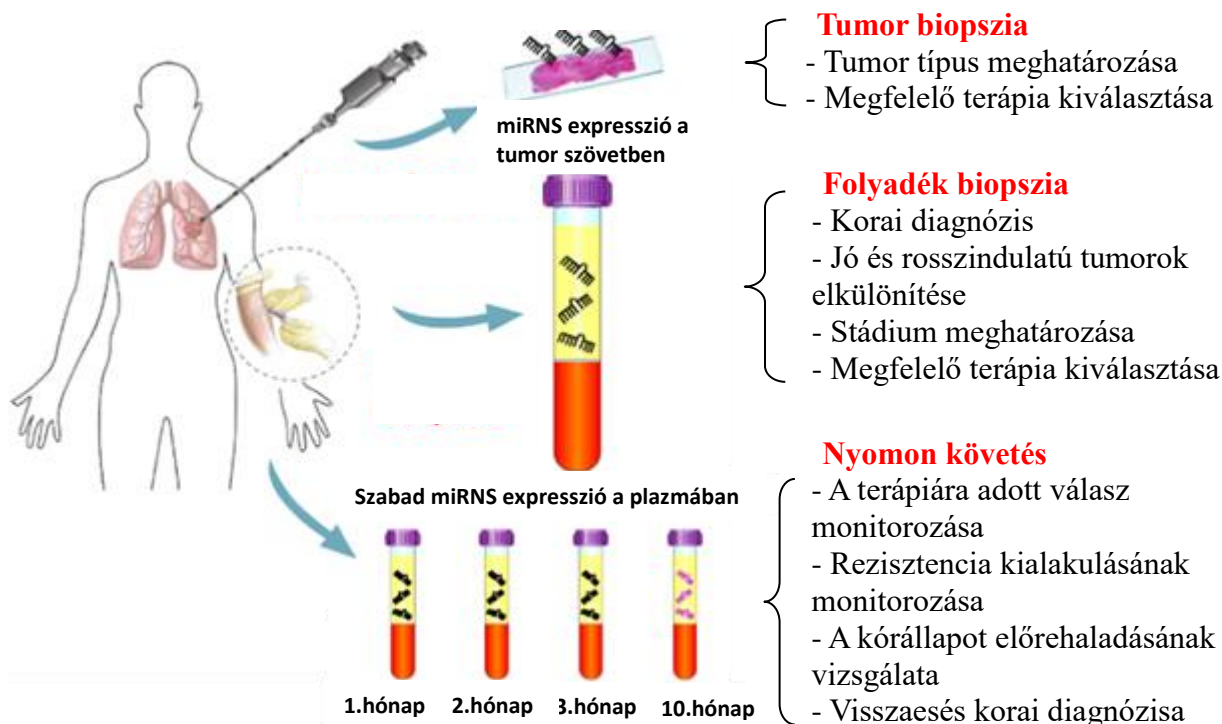
A miR-200 család tagjainak tumor szupresszor funkciója azzal magyarázható, hogy elősegítik az E-kadherin expresszióját és az epitéliális tulajdonságok fennmaradását azáltal, hogy poszt-transzkripcionálisan gátolják a ZEB1, ZEB2 és TGF- β kifejeződését. Ezáltal ezen miRNS család tagjainak magas szintje hozzájárul az EMT folyamatának gátlásához (Koutsaki és mtsai, 2014; Bracken és mtsai, 2015). Érdeemes továbbá megjegyezni, hogy egyes miRNS-ek gátló hatása fokozódik azon tulajdonságuknál fogva, hogy ugyanazon jelátviteli útvonal több komponensét is képesek megcélolni. De egy célmolekula gátlása is több miRNS egyidejű működésén keresztül valósul meg. Ezek alapján a miR-200, miR-34, miR-203a, illetve miR-205 központi jelentőségűnek tekinthetők az EMT folyamatának szabályozásában (7. ábra) (Bracken és mtsai, 2015; Yeung és Yang, 2017; Vosgha és mtsai, 2018).

3.4 MikroRNS-ek alkalmazása a klinikumban

3.4.1 MikroRNS-ek mint biomarkerek

Mivel tumoros megbetegedések esetén jellemző a miRNS mintázat megváltozása, ezért a miRNS-ek ígéretes biomarker jelölteknek tekinthetők (Calin és mtsai, 2002; Zaman és mtsai, 2012; Hayes és mtsai, 2014; Kinose és mtsai, 2014; Larrea és mtsai, 2016). A tumorszövetek miRNS profilozása segítheti a diagnózis felállítását, a tumor altípusának meghatározását, de információt szolgáltat a tumor kemoterápiás szerekre mutatott lehetséges érzékenységről/rezisztenciájáról is (8. ábra) (Lu és mtsai, 2005; Blenkiron és Miska, 2007; Zhang és mtsai, 2007). Ezen felül a miRNS-ek a folyadék biopsziában is alkalmazható biomarkerek lehetnek, mivel nemcsak a szövetekben, de testfolyadékokban is detektálhatóak (vér, vizelet, könny, anyatej, magzatvíz), ezek az ún. szabad miRNS-ek.

Ezen molekulák extracelluláris térben való megjelenése lehet szövetkárosodás következménye (a sejtek nekrozisa vagy apoptozisa révén), de jelentős részük transzportja aktív szekréció által történik, amely vezikulákba csomagoltan (exoszómák, mikrovezikulák), vagy RNS-kötő fehérjékhez kötötten (HDL, AGO2) is megvalósulhat (8. ábra) (Larrea és mtsai, 2016; Bayraktar és mtsai, 2017; Zhao és mtsai, 2019; Szilágyi és mtsai, 2020).



8. ábra: A miRNS-ek biomarkerként való alkalmazásának lehetőségei a tumoros megbetegedések diagnosztizálásában és a terápia nyomonkövetésében (Florczuk és mtsai, 2017).

Biológiai funkciójukat tekintve a szabad miRNS-ek kiemelkedő szerepet tölthetnek be a sejtek közötti kommunikáció megvalósulásában. Kimutatták ugyanis, hogy a szabad miRNS-ek képesek bejutni a környező sejtekbe, és hatást gyakorolni a bennük zajló génexpresszióra. Ezáltal szerepük lehet többek között az endometrium és az embrió közötti kommunikáció megvalósulásán keresztül az embrió beágyazódásának elősegítésében, de a placentán átjutva hatásuk lehet a magzati fejlődésre, ill. az anyatejen keresztül a csecsemők immunrendszerének fejlődésére is (Kosaka és mtsai, 2010; Zhao és mtsai, 2019). Emellett, kiemelkedő szerepük lehet a tumorok növekedéséhez kedvező mikrokörnyezet kialakításában is, az angiogenezis, az extracelluláris mátrix, vagy növekedési faktorok képződésének elősegítésén keresztül (Muralidharan-Chari és mtsai, 2010; Ingenito és mtsai, 2019; Kogure és mtsai, 2019). Blokkolhatják az ellenük irányuló immunválaszt is a T sejtek citotoxicitásának gátlásán, vagy immungátló citokinek képződésének elősegítésén keresztül (Muralidharan-Chari és mtsai, 2010; Ingenito és mtsai, 2019; Kogure és mtsai, 2019).

Mivel a szabad miRNS-ek testfolyadékokban mért szintje ugyancsak összefüggésbe hozható számos kórállapot, többek között a rák fennállásával, ezért ezek monitorozása új

utakat nyithat meg a rák diagnosztikájában (Hayes és mtsai, 2014; Larrea és mtsai, 2016; Wang és Chen, 2016; Condrat és mtsai, 2020). A szabad miRNS-ek számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek vonzó biomarker jelölté teszik őket. Nagymértékű sejt, illetve szövet specifikus expresszió jellemzi őket, ezáltal nagyban segíthetik a tumorok eredetének, illetve típusának meghatározását. Ezen felül információt szolgáltathatnak a betegség stádiumáról, várható kemoterápiás érzékenységről, vagy a beteg túlélési esélyeiről. A mintavétel ismételhősége miatt vizsgálatukkal lehetővé válik a betegség nyomon követése, ezáltal az esetleges rezisztencia kialakulásának, vagy a betegség újbóli előfordulásának gyors diagnózisa (8. ábra) (Hayes és mtsai, 2014; Larrea és mtsai, 2016; Si és mtsai, 2019). Biomarkerként való alkalmazásukat technikailag lehetővé teszi, hogy a miRNS-ek rendkívül ellenállóak a hőmérséklet (fagyasztás-olvasztás) és pH ingadozásokkal szemben, illetve az mRNS molekulákkal összehasonlítva kevésbé vannak kitéve az RNázok degradáló hatásának (Larrea és mtsai, 2016). Ez elsősorban kis méretükkel, illetve fehérjékkel való komplex képzésükkel, valamint vezikulumokban való előfordulásukkal magyarázható. Ezen felül számos molekuláris biológiai módszer teszi lehetővé a velük való munkát (pl.: qRT-PCR, miRNS mikroarray, vagy miRNS szekvenálás) (Chakraborty és Das, 2016). Érdemes megemlíteni, hogy a szabad miRNS-ek mellett, a szabad lncRNS (hosszú nem kódoló RNS), vagy szabad circRNS (cirkuláris RNS) expresszió detektálása tovább fokozhatja a szabad nukleinsavakon alapuló diagnosztikai tesztek hatékonyságát (Szilágyi és mtsai, 2020).

3.4.2 MikroRNS-ek mint terápiás targetek

Mivel a miRNS-ek központi jelentőséget töltenek be számos biológiai folyamat szabályozásában, ezért sejten belüli szintjük befolyásolása ígéretes terápiás stratégia lehet. Számos betegség esetén folynak vizsgálatok a miRNS-ek terápiás alkalmazását illetően, többek között érrendszeri (érelmeszesedés), vagy allergiás (aszthma), megbetegedések, illetve központi idegrendszer károsodás (pl.: stroke, traumás agysérülés) esetén (Caroli és mtsai, 2013; Lu és mtsai, 2018; Sun és mtsai, 2018; Ghafouri-Fard és mtsai, 2020). De ezen irányú kutatások jelentős része a miRNS-ek daganat ellenes terápiában való alkalmazásának lehetőségét célozza (Forterre és mtsai, 2020). Ez alapvetően két stratégiát foglal magában: a miRNS gátlást és a miRNS pótlást. A miRNS gátlás célja az onkogén miRNS-ek gátlása miRNS-antagonisták által, mely eredményeként azok tumor szupresszor hatású fehérjék képződésére gyakorolt gátló hatása megszüntethető. Az antagonisták alkalmazása nagyrészt a miRNS-ek hozzáférhetőségének csökkentésén alapul, mivel több miRNS cél helyel

rendelkeznek, így az onkogén miRNS-ek megkötése révén azok cél mRNS-ükhöz való kapcsolódása visszaszorítható. Az általánosan használt miRNS-gátlók közé tartoznak többek között az antimir-ek, a zárolt nukleinsavak (LNA- locked nucleic acid), a mesterséges peptid-nukleinsavak (PNA- peptide nucleic acid), valamint a miRNS-ek kis molekulájú inhibitorai (SMIR- small molecule inhibitors of miRNA). (Di Leva és mtsai, 2014; Rothschild, 2014; Christopher és mtsai, 2016; Forterre és mtsai, 2020). A legígéretesebb jelöltek a miR-122, miR-30, miR-16 miR-192 és miR-21 elleni antimir-ek (Dickins és mtsai, 2005; Esau és mtsai, 2006; Liu és mtsai, 2011; Han és mtsai, 2012; Di Leva és mtsai, 2014). A miRNS pótlás a tumor szupresszor miRNS-ek sejten belüli szintjének megemelésén alapul, ún. szintetikus miRNS mimik alkalmazásával, mely által azok onkogén fehérjék képződésére gyakorolt gátló hatása erősíthető fel (Di Leva és mtsai, 2014). Több ígéretes miRNS jelöltet is számontartanak, mint pl.: a let7, a miR-34a, a miR-143 és miR-145 miRNS mimikeket (Pramanik és mtsai, 2011; Christopher és mtsai, 2016). Egy másik irány a miRNS-ek terápiás alkalmazását illetően, hogy a miRNS szintek befolyásolása felerősítheti a daganat sejtek kemoterápiás szerekkel szemben mutatott érzékenységét, pl.: a miR-15 és miR-16 mimik alkalmazása érzékenyíti a sejteket a tamoxifennel szemben (Cittelly és mtsai, 2010; Zaman és mtsai, 2012). Érdeemes kiemelni, hogy az ovárium tumorok esetén is ismert néhány kísérleti stádiumban lévő miRNS, melyek alkalmasak lehetnek a jövőben terápiás célra. Például a miR-409, vagy miR-377 mimik adagolása, vagy a miR-552 blokkolása melyek képesek jelentősen gátolni a tumoros sejtek proliferációt, illetve metasztázis kialakító képességét (Gharpure és mtsai, 2018; Tang és mtsai, 2019; Zhao és mtsai, 2019).

A terápiás miRNS-ek használatának egyik legjelentősebb akadály a szervezetbe történő bejuttatásból és a stabilitásból adódó nehézségek (Forterre és mtsai, 2020). Azonban ezekre számos megoldás létezik. A könnyen hozzáférhető, jól lokalizált szilárd tumorok esetén alkalmas bejuttatási módszernek bizonyul az intratumorális injektálás, mely módszer képes minimalizálni a nem kívánt toxikus vagy immunogén hatásokat, azonban nem alkalmas a szisztémás és áttétes elváltozások kezelésére. A miRNS bejuttatására korábban elsősorban vírus vektorokat alkalmaztak (pl.: Adenovírus, Lentivírus) a klinikai vizsgálatok során, azonban az ezek által kiváltott immunválasz miatt manapság inkább a nem vírus alapú vektorokat részesítik előnyben. Ezek lehetnek pozitív és negatív töltésű polimerek (pl.: PLGA, kitozánok és dendrimerek), lipid micellák, exoszóma/extracelluláris vezikulák, biomateriális anyagok (pl. atelokollagén) és különböző szervetlen anyagok (pl.: arany, gyémánt, szilícium-dioxid, vas-oxid) (Hosseinhali és mtsai, 2018; Wang és mtsai, 2018; Bai

és mtsai, 2019; Forterre és mtsai, 2020). Érdemes megemlíteni, hogy számos miRNS alapú terápiás szer tesztelése jár már a klinikai szakaszba (pl.: miR-10b és miR-221 antagomir, vagy a miR-377 és miR-16 mimikek) (Callegari és mtsai, 2012; Guessous és mtsai, 2013; Tang és mtsai, 2019).

4. Célkitűzések

Bár a petefészekrák a legnagyobb halálozással járó nőgyógyászati kórkép, hiányos a szakirodalom a betegség patofiziológiáját illetően. Többek között ezzel magyarázható, hogy viszonylag kevés, és nem kellőképpen hatékony biomarker áll rendelkezésre a betegség diagnosztizálásához. Más ráktípusokhoz viszonyítva (pl.: emlőrák, prosztatarák, vastagbélrák) keveset tudunk a petefészekrákban kulcsfontosságú miRNS-eket illetően is, ami különösen igaz a szabad miRNS-ekre, amelyek alapját képezhetik diagnosztikai eljárások kidolgozásának. Ezért munkánk során célul tűztük ki a petefészekrákban nagy jelentőséggel bíró miRNS-ek *in vivo* (betegektől származó vérminták formájában) és *in vitro* (humán sejttenyészetek alkalmazásával) azonosítását. Ennek érdekében az alábbi vizsgálatokat végeztük el:

Biomarkernek alkalmas miRNS molekulák vizsgálata

- Petefészekrákban szenvedő és egészséges egyénektől származó vérminták miRNS profiljának (miR-200, miR-34 család, miR-203a és miR-205) összehasonlítását qPCR segítségével.
- A betegek mintáiban emelkedett expressziót mutató miRNS-ek diagnosztikai potenciáljának vizsgálatát, valamint a hagyományosan alkalmazott CA125 és HE4 markerekkel való összevetését.

Petefészekrák patofiziológiájában jelentős miRNS-ek vizsgálata ovárium sejt kultúrákban

- Az előző pontban azonosított miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 biológiai relevanciájának vizsgálata humán epiteliális ovárium sejt kultúrák bevonásával.
- Expressziójuk összevetése ösztrogén érzékeny és nem érzékeny ovárium sejtvonalakon, valamint ösztrogén molekulákkal (E2, ZEA, BPA) való kezelések hatására.
- Az E2, ZEA és BPA molekulák kiváltotta fenotípusos (proliferáció, migráció, sejthalál) hatások vizsgálata.

5. Anyagok és módszerek

5.1 A felhasznált vérminták jellemzése

A vizsgálataink során felhasznált vérminták 2016 és 2018 közötti időszakban kerültek begyűjtésre a DE-ÁOK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinikán kezelt betegektől. A vérmintákat Prof. Dr. Póka Róbert és Dr. Lukács János biztosították rendelkezésünkre. Munkánk során csak korábban kemo- vagy sugárterápiás kezelésben nem részesült egyének mintái kerültek feldolgozásra. A tumorok sebészeti úton történő eltávolítását követően, azok pontos hisztopatológiai besorolását és FIGO (International Federation of Gynecology and Obstetrics) stádiumának meghatározását Prof. Dr. Méhes Gábor és Dr. Kiss Lídia végezték (DE-ÁOK Patológiai Intézet).

2. táblázat: A petefészek tumorban szenvedő betegek és az egészséges egyének klinikai adatai.

	Beteg	Egészséges
	n=28	n=60
Életkor	57.03 ± 9.56	56.17 ± 12.18
Szövetteni eredmény		
Cystadenocarcinoma papillare serosum	21	
Cystadenocarcinoma serosum	3	
Adenocarcinoma papillare serosum	2	
FIGO stádium		
I.	3	
III.	18	
IV.	7	
Korábbi rákos megbetegedés	2	
CA125 aktivitás (kU/l)		
≤35	3	
>35	23	
HE4 koncentráció (pmol/l)		
≤70	4	
>70	17	

A vizsgálati protokollt az Egészségügyi Tudományos Tanács, Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága (ETT TUKEB) hagyta jóvá [30231-2/2016/EKU]. A tanulmányban részt vevő önkéntesek tájékoztatást kaptak és aláírással ellátott beleegyező nyilatkozatukkal hozzájárultak a minták feldolgozásához.

A vérminták (10-16 ml) EDTA-val alvadásgátolt csövekben kerültek begyűjtésre, amelyeket felhasználásukig (legfeljebb 2h) 4°C-on tároltuk. A vérplazmát két lépésben, centrifugálással (2.500g és 16.000g; 10 perc, 4°C) választottuk el. A plazmamintákat további feldolgozásukig -80°C-on tároltuk. Csak a nem hemolizált mintákat használtuk fel vizsgálatainkhoz. Összesen 88 vérplazmamintát használtunk fel, melyek közül 28 rosszindulatú petefészek tumorral rendelkező betegektől, 60 pedig egészséges egyénektől származott. A vizsgálatban részt vevők életkor adatait, a tumorer pontos szövettani és FIGO besorolását, valamint a betegek CA125 és HE4 marker szintjeit a 2. táblázat tartalmazza.

5.2 Sejttenyészetek vizsgálata

5.2.1 Felhasznált sejtvonalak és fenntartásuk

Vizsgálatainkhoz két humán epiteliális ovárium sejtvonalat alkalmaztunk: a PEO1 sejtvonalat, amely expresszálja az ER α receptort (duplázódási ideje 37h), illetve az A2780 sejtvonalat, amely nem expresszálja az ER α receptort (duplázódási ideje 16h). A PEO1 sejtvonal a Merck KGaA-tól (USA) került beszerzésre, az A2780 sejtvonalat pedig Dr. Goda Katalin (DE-ÁOK, Biofizika és Sejtbiológia Tanszék) bocsátotta rendelkezésünkre. A vizsgálatokat megelőzően qPCR segítségével igazoltuk, hogy a PEO1 sejtvonal valóban expresszálja az ER α -t (relatív expresszió: 0.3 ± 0.1 a *GAPDH* expressziójához viszonyítva), míg az A2780 sejtvonal esetén nem volt kimutatható ezen receptort kódoló gén expressziója, mely összhangban van a szakirodalmi adatokkal (O' Donnell és mtsai, 2005; Pinton és mtsai, 2018).

Mindkét sejtvonalat RPMI1640 médiumban (Corning; USA) tartottuk fenn, melyet 10% (PEO1), vagy 5% (A2780) FBS-sel (Corning; USA), 1% L- glutaminnal, 100 ug/ml sztreptomocinnal és 100 U/ml penicillinnel egészítettünk ki (37 °C, 90% páratartalom, 5% CO₂). A sejtek passzálása Ca²⁺, Mg²⁺ mentes PBS-el történő mosást követően, 0,05%-os tripszines (0,53mM EDTA tartalmú; Corning; USA) emésztés segítségével történt. Kísérleteinket megelőzően a sejtvonalak *Mycoplasma* mentességéről a PCR Mycoplasma Test

Kit I/C (Promokine; Franciaország) segítségével győződünk meg, amihez antibiotikum mentes médiumban fenntartott tenyészetek felülúszójából vett mintát használtunk fel.

5.2.2 A sejtenyészetek ösztrogénekkal való kezelése

Az E2, ZEA és BPA molekulákkal (Sigma-Aldrich; USA) való kezelések hatásának vizsgálatához a sejteket 24-, illetve 96-lyukú lemezekben tenyésztettük. A 24-lyukú lemezek esetében 50.000 (A2780), illetve 100.000 (PEO1), míg a 96-lyukú lemezek esetében 5.000 (A2780), illetve 10.000 (PEO1) sejtet tapasztottunk. A sejteket az előző pontban ismertetett fenntartó médiumban tapasztottuk (24h, 37 °C, 90% páratartalom, 5% CO₂). A sejtek letapadását követően a fenntartó médiumot eltávolítottuk, a sejteket előmelegített PBS-el mostuk, majd a sejtekhez 5% DCC-FBS-el (Corning; USA) és 1% L- glutaminnal kiegészített PRF-RPMI1640 médiumot (Corning; USA) adtunk. A médium cserére a fenntartó médium FBS komponensében jelenlévő szteroid hormonok, valamint a „phenol red” interferáló hatásának elkerülése érdekében volt szükség. Ezen komponensek hosszú távon megmutatkozó hatásának csökkentése érdekében a tenyészeteket a médium cserét követően 24h-t inkubáltuk. Az inkubációs periódus lejárta után a sejtenyészeteket E2, ZEA és BPA (Sigma-Adrich; USA) molekulákkal (melyek beoldása DMSO-ban történt) 1, 10, 100, illetve 1000 nM végkoncentrációban kezeltük. Vizsgálataink alkalmával, ezt az időpontot tekintettük 0h-nak. Néhány kísérlet esetén a tenyészeteket további 1 nM MPP-vel (methyl-piperidino-pyrazole; ER α szelektív antagonist) is kiegészítettük. Ezt követően a sejteket az aktuális vizsgálattól függő időtartamig tovább inkubáltuk (37°C, 5% CO₂). Kontrollként minden esetben kezelésen át nem esett (ekkor a tenyészetek ugyanolyan térfogatú DMSO kezelésben részesültek), de minden tekintetben ugyanolyan körülmények között tenyésztett sejteket alkalmaztunk.

5.2.3 Sejtproliferáció vizsgálata

Az E2, ZEA és BPA ovárium sejtvonalakra gyakorolt proliferatív hatásának mértékét sejtszámolással állapítottuk meg. Ekkor a sejteket 24-lyukú lemezen, 5.2.2 pontban leírt módon tenyésztettük. Az E2, ZEA és BPA kezeléseket követően ~90%-os konfluencia elérésekor a sejteket sejtkaparó segítségével összegyűjtöttük, majd a sejtszámokat Bürker-kamra segítségével meghatároztuk.

5.2.4 Migráció vizsgálata

A sejtek migrációs képességét Scratch-assay segítségével határoztuk meg (Grada és mtsai, 2017; Bobadilla és mtsai, 2019). Ekkor a teljes konfluencia elérésének érdekében az A2780 sejtvonal esetében 300.000, míg a PEO1 sejtvonal esetében 500.000 sejtet, 24-lyukú lemezen tapasztottunk, az 5.2.2 pontban leírt módon. A teljes konfluencia elérését követően egy pipettahegy segítségével sávot húztunk a kialakult pázsiton, majd elvégeztük az E2, ZEA és BPA molekulákkal való kezeléseket. A sáv húzás pillanatában (0h) és 24h elteltével a sávokról 3 fotót készítettünk (10X-es nagyítás), oly módon, hogy azok lefedjék a teljes sáv hosszát. A sáv pontos szélességét a TSchrach szoftver segítségével határoztuk meg (Gebäck és mtsai, 2009). A migráció intenzitását a sávösszehúzódás mértéke jelezte: (kezdeti sáv szélesség - végleges sáv szélesség) / kezdeti sáv szélesség * 100 (Grada és mtsai, 2017). A sejtproliferáció interferáló hatását elkerülendő a kísérletet β -D-arabinofuranozid-hidroklorid citozin jelenlétében végeztük el (1 μ M végkoncentráció, Sigma-Aldrich; USA).

5.2.5 Apoptózis vizsgálat

Az apoptózis jelenlétét a mitokondriális membránpotenciál csökkenésével jellemeztük, amelyet a DiIC1 (5) assay segítségével határoztunk meg (Markovics és mtsai, 2019). A DiIC1 (5) (1,1',3,3',3',3'-hexametil-indodikarbocianin-jodid) egy olyan fluoreszcens festék, amely a mitokondriális membránpotenciál függvényében halmozódik fel a sejtek mitokondriumaiban. Így apoptózis esetén a sejtekben csökkent fluoreszcencia intenzitás mérhető. A sejteket az 5.2.2. pontban leírt módon, 96-lyukú lemezen tapasztottuk. A kezeléseket követően ~90% konfluencia elérésekor a felülúszót eltávolítottuk, majd a sejteket 50nM DiIC1(5) jelenlétében inkubáltuk (50 μ l/lyuk, 30 min, 37°C). Az inkubációt követően a sejteket PBS-sel mostuk, majd 50 μ l PBS jelenlétében meghatároztuk a fluoreszcencia intenzitását (excitáció: 630 nm; emisszió: 670 nm) CLARIOstar Plus mikroplate-reader (BMG Labtech GmbH; Németország) segítségével. A pozitív kontroll esetében az apoptózist 0,25nM CCCP (karbonil-cianid-m-klór-fenil-hidrazin, Life Technologies Hungary Kft; Magyarország) molekula hozzáadásával indukáltuk.

5.2.6 Sejtlízis mértékének meghatározása

A sejtlízis mértékét a sejttényészetek felülúszójában mérhető LDH (Lactate dehydrogenase) aktivitással határoztuk meg. Az LDH egy citoplazmatikus enzim, ezért a sejttényészet felülúszójában való megjelenése sejtlízis jelenlétére utal. Vizsgálatainkhoz a

CyQUANT LDH Cytotoxicity Assay Kitet alkalmaztuk (Thermo Fisher Scientific; USA), a gyártó utasításait követve. Ekkor a sejteket az 5.2.2 pontban leírt módon, 96-lyukú lemezen tenyésztettük. Az E2, ZEA és BPA kezeléseket követően, ~90%-os konfluencia elérésekor 50 μ l felülúszót eltávolítottunk, melyekhez 50 μ l reakció oldatot adtunk, majd 30 percig inkubáltuk (szobahőmérséklet). A reakciót 50 μ l Stop solution oldat hozzáadásával állítottuk le. Az LDH aktivitásokat 490 nm-en Multiskan sky mikroplate- reader (Thermo Fisher Scientific; USA) segítségével mértük le. A pozitív kontroll esetében a mérést megelőzően a sejtekhez 10 μ l 10X Lysis puffert adtunk, majd az LDH aktivitás meghatározása a többi mintával megegyező módon történt.

5.2.7 Ko-kultúra

A szabad miRNS-ek környező sejtek miRNS mennyiségére gyakorolt hatását ko-kultúra segítségével vizsgáltuk (Hergenreider és mtsai, 2012). Ekkor az A2780 sejt vonalat, az 5.2.2 pontban leírt módon, 24-lyukú lemezen tapasztottuk. Ezzel egyidőben, a PEO1 sejteket (40.000 sejt) Millicell sejttenyésztő inzertekbe (0,4 nm pórusméret, Merck Millipore; USA) tapasztottuk. A sejtek letapadását követően a PEO1 sejteket tartalmazó inzerteket, az A2780 sejteket tartalmazó lyukba helyeztük. Fontos megjegyezni, hogy az inzertek és a 24-lyukú lemez ugyanazt a médiumot tartalmazta (PRF-RPMI, 5% DCC-FBS, 10nM E2). 12, illetve 24h elteltével az inzerteket eltávolítottuk, majd az A2780 sejtekből miRNS frakciót is tartalmazó totál RNS-t izoláltunk az 5.4.2 pontban leírt módon. A PEO1 sejtek által kibocsátott szabad miRNS-ek, az A2780 sejtek miRNS tartalmára gyakorolt hatását, önmagában tenyésztett A2780 sejtekhez viszonyítva határoztuk meg.

5.3 Transzkripciós vizsgálatok – mRNS izolálás és expressziós analízis

5.3.1 Totál RNS izolálás sejttenyészetekből

A génexpressziós vizsgálatok alkalmával a sejteket 24-lyukú lemezen tenyésztettük az 5.2.2 pontban leírt módon. Az RNS izolálást a kezelést 24h-t követően, az RNeasy Mini Kit (Qiagen; Németország) segítségével végeztük, a gyártó utasításait követve. Ekkor a tenyésztő médium eltávolítása után a lyukakba 350 μ l β -merkaptoetanol tartalmú RLT lízis puffert pipettáztunk, majd sejtkeparó segítségével a sejteket maradéktalanul összegyűjtöttük, melyet 5 perc inkubáció követett (szobahőmérséklet). A sejtörmelékét centrifugálás segítségével választottuk el (8.000g, 2 perc, szobahőmérséklet). Az így kapott felülúszóhoz 1 térfogatrészt 70%-os etanolt adtunk, majd az elegyet egy RNS kötő oszlopra mértük (RNeasy MinElute

Spin Column). Az RNS oszlophoz való kikötést követően, a mintákat DNáz kezeltük (RNase free DNase set; Qiagen; Németország). Ekkor 10µl DNase I és 70µl RDD puffer elegyét ráértük az oszlopokra és 15 percig inkubáltuk őket (szobahőmérséklet). Ezt követően az oszlopokat 3X mostuk, végül az RNS molekulákat 20 µl nukleáz mentes vízzel eluáltuk (5 min, szobahőmérséklet). Az izolált RNS mintákat felhasználásukig -70 °C-on tároltuk. Az RNS koncentráció meghatározását Nanodrop (Thermo Fischer Scientific; USA) segítségével végeztük.

5.3.2 Génexpresszió meghatározása qPCR segítségével

A *GREB1*, *DEPTOR*, *CA12*, *RBBP8*, *CDH1*, *ZEB1* és *ESR1* gének expresszióját a Lightcycler 96 PCR készülék (Roche Ltd; Svájc) segítségével, a QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen; Németország) felhasználásával detektáltuk, a gyártó által biztosított protokollt követve. Az alkalmazott primerek szekvenciáját a 3. táblázat tartalmazza. A PCR reakcióelegy minden esetben 100 ng totál RNS-t tartalmazott.

A PCR reakcióelegy összetétele (végtérfogat 20 µl):

10 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2X)
0,2 µl QuantiTect RT Mix
1µM forward Primer
1µM reverse Primer
100 ng RNS
nukleáz mentes víz

A qPCR program lépései:

50°C 30 perc
95°C 15 perc
94°C 15 másodperc
54°C 30 másodperc
72°C 30 másodperc
95°C 10 másodperc
65°C 60 másodperc
97°C 01 másodperc
37°C 30 másodperc

} 40 ciklus
} 1 ciklus

Annak érdekében, hogy meggyőződjünk arról, hogy a kapott jel egy PCR termék amplifikációjának a következménye, olvadási görbe analízist végeztünk. Az analízist 65-97°C közötti hőmérséklet tartományban végeztük, ahol a kvantifikációt 0,2°C-onként végeztük el.

A méréseket min. három ismétlésben végeztük el. A kapott eredmények normalizálásakor a GAPDH gént alkalmaztuk referenciaként. A relatív expressziós szintek változását a ΔC_t módszerrel értékeltük ki. Ekkor a kapott relatív expressziós szintek a $2^{-\Delta C_t}$ értéknek feleltek meg. Az egyes kezelések hatására megváltozó expresszió meghatározásakor relatív expressziós arányt számoltunk: kezelt minta esetén kapott relatív expresszió/kezeletlen kontroll esetén kapott relatív expresszió. Ha az arány értéke >1 , az a kezelés hatására megfigyelhető indukciót, ha az arány értéke <1 , az a kezelés hatására megfigyelhető repressziót jelzi.

3. táblázat: Az egyes gének expressziójának vizsgálatokor alkalmazott primerek szekvenciája.

	Forward	Reverse
<i>GREB1</i>	5' TCTTGCACAATCCATCGAG 3'	5' GTCCACTCGGCTACCACCT 3'
<i>DEPTOR</i>	5' TCATGGCATCTGAATTCCTG 3'	5' ATGGGTGCTTGTGGACAC 3'
<i>CAI2</i>	5' GTTTCTCCTGACCAACAATGG 3'	5' CGTGGCACTGTAGCGAGAC 3'
<i>RBBP8</i>	5' CACTCAGACTTGTATGGAAAGAGG 3'	5' TCCTTCTGTTTCTGTTTCAACG 3'
<i>CDHI</i>	5' TCTGTGAGAGGAATCCAAAGC 3'	5' TGGGAGGATCACTAGGTTCAA3'
<i>ZEB1</i>	5' AGGATGACCTGCCAACAGAC 3'	5' ATTTCTTGCCCTTCCTTTCC 3'
<i>GAPDH</i>	5' CACCCACTCCTCCACCTTT 3'	5' GCCAAATTCGTTGTCATACCA 3'
<i>ESRI</i>	5' GTGACTTCAATGGCGAAGG 3'	5' TTCCTTGTCATTGGTACTGG 3'

5.4 Transzkripció vizsgálatok – miRNS izolálás és expressziós analízis

5.4.1 A szabad miRNS-ek izolálása vérplazmából

A miRNS frakciót is tartalmazó, szabad RNS-ek vérplazma mintákból való izolálása a miRNeasy szérum/plazma kit (Qiagen; Németország) felhasználásával történt, a gyártó utasításait követve. Az extrahálási folyamat során 200 μ l vérplazmához 1 ml QIAzol lízis reagenst adtunk, majd öt perc inkubációt és vortexelést követően azt 200 μ l kloroformmal egészítettük ki és alaposan összeráztuk. Öt perc inkubációt (szobahőmérséklet) követően

lecentrifugáltuk (8.000g, 5 min, 4°C). Az így elválasztott vizes fázist óvatosan eltávolítottuk, majd 1,5 térfogatrész abszolút etanollal egészítettük ki. Az RNS molekulák oszlopra (RNeasy MinElute Spin Column) történő kikötését követően, az oszlopokat három lépésben mostuk, majd végül a kikötött RNS molekulákat 15 µl nukleáz mentes vízzel eluáltuk (5 min, szobahőmérséklet). Az izolált RNS mintákat felhasználásukig -70 °C-on tároltuk.

5.4.2 Intracelluláris és szabad miRNS izolálás sejttenyészetekből

A sejttenyészetek miRNS expressziójának vizsgálatokor a sejteket 24-lyukú lemezen tenyésztettük az 5.2.2 pontban leírt módon. Az izolálást a kezelést 12 és 24h-t követően végeztük. Ekkor az intracelluláris, miRNS frakciót is tartalmazó totál RNS-t a sejtlyúzumból a miRNeasy Kit (Qiagen; Németország) segítségével izoláltuk, a gyártó utasításait követve. Ekkor a tenyésztő médium eltávolítása után a lyukakhoz 700 µl QIAzol lízis reagenst adtunk, majd a sejteket sejtkeparó segítségével összegyűjtöttük, melyet 5 min inkubáció követett (szobahőmérséklet). A sejtörmelékcentrifugálás segítségével választottuk el (12.000g, 2 perc, szobahőmérséklet). Az így kapott felülúszóhoz 0,2 térfogatrész kloroformot adtunk, alaposan összeráztuk és 5 percig inkubáltuk (szobahőmérséklet). Az így kapott elegyet ismét lecentrifugáltuk (12.000g, 10 perc, 4 °C). Ezután a felső fázishoz 1,5 térfogatrész abszolút etanolt adtunk. Az RNS molekulák oszlopra (RNeasy Mini Spin Column) történő kikötését követően, DNáz kezelést végeztünk (RNase free DNase set; Qiagen; Németország). Ekkor 10µl DNase I és 70µl RDD puffer elegyét ráértük az oszlopokra és 15 percig inkubáltuk őket (szobahőmérséklet). Ezt követően az oszlopokat 3X mostuk, végül a kikötött RNS molekulákat 20 µl nukleáz mentes vízzel eluáltuk (5 min, szobahőmérséklet). Az izolált RNS mintákat felhasználásukig -70 °C-on tároltuk.

A szabad miRNS expresszió vizsgálatokor a miRNS frakciót is tartalmazó totál RNS-t a sejttenyészetek felülúszójából izoláltuk. Ekkor a sejttenyészetek felülúszóját eltávolításukat követően lecentrifugáltuk (16.000g, 20 perc, 4 °C), majd az RNS izolálást 200 µl felülúszó felhasználásával a miRNeasy szérum/plazma kit (Qiagen; Németország) segítségével, az 5.4.1 pontban ismertetett módon végeztük.

5.4.3 MiRNS koncentráció meghatározása

Az izolált miRNS molekulák koncentrációjának meghatározása miRNS-specifikus fluorometrikus vizsgálattal történt. Ekkor 2 µl mintához 198 µl 200:1 arányú miRNA reagent puffer és miRNA reagent elegyét adtuk, majd rövid vortexelés és 2 perc inkubálást

(szobahőmérséklet) követően a Qubit® 2.0 Fluorometer segítségével lemértük (Thermo Fischer Scientific; USA).

5.4.4 Az érett miRNS-ek reverz transzkripciója

Az érett miRNS-ek reverz transzkripcióját a miScript II RT Kit (Qiagen; Németország) alkalmazásával végeztük, a gyártó által megadott protokoll alapján. Ekkor az alkalmazott reverz transzkriptáz a mintában található valamennyi érett miRNS átírását elvégzi, és a qPCR lépés során használt miRNS specifikus primerek biztosítják a miRNS specifikus kvantifikációt.

A reakcióelegy összetétele a következő volt (végtérfogat 20 µl):

4 µl miScript HiSpec Puffer (5X)
2 µl miScript Nucleics Mix (10X)
2 µl miScript Reverse Transcriptase Mix
10 ng templát RNS
nukleáz mentes víz

A reverz transzkripció program lépései:

60 perc 37°C
5 perc 95°C

5.4.5 A cDNS koncentráció meghatározása

A cDNS-ek koncentrációjának meghatározásához DNS-specifikus fluorometrikus mérést alkalmaztunk. Ekkor 2 µl cDNS-hez 198 µl, 200:1 arányú DNA reagent puffer és DNA reagent elegyét adtuk, majd rövid vortexelés és 2 perc inkubálást (szobahőmérséklet) követően a Qubit® 2.0 Fluorometer segítségével lemértük (Thermo Fischer Scientific; USA).

5.4.6 Érett miRNS-ek expressziójának meghatározása qPCR segítségével

A miR-200a-3p, miR-200b-3p, miR-200c-3p, miR-141-3p, miR-429-3p, miR-34a-5p, miR-34b-3p, miR-34c-3p, miR-203a-3p és miR-205-5p expresszióját Lightcycler 96 PCR készülék (Roche Ltd; Svájc) segítségével detektáltuk. Az érett miRNS specifikus primereket szintén a gyártó biztosította (miScript Primer Assays, Qiagen; Németország). Az expresszió meghatározása a miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen; Németország) segítségével történt, a gyártó utasításait követve.

A PCR reakcióelegy összetétele (végtérfogat 10 μ l):

5 μ l QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (2X)
1 μ l miScript Universal Primer (10X)
1 μ l miScript Primer Assay
500 pg cDNS termék
nukleáz mentes víz

A qPCR program lépései:

95°C 15 perc	}	50 ciklus
94°C 15 másodperc		
55°C 30 másodperc		
70°C 30 másodperc		
95°C 20 másodperc		
40°C 20 másodperc	}	1 ciklus
85°C 00 másodperc		
37°C 30 másodperc		

Annak érdekében, hogy meggyőződjünk arról, hogy a kapott jel 1 PCR termék amplifikációjának a következménye, olvadási görbe analízist végeztünk. Az analízist 40-85°C közötti hőmérséklet tartományban végeztük, ahol a kvantifikációt 0,2°C-onként végeztük el.

A méréseket három ismétlésben végeztük el. A kapott eredmények normalizálásakor az RNU6 és miR-103-3p miRNS-t alkalmaztuk referenciaként (Kan és mtsai, 2012). Bár ezen 2 referencia Ct értékei között az egyes minták esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget [Δ Ct (CtRNU6-CtmiR-103-3p) = 0.3 \pm 0.1], azonban az RNU6 nem bizonyult megbízhatónak a szabad miRNS szintek detektálásakor. Ezért a munkánk során a normalizáció egységesen a miR-103 felhasználásával történt. A relatív expresszió meghatározását a Δ Ct módszerrel végeztük. Ekkor a kapott relatív expressziós szintek a $2^{-\Delta$ Ct értéknek feleltek meg. Az egyes kezelések hatására megváltozó miRNS szintek meghatározásakor relatív expressziós arányt számoltunk: kezelt minta esetén kapott relatív expresszió/kezeletlen kontroll esetén kapott relatív expresszió. Ha az arány értéke >1, az a kezelés hatására megfigyelhető indukciót, ha az arány értéke <1, az a kezelés hatására megfigyelhető repressziót jelzi.

5.5 A vizsgált miRNS-ek bioinformatikai elemzése

Mivel egy miRNS több cél mRNS expressziójára is hatást gyakorolhat, és egy mRNS-hez is kapcsolódhat több miRNS, ezért a miRNS-ek hálózatokat alkotva fejtik ki hatásukat a sejtekben. Pontos funkciójuk megértése érdekében tehát elengedhetetlen célgénjeik meghatározása, és azok funkcionális analízise. Ennek feltárása érdekében bioinformatikai analízist végeztünk, több adatbázis felhasználásával. A miRNS-ek célgénjeinek azonosításához a miRTargetLink Human miRNA adatbázist alkalmaztuk (<https://ccb-web.cs.uni-saarland.de/mirtargetlink/multinet.php>; Hamberg és mtsai, 2016). Ekkor csak az erős, azaz nagy bizonyosságú cél mRNS-eket vettük figyelembe. Ezen adatbázis segítségével nemcsak az egyes miRNS-ek, hanem a több miRNS által közösen szabályozott mRNS molekulák is meghatározhatóak. A kapott célgének felhasználásával funkcionális géndúsulási analízist végeztünk a DAVID szoftver segítségével (<https://david.ncifcrf.gov>; Huang és mtsai, 2009). Ezzel képet kaphattunk azon biológiai folyamatokról, amelyek szabályozásában a miRNS-ek célgénjei, ezáltal pedig a vizsgált miRNS-ek kulcsszerepet tölthetnek be. A dúsulás mértékének jellemzésére az FDR értéket, illetve az Fold enrichment értékeket alkalmaztuk. Ekkor a GO (gene ontology) és KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) adatbázisok által kiadott találatokat vettük figyelembe.

5.6 Az eredmények statisztikai elemzése

A munkánk során kapott eredményeket a GraphPad Prism 7 és SPSS 25 statisztikai csomagok segítségével elemeztük, melyben Dr. Janka Eszter volt segítségünkre. A vizsgált miRNS-ek beteg és egészséges egyének vérplazmáiban meghatározott expressziójának összehasonlításakor az alábbi statisztikai tesztek alkalmaztuk. A két csoport során kapott miRNS expresszió közötti szignifikanciát Mann–Whitney U teszttel határoztuk meg, az egyes miRNS expresszió közötti korrelációt pedig a Spearman korrelációs koefficiens kiszámításával jellemeztük. A szignifikáns különbséget mutató miRNS-ek esetében, azok diagnosztikai potenciáljának jellemzése érdekében ROC görbéket vettünk fel, majd az optimális cut-off értékek segítségével meghatároztuk az AUC értéket, a szenzitivitást, a specifitást, a pozitív prediktív értéket (PPV), a negatív prediktív értéket (NPV) és a diagnosztikai pontosságot, az alábbi képletek segítségével:

Szenzitivitás: $VP/(VP+FN)$

Specificitás: $VN/(VN+FP)$

Pozitív prediktív érték (PPV): $VP/(VP+FP)$

Negatív prediktív érték (NPV): $VN/(VN+FN)$

Diagnosztikai pontosság: $(VP+VN)/(VP+VN+FP+FN)$

VP- valódi pozitív; FP- fals pozitív; VN- valódi negatív; FN- fals negatív

A vizsgált miRNS-eken alapuló diagnosztikai tesztek, a petefészekrák diagnosztikájában hagyományosan alkalmazott CA125 és HE4 markerekkel való egyezését a Cohen kappa (κ) értékek meghatározásával végeztük.

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

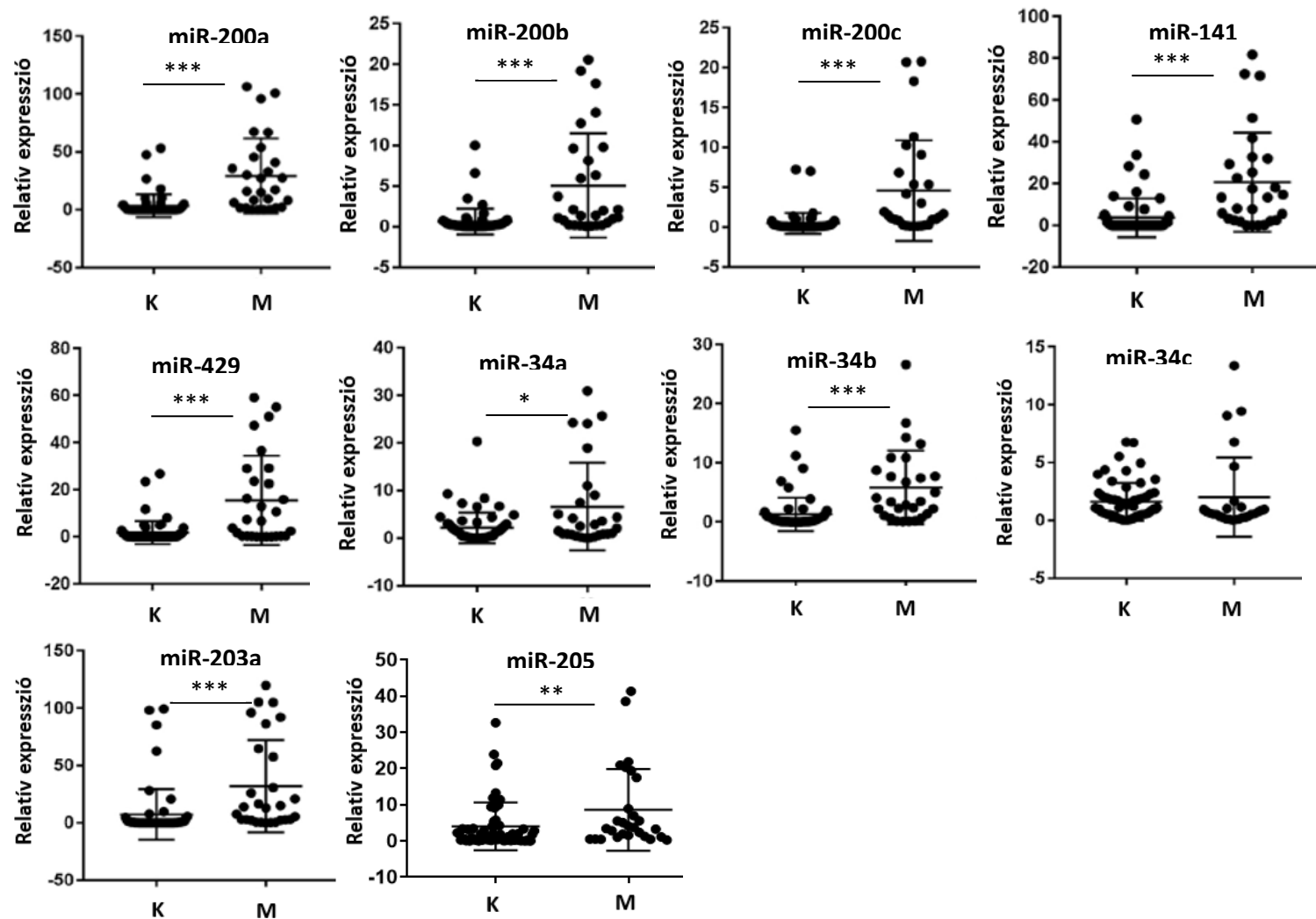
6. Eredmények

6.1 Szabad miRNS szintek összehasonlítása petefészekrákban szenvedő és egészséges egyének vérmintáiban

6.1.1 A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 relatív expressziójának vizsgálata

Munkánk első lépésében az EMT szabályozásában kulcsfontosságú miRNS-ek expresszióját hasonlítottuk össze a petefészekrákban szenvedő (n=28) és egészséges (n=60) egyének vérmintáiban, melyek a miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429), és a miR-34 (miR-34a, miR-34b, miR-34c) családba tartozó miRNS-ek, valamint a miR-203a és a miR-205 voltak.

Eredményeink alapján a miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-34b, miR-203a ($p < 0,001$), miR-205 ($p < 0,01$) és a miR-34a ($p < 0,05$) relatív expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult az epitéliális petefészekrákban szenvedő betegek vérmintáiban (9. ábra). A miR-34c esetében azonban a különbség nem bizonyult szignifikánsnak ($p = 0,222$; 9. ábra).



9. ábra: A miR-200 és miR-34 család tagjainak, illetve a miR-203a-nak és miR-205-nek a relatív expressziós szintje a malignus petefészek tumorral rendelkező (M) és az egészséges kontroll csoport (K) plazma mintáiban. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Mann-Whitney U-test

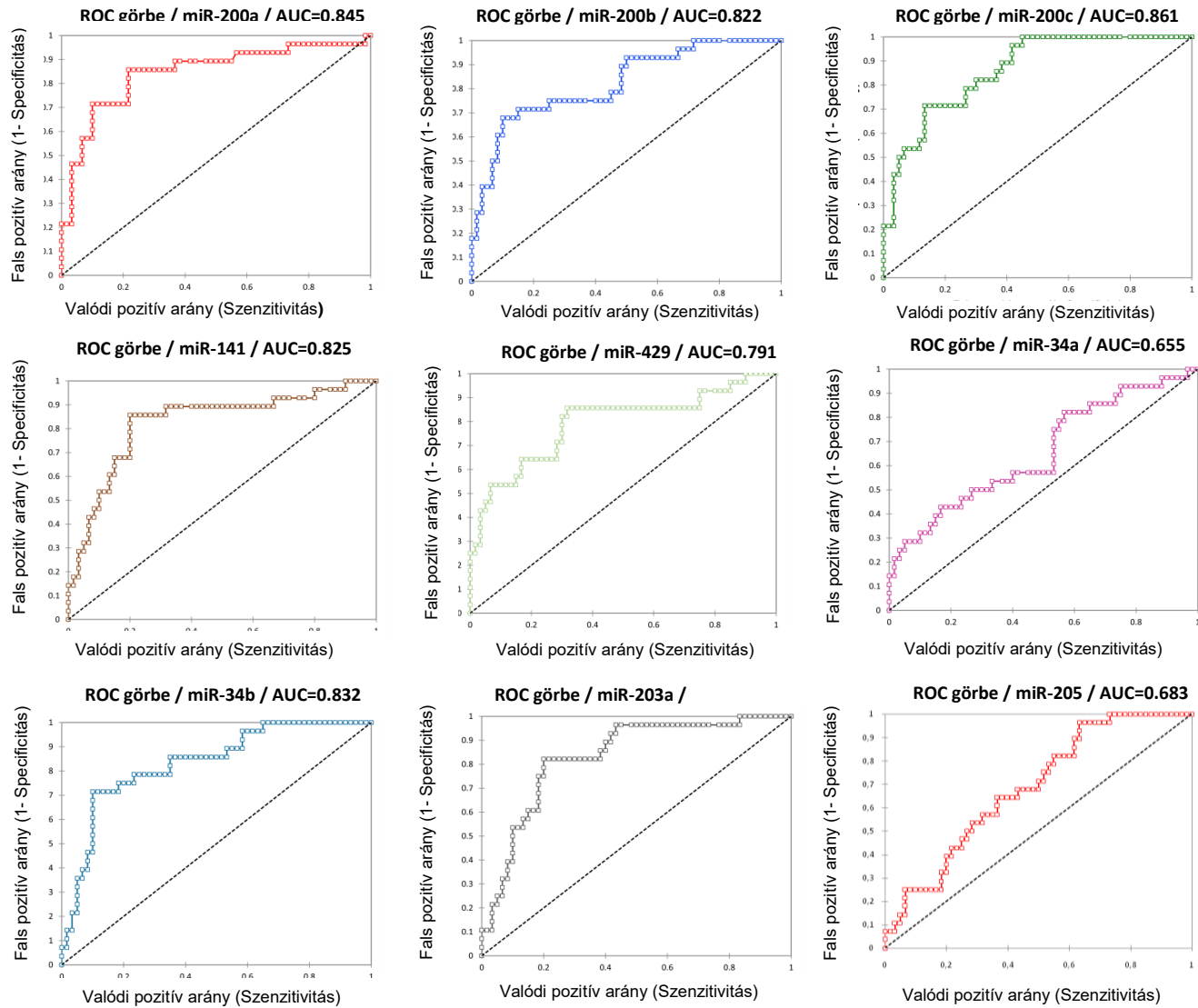
6.1.2 A vizsgált miRNS-ek diagnosztikai potenciáljának jellemzése

A beteg és egészséges egyének vérmintái között szignifikáns különbséget mutató miRNS-ek diagnosztikai potenciáljának jellemzése érdekében megvizsgáltuk diagnosztikai paramétereiket. Ekkor azok szenzitivitása, specificitása, PPV, NPV és ROC-AUC értékei kerültek meghatározásra (4. táblázat és 10. ábra). Megjegyezném, hogy ezen elemzésben a miR-34c azon okból maradt ki, mert ezen miRNS expressziója nem különbözött az egészséges és beteg csoport mintái között.

4. táblázat: A miR-200 és miR-34 család tagjainak, illetve a miR-203a-nak és miR-205-nek a diagnosztikai paramétereit.

	AUC	Diagnosztikai pontosság	Szenzitivitás	Specificitás	PPV	NPV
miR-200a	0,845	80,68%	85,71%	78,33%	64,86%	92,16%
miR-200b	0,822	82,95%	67,86%	90,00%	76,00%	85,71%
miR-200c	0,861	81,82%	71,43%	86,67%	71,43%	86,67%
miR-141	0,825	81,82%	85,71%	80,00%	66,67%	92,31%
miR-429	0,791	73,86%	85,71%	68,33%	55,81%	91,11%
miR-34a	0,655	70,45%	42,86%	83,33%	54,55%	75,76%
miR-34b	0,832	73,86%	71,43%	75,00%	57,14%	84,91%
miR-203a	0,831	80,68%	82,14%	80,00%	65,71%	90,57%
miR-205	0,683	60,23%	64,29%	58,33%	41,86%	77,78%

Eredményeink alapján a legnagyobb ROC-AUC értéket: 0,861 (95% CI = 0,776-0,947) a miR-200c esetében tapasztaltuk, míg a diagnosztikai pontosság a miR-200b esetében bizonyult a legmagasabbnak (82,95%). A szenzitivitás a miR-200a, miR-141 és miR-429 esetén adódott a legnagyobbknak (85,71%), míg a miR-200b esetében kaptuk a legmagasabb (90%) specificitást. A legalacsonyabb diagnosztikai paramétereiket a miR-34a és a miR-205 mutatta (4. táblázat és 10. ábra).



10. ábra: A miR-200 és miR-34 család tagjainak, illetve a miR-203a-nak és miR-205 esetében kapott ROC görbék.

A malignus betegségben szenvedő betegek mintái nagyrésze esetén (n=21) rendelkezésünkre álltak a CA125 és HE4 értékek is (2. táblázat). Ezen adatok felhasználásával meghatároztuk a vizsgált miRNS-eken, illetve a CA125 és HE4 markereken alapuló diagnosztikai tesztek egyezését (5. táblázat). Ehhez Cohen kappá tesztet alkalmaztunk. Ezen analízisből a miR-34a-t, és miR-205-öt azon okból hagytuk ki, mivel ezen miRNS-ek alacsony diagnosztikai paraméterekkel rendelkeztek. A kapott Cohen kappá értékek alapján a legnagyobb egyezés a miR-200b és a miR-200c-n alapuló tesztek között volt megfigyelhető. Az egyezés jónak bizonyult továbbá a miR-200c és a miR-34b között (5. táblázat). A miRNS-eken alapuló tesztek között több esetben is közepes egyezés volt megfigyelhető. Ugyancsak közepes egyezést mutatott a HE4 a miR-200b-vel, és a miR-200c-vel. A miRNS-ek és a CA125 közötti egyezés azonban a legtöbb esetben gyengének bizonyult (5. táblázat). Továbbá a CA125 és a HE4 markerek összehasonlításakor szintén közepes egyezés volt megfigyelhető.

6.1.3 A vizsgált miRNS-ek közötti funkcionális kapcsolat vizsgálata

Az egyes miRNS-ek közötti funkcionális kapcsolatot az expressziójuk között megfigyelhető korreláció mértékével, valamint az általuk közösen szabályozott mRNS-ek számával jellemeztük. A korreláció meghatározásához Spearman korrelációs analízist végeztünk (6/A. táblázat). Minden miRNS esetében pozitív korrelációt kaptunk. A kapott korrelációs koefficiensek alapján a miR-200b és miR-200c esetén tapasztaltuk a legnagyobb mértékű korrelációt, de a miR-200 család többi tagja között is közepes korreláció volt detektálható. Szintén közepes korreláció jellemezte a miR-200 családba tartozó miRNS-eket, és a miR-203a-t, illetve a miR-205-öt. A miR-200 és a miR-34 család tagjai között a korreláció azonban gyengébbnek bizonyult (6/A. táblázat). Fontos megemlíteni továbbá, hogy a miR-34a és a miR-34b nagyobb korrelációt mutattak egymással, mint a miR-34c-vel. Ezen felül a miR-34c esetén kapott korrelációs koefficiensek a legtöbb esetben nem bizonyultak szignifikánsnak (6/A. táblázat).

Mivel a miRNS-ek cél mRNS-ek transzlációjára gyakorolt befolyásukon keresztül fejtik ki hatásukat, ezért a közöttük lévő funkcionális kapcsolatok meghatározásához elengedhetetlen közös célgénjeik analízise. Ezért folytatásként meghatároztuk, hogy a vizsgált miRNS-ek hány közös célgénnel rendelkeznek. Az egyes miRNS-ek és miRNS párosok közös célgénjeiknek számát a miRTargetLink adatbázis felhasználásával határoztuk meg (6/B. táblázat; 1-4. kiegészítő táblázat). A páronkénti keresések alapján a miR-200b és a miR-200c

közötti funkcionális kapcsolat lehet a legerősebb, mivel összesen 43 gén működésének a szabályozásában működnek közre. De a miR-200 család tagjai szintén több célgén szabályozásában is közreműködnek, megközelítőleg 20 célgéneen osztoznak az egyes párosok. A miR-34 családba tartozó miRNS-ek közül a miR-34a a miR-34b-vel 18 célgéneen osztozik, azonban a miR-34c csupán 2 célgéneen osztozik a miR-34a-val. Ezen felül a miR-203a és a miR-205 is számos célgéneen osztozik mind a miR-200, és a miR-34 családba tartozó miRNS-ekkel. A miR-203a a miR-200 család tagjai közül miR-200b és miR-200c-vel 5-5 célgéneen osztozik, de a legtöbb gén szabályozásában a miR-34a-val működik közre. A miR-205 szintén a miR-34a-val működik a leginkább közre a célgének száma alapján (6/B. táblázat). Felhívnam a figyelmet továbbá egy érdekes összefüggésre. Az 6. táblázatból szépen kirajzolódik, hogy azon miRNS-ek expressziója jobban korrelál, amelyek rendelkeznek közös célgénnel. Ez leginkább a miR-200b és miR-200c esetében szembetűnő (6. táblázat).

5. táblázat: A miRNS-eken, illetve a CA125 és HE4 markereken alapuló diagnosztikai tesztek közötti egyezés páronkénti összehasonlítása során kapott Cohen kappa értékek.

<i>miR-200a</i>	<i>miR-200b</i>	<i>miR-200c</i>	<i>miR-141</i>	<i>miR-429</i>	<i>miR-34b</i>	<i>miR-203a</i>	CA125	HE4	
–	0,087	0,125	0,447	<0,01	0,087	0,323	0,323	<0,01	<i>miR-200a</i>
	–	0,889	0,087	0,348	0,571	0,500	<0,01	0,400	<i>miR-200b</i>
		–	0,125	0,417	0,667	0,314	0,039	0,481	<i>miR-200c</i>
			–	0,447	0,087	0,323	0,323	<0,01	<i>miR-141</i>
				–	0,348	0,323	<0,01	0,236	<i>miR-429</i>
					–	0,250	<0,01	0,160	<i>miR-34b</i>
						–	<0,01	<0,01	<i>miR-203a</i>
							–	0,488	CA125
								–	HE4

6. táblázat: A) A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 miRNS-ek vérplazmában mérhető expressziója közötti korreláció mértékét jelző Spearman korrelációs együtthatók. # p> 0,05. Minden más esetben p <0,05. B) A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 közös célgénjeinek a száma a miRTargetlink adatbázis alapján.

B \ A	<i>miR-200a</i>	<i>miR-200b</i>	<i>miR-200c</i>	<i>miR-141</i>	<i>miR-429</i>	<i>miR-34a</i>	<i>miR-34b</i>	<i>miR-34c</i>	<i>miR-203a</i>	<i>miR-205</i>
<i>miR-200a</i>	–	0,609	0,590	0,463	0,436	0,324	0,325	0,099#	0,541	0,410
<i>miR-200b</i>	25	–	0,774	0,554	0,423	0,474	0,284	0,290	0,650	0,602
<i>miR-200c</i>	23	43	–	0,497	0,453	0,378	0,363	0,209#	0,673	0,625
<i>miR-141</i>	23	19	19	–	0,616	0,399	0,415	0,192#	0,471	0,371
<i>miR-429</i>	22	24	21	18	–	0,470	0,351	0,264	0,446	0,455
<i>miR-34a</i>	3	7	6	2	4	–	0,384	0,276	0,470	0,371
<i>miR-34b</i>	1	4	3	0	3	18	–	0,018#	0,351	0,200#
<i>miR-34c</i>	1	0	0	0	0	2	0	–	0,264	0,479
<i>miR-203a</i>	4	5	5	3	1	7	4	0	–	0,614
<i>miR-205</i>	3	4	4	4	4	8	3	0	6	–

6.1.4 A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 bioinformatikai elemzése.

A vizsgált miRNS-ek biológiai funkciójának pontosabb feltérképezése érdekében bioinformatikai analízist végeztünk. Ehhez első lépésben kigyűjtöttük célgénjeiket a miRTargetlink adatbázis felhasználásával. A miR-200 és miR-34 család esetén azon célgéneket vontuk be az analízisbe, amelyek legalább 2, ezen családba tartozó miRNS befolyása alatt állnak. A miR-200 család esetében 59, míg a miR-34 család esetén 20 ilyen célgént találtunk (1 és 2. kiegészítő táblázat). A miR-203a és miR-205 esetén az önállóan szabályozott célgénjeiket vontuk be analízisünkbe. A miR-203a 47, míg a miR-205 37 célgénnel rendelkezik (3 és 4. kiegészítő táblázat). A célgének funkcionális vizsgálatához a DAVID adatbázist használtuk, ahol a célgének funkcionális géndúsulási analízisét végeztük el. Ekkor a GO_BP_DIRECT és KEGG_PATHWAY adatbázisok alapján azon biológiai folyamatokat azonosítottuk, amelyek esetében a vizsgált miRNS-ek célgénjei dúsulást mutatnak. A dúsulás mértékét az FDR, valamint a Fold enrichment értékekkel jellemeztük (7-10. táblázat).

Mindegyik miRNS csoport számos, a tumorok kialakulásához köthető folyamatban közreműködhet. A GO adatbázis alapján ezen miRNS-ek leginkább a sejtciklus, a migráció, az angiogenezis, valamint a génexpresszió (beleértve az epigenetikai módosításokat is) szabályozásában működhetnek közre. Ezen adatbázis alapján a miR-200 és a miR-34 család gyakorol befolyást leginkább ezen folyamatokon keresztül a tumorok kialakulására (7. és 8. táblázat). A KEGG adatbázis alapján a miR-34 és a miR-203a jelentősége több ráktípus kialakulásához köthető, de a miR-200 és miR-205 esetén is számos találatot kaptunk (7-10. táblázat). Analízisünk tehát megerősíti ezen miRNS-ek szerepét a tumorok kialakulásában és migrációjában. Ezért munkánk folytatásában ezen miRNS-ek petefészekrákban betöltött funkciójának pontosabb feltérképezése érdekében megvizsgáltuk ezen miRNS-ek expresszióját humán epiteliális ovárium sejtvonalakon is.

7. táblázat: A miR-200 miRNS-ek által kódolt célgének funkcionális géndúsulási analízise GO_BP és KEGG adatbázisok alapján. Az analízis a DAVID Tools szoftver segítségével készült.

GOTERM_BP			
Term	Gének száma	Fold Enrichment	-log10 FDR
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	13	8,365	4,928
GO:0045814~negative regulation of gene expression, epigenetic	6	35,983	3,886
GO:0035924~cellular response to vascular endothelial growth factor stimulus	5	65,186	3,816
GO:0006306~DNA methylation	5	59,971	3,742
GO:0048010~vascular endothelial growth factor receptor signaling pathway	6	24,988	3,333
GO:0010628~positive regulation of gene expression	8	9,156	2,612
GO:0090116~C-5 methylation of cytosine	3	299,857	2,512
GO:0001525~angiogenesis	7	9,413	2,166
GO:0008360~regulation of cell shape	6	12,851	2,166
GO:0032355~response to estradiol	5	16,476	1,855
GO:0010595~positive regulation of endothelial cell migration	4	26,075	1,618
GO:0045766~positive regulation of angiogenesis	5	13,037	1,576
KEGG_PATHWAY			
Term	Gének száma	Fold Enrichment	-log10 FDR
hsa04510:Focal adhesion	9	7,706	3,209
hsa05200:Pathways in cancer	11	4,937	2,924
hsa05222:Small cell lung cancer	6	12,451	2,646
hsa04151:PI3K-Akt signaling pathway	9	4,601	2,031
hsa05215:Prostate cancer	5	10,022	1,669

8. táblázat: A miR-34 miRNS-ek által kódolt célgének funkcionális géndúsulási analízise GO_BP és KEGG adatbázisok alapján. Az analízis a DAVID Tools szoftver segítségével készült.

GOTERM_BP			
Term	Gének száma	Fold Enrichment	-log10 FDR
GO:0010468~regulation of gene expression	6	50,376	4,342
GO:0048754~branching morphogenesis of an epithelial tube	4	146,017	3,356
GO:0010718~positive regulation of epithelial to mesenchymal transition	4	101,770	3,109
GO:0008284~positive regulation of cell proliferation	7	12,612	3,109
GO:0001837~epithelial to mesenchymal transition	3	74,082	1,617
GO:0045787~positive regulation of cell cycle	3	74,082	1,617
GO:0030335~positive regulation of cell migration	4	18,252	1,510
GO:1904837~beta-catenin-TCF complex assembly	3	58,577	1,510
GO:0001541~ovarian follicle development	3	59,971	1,510
GO:0006974~cellular response to DNA damage stimulus	4	16,146	1,376
GO:0048146~positive regulation of fibroblast proliferation	3	46,644	1,366
KEGG PATHWAY			
Term	Gének száma	Fold Enrichment	-log10 FDR
hsa05200:Pathways in cancer	10	9,213	4,883
hsa05210:Colorectal cancer	6	35,037	4,847
hsa04151:PI3K-Akt signaling pathway	9	9,445	4,603
hsa05219:Bladder cancer	5	44,153	4,249
hsa05206:MicroRNAs in cancer	8	10,127	4,210
hsa05213:Endometrial cancer	5	34,813	4,006
hsa05212:Pancreatic cancer	5	27,850	3,684
hsa05220:Chronic myeloid leukemia	5	25,143	3,662

Term	Gének száma	Fold Enrichment	-log10 FDR
hsa05161:Hepatitis B	6	14,981	3,662
hsa05220:Chronic myeloid leukemia	5	25,143	3,662
hsa05218:Melanoma	5	25,497	3,662
hsa05216:Thyroid cancer	4	49,938	3,462
hsa05222:Small cell lung cancer	5	21,297	3,457
hsa05205:Proteoglycans in cancer	6	10,862	3,162
hsa05221:Acute myeloid leukemia	4	25,861	2,742
hsa05223:Non-small cell lung cancer	4	25,861	2,742
hsa04390:Hippo signaling pathway	5	11,988	2,643
hsa05214:Glioma	4	22,280	2,624
hsa05215:Prostate cancer	4	16,457	2,264
hsa04510:Focal adhesion	5	8,788	2,209
hsa04066:HIF-1 signaling pathway	4	15,086	2,199
hsa04919:Thyroid hormone signaling pathway	4	12,593	1,995
hsa04110:Cell cycle	4	11,679	1,921
hsa04310:Wnt signaling pathway	4	10,494	1,809
hsa04115:p53 signaling pathway	3	16,211	1,462
hsa05211:Renal cell carcinoma	3	16,457	1,462
hsa04014:Ras signaling pathway	4	6,408	1,308

9. táblázat: A miR-203a által kódolt célgének funkcionális géndúsulási analízise GO_BP és KEGG adatbázisok alapján. Az analízis a DAVID Tools szoftver segítségével készült.

GOTERM_BP			
Term	Gének száma	Fold Enrichment	-log10 FDR
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-templated	12	8,325	4,006
GO:2000811~negative regulation of anoikis	4	84,065	2,469
GO:0045892~negative regulation of transcription, DNA-templated	9	6,444	2,050
GO:1901522~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter involved in cellular response to chemical stimulus	3	119,092	1,554
GO:0003198~epithelial to mesenchymal transition involved in endocardial cushion formation	3	82,448	1,308
KEGG_PATHWAY			
Term	Gének száma	Fold Enrichment	-log10 FDR
hsa05161:Hepatitis B	12	16,266	8,349
hsa05212:Pancreatic cancer	7	21,166	4,534
hsa05220:Chronic myeloid leukemia	7	19,108	4,444
hsa05200:Pathways in cancer	11	5,501	3,701
hsa05223:Non-small cell lung cancer	5	17,548	2,718
hsa04668:TNF signaling pathway	6	11,021	2,718
hsa05210:Colorectal cancer	5	15,850	2,621
hsa05214:Glioma	5	15,119	2,587
hsa04110:Cell cycle	6	9,510	2,557
hsa05218:Melanoma	5	13,841	2,519
hsa04380:Osteoclast differentiation	6	9,002	2,519
hsa05222:Small cell lung cancer	5	11,561	2,318
hsa05215:Prostate cancer	5	11,167	2,316

Term	Gének száma	Fold Enrichment	-log10 FDR
hsa04012:ErbB signaling pathway	5	11,296	2,316
hsa05215:Prostate cancer	5	11,167	2,316
hsa04915:Estrogen signaling pathway	5	9,926	2,173
hsa05164:Influenza A	6	6,777	2,147
hsa05142:Chagas disease (American trypanosomiasis)	5	9,449	2,137
hsa04620:Toll-like receptor signaling pathway	5	9,271	2,126
hsa04931:Insulin resistance	5	9,099	2,116
hsa04024:cAMP signaling pathway	6	5,956	1,979
hsa05205:Proteoglycans in cancer	6	5,896	1,978
hsa04510:Focal adhesion	6	5,725	1,940
hsa04370:VEGF signaling pathway	4	12,888	1,940
hsa04210:Apoptosis	4	12,680	1,935
hsa05160:Hepatitis C	5	7,389	1,888
hsa05211:Renal cell carcinoma	4	11,912	1,888
hsa04520:Adherens junction	4	11,073	1,827
hsa04917:Prolactin signaling pathway	4	11,073	1,827
hsa04630:Jak-STAT signaling pathway	5	6,777	1,811
hsa04932:Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	5	6,508	1,761
hsa04666:Fc gamma R-mediated phagocytosis	4	9,359	1,663
hsa05152:Tuberculosis	5	5,552	1,547
hsa05168:Herpes simplex infection	5	5,370	1,509
hsa04660:T cell receptor signaling pathway	4	7,862	1,492
hsa05231:Choline metabolism in cancer	4	7,784	1,492
hsa05203:Viral carcinogenesis	5	4,794	1,378
hsa04071:Sphingolipid signaling pathway	4	6,551	1,325
hsa04722:Neurotrophin signaling pathway	4	6,551	1,325

10. táblázat: A miR-205 által kódolt célgének funkcionális géndúsulási analízise GO_BP és KEGG adatbázisok alapján. Az analízis a DAVID Tools szoftver segítségével készült.

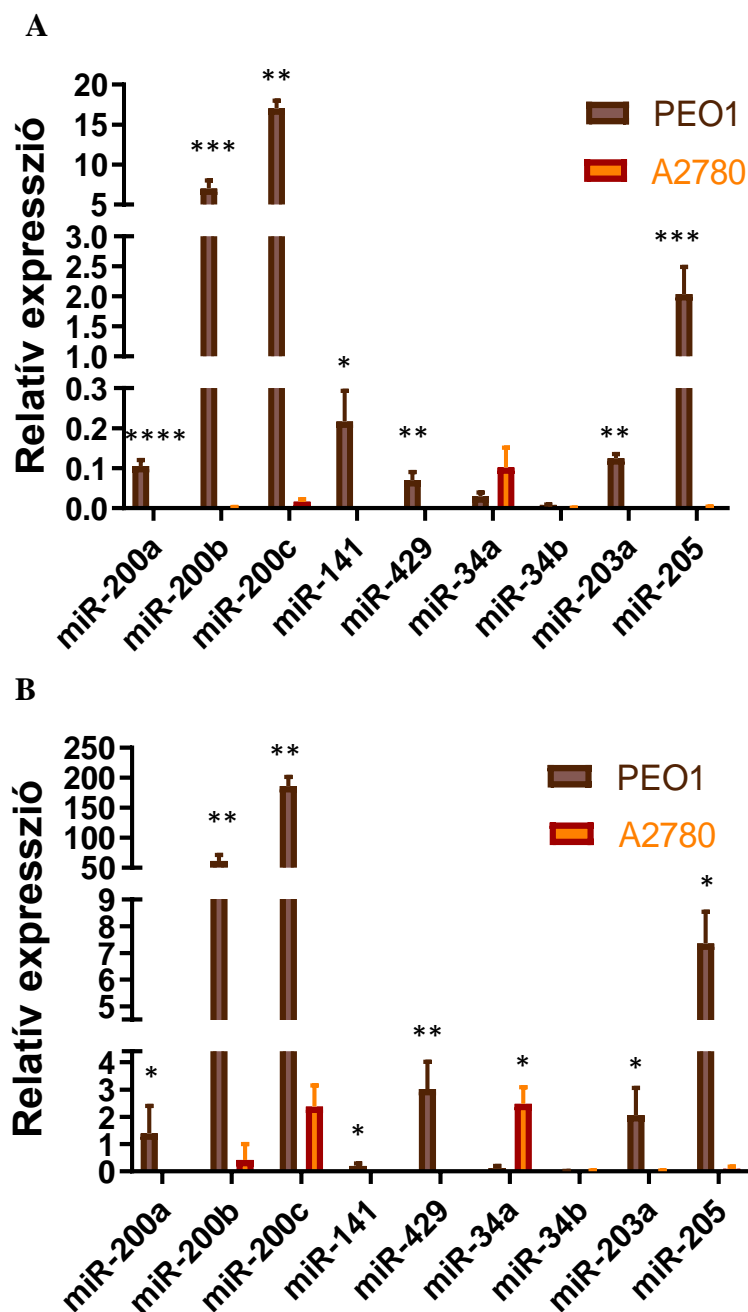
GOTERM_BP			
Term	Gének száma	Fold Enrichment	-log10 FDR
GO:0045944~positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	15	6,939	5,334
GO:0010628~positive regulation of gene expression	8	13,858	3,503
GO:0071456~cellular response to hypoxia	5	23,637	2,173
GO:0043406~positive regulation of MAP kinase activity	4	30,769	1,602
GO:0042493~response to drug	6	8,957	1,429
GO:0006351~transcription, DNA-templated	13	3,018	1,412
GO:0045893~positive regulation of transcription, DNA-templated	7	6,169	1,369
KEGG_PATHWAY			
Term	Gének száma	Fold Enrichment	-log10 FDR
hsa05200:Pathways in cancer	9	5,082	2,295
hsa05215:Prostate cancer	5	12,608	2,034
hsa05219:Bladder cancer	4	21,649	1,985
hsa05205:Proteoglycans in cancer	6	6,657	1,713
hsa05212:Pancreatic cancer	4	13,656	1,528
hsa05161:Hepatitis B	5	7,652	1,485

6.2 A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 expressziójának vizsgálata humán epitéliális ovárium sejt kultúrákban

Munkánk folytatásában megvizsgáltuk a miR-200 és miR-34 család tagjainak, illetve a miR-203a-nak és miR-205-nek az expresszióját humán epitéliális ovárium sejt kultúrákban. Mivel a sejtek miRNS expressziójára nagy befolyást gyakorol az ER α jelenléte emlőrákos sejtvonalakon végzett kísérletek alapján (Klinge, 2012), ezért 2 olyan sejtvonalat választottunk, amelyek különböznek ezen receptor expressziójában. A PEO1 expresszálja az ER α -t, ezáltal ösztrogén szenzitív sejtvonalnak tekinthető (O'Donell és mtsai, 2005). Ezzel szemben az A2780 nem expresszálja ezen receptort, így ösztrogén kezelésre nem reagál korábbi munkák alapján (O'Donell és mtsai, 2005). Az ER α expresszióját a PEO1 sejtvonalban, valamint hiányát az A2780 sejtvonalban RT-PCR-es vizsgálattal megerősítettük vizsgálataink megkezdése előtt (lásd 5.2.1 fejezet).

6.2.1 A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 expressziója a PEO1 és A2780 sejtvonalakban

Első lépésben összehasonlítottuk ezen miRNS-ek alap expresszióját a két sejtvonalban. Amint a 11. ábrán látható, a miR-200 család tagjai, a miR-203a és a miR-205 stabil expressziót mutattak a PEO1 sejtvonalban, melyek közül a miR-200b és miR-200c rendelkezett a legmagasabb expressziós szinttel. Érdeemes megjegyezni azonban, hogy a miR-34a és a miR-34b expressziója alig volt kimutatható (11/A. ábra). Ezzel szemben a miR-200 család tagjainak, a miR-203a-nak és a miR-205-nek az alapexpressziója rendkívül alacsonynak bizonyult az ER α -t nem expresszáló A2780 sejtvonal esetén, ahol a miR-34a mutatta a legmagasabb expressziós szintet (11/A. ábra).



11. ábra: A miR-200 és miR-34 család tagjainak, illetve a miR-203a-nak és miR-205-nek a relatív expressziója a PEO1 és A2780 sejt vonalak A) sejt lizátumaiban, B) felüliszórában. A relatív expresszió meghatározásához a miR-103-t alkalmaztuk referenciaként. A szignifikáns különbségeket a PEO1 és A2780 sejt vonalakban kapott ΔCt értékek között határoztuk meg: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; Student t-teszt.

Mivel a vérmintákkal végzett vizsgálataink során ezen miRNS-ek detektálható szabad expresszióval rendelkeztek, ezért megvizsgáltuk szabad formáik expresszióját a sejtenyészetek esetében is. Ekkor az RNS izolálást a sejtenyészetek felüliszórából végeztük.

Minden vizsgált miRNS detektálható expresszióval rendelkezett a sejtenyészetek felülúszójában. A felülúszó miRNS-tartalma azonban alacsonyabbnak bizonyult a sejtliázumokban megfigyelt expressziós szintekhez képest [ΔC_t (felülúszó-sejtliázum) = $7,9 \pm 1,9$]. Hasonló jelenségről már mások is beszámoltak (Turchinovich és mtsai, 2011). Az alacsonyabb szabad expresszió a referenciaként alkalmazott miR-103 esetében is megfigyelhető volt. Így a relatív expresszió kiszámításakor ugyan magasabb értékeket kaptunk, mint az intracelluláris expresszió esetén, de ez csak az egyes miRNS-ek referencia miRNS-hez viszonyított magasabb arányát jelzi, nem pedig a felülúszó magasabb miRNS tartalmát (11/B. ábra).

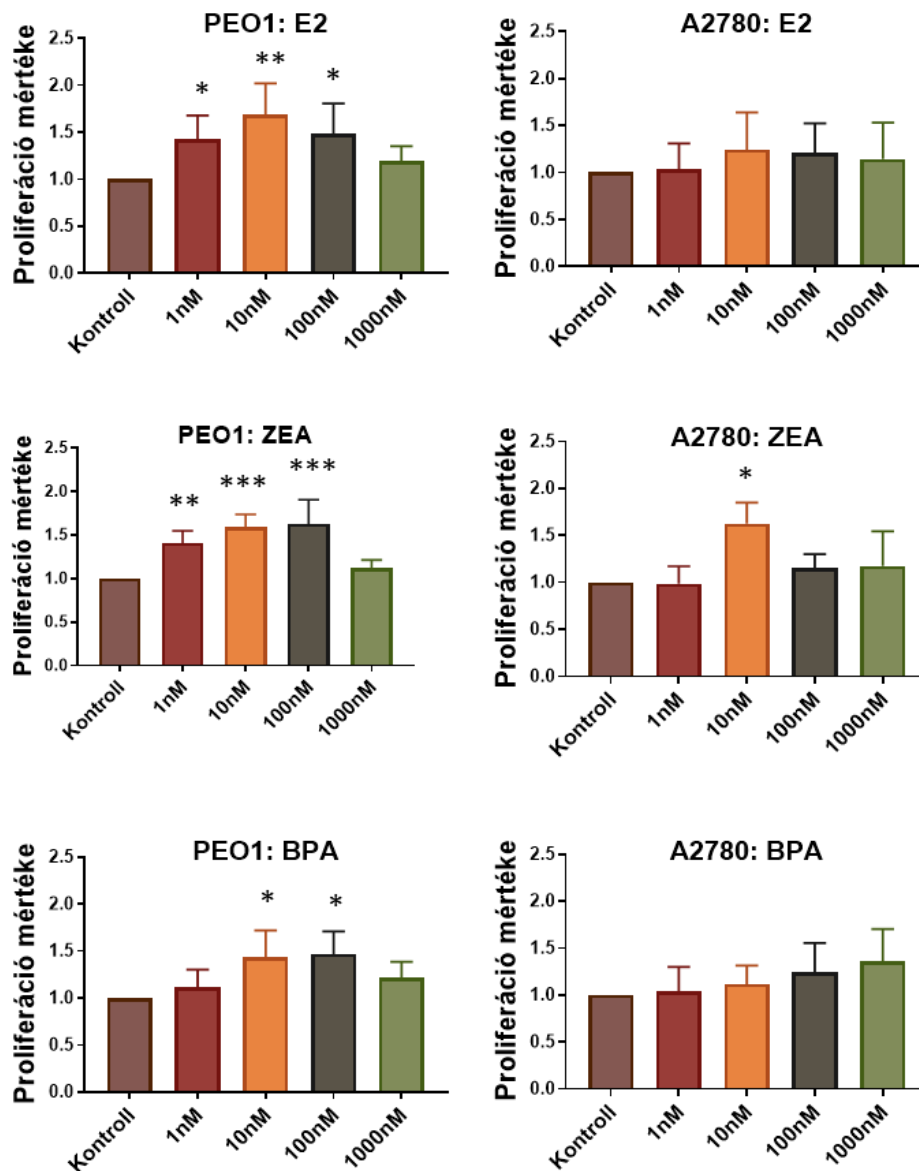
Eredményeink alapján az egyes miRNS-ek esetén tapasztalt relatív expresszió egymáshoz viszonyított aránya hasonlóan alakult az intracelluláris és a szabad miRNS szintek esetében. Ugyanis, az intracelluláris miRNS szintekhez hasonlóan a szabad miRNS-eknél is magasabb expresszió jellemezte a miR-200 család tagjait, a miR-203a-t és a miR-205-t a PEO1 sejtvonalban. A miR-34a expressziója pedig ugyancsak az A2780 sejtvonalnál volt magasabb. Emellett a PEO1 sejtvonalnál szintén a miR-200b és miR-200c expressziója volt a legmagasabb, melyhez viszonyítva a többi miRNS alacsonyabb expressziót mutatott (11. ábra).

A miR-200-asok, a miR-203a és a miR-205 PEO1 sejtvonalban mérhető magasabb expressziós szintje ezen miRNS-ek magasabb biológiai relevanciáját tételezi fel az ösztrogén szenzitív tumorokban, illetve felveti szerepüket az ösztrogének hatásmechanizmusában. Ezen hipotézisünk tesztelése érdekében átfogó vizsgálatot végeztünk, mely során nemcsak ezen miRNS-ek expressziójának változását monitoroztuk ösztrogén hatású molekulákkal való kezelések hatására, hanem a kezelések hatására megfigyelhető fenotípusos és mRNS expresszióban megmutatkozó változásokat is megvizsgáltuk. Továbbá összehasonlítottuk a fiziológias E2 által kiváltott hatásokat a xenoösztrogének indukálta változásokkal, melyhez a ZEA és a BPA molekulákat választottuk.

6.2.2 Az E2, ZEA és a BPA fenotípusra gyakorolt hatásának vizsgálata

Első lépésben fenotípusos vizsgálatokat végeztünk. Itt céljaink között szerepelt a két sejtvonal különböző ösztrogén molekulákkal való kezelésre adott reakciójának összehasonlítása mellett a ZEA és BPA által kiváltott hatások összevetése az E2 indukálta változásokkal. Ekkor a sejteket E2, ZEA és BPA molekulákkal kezeltük, majd a

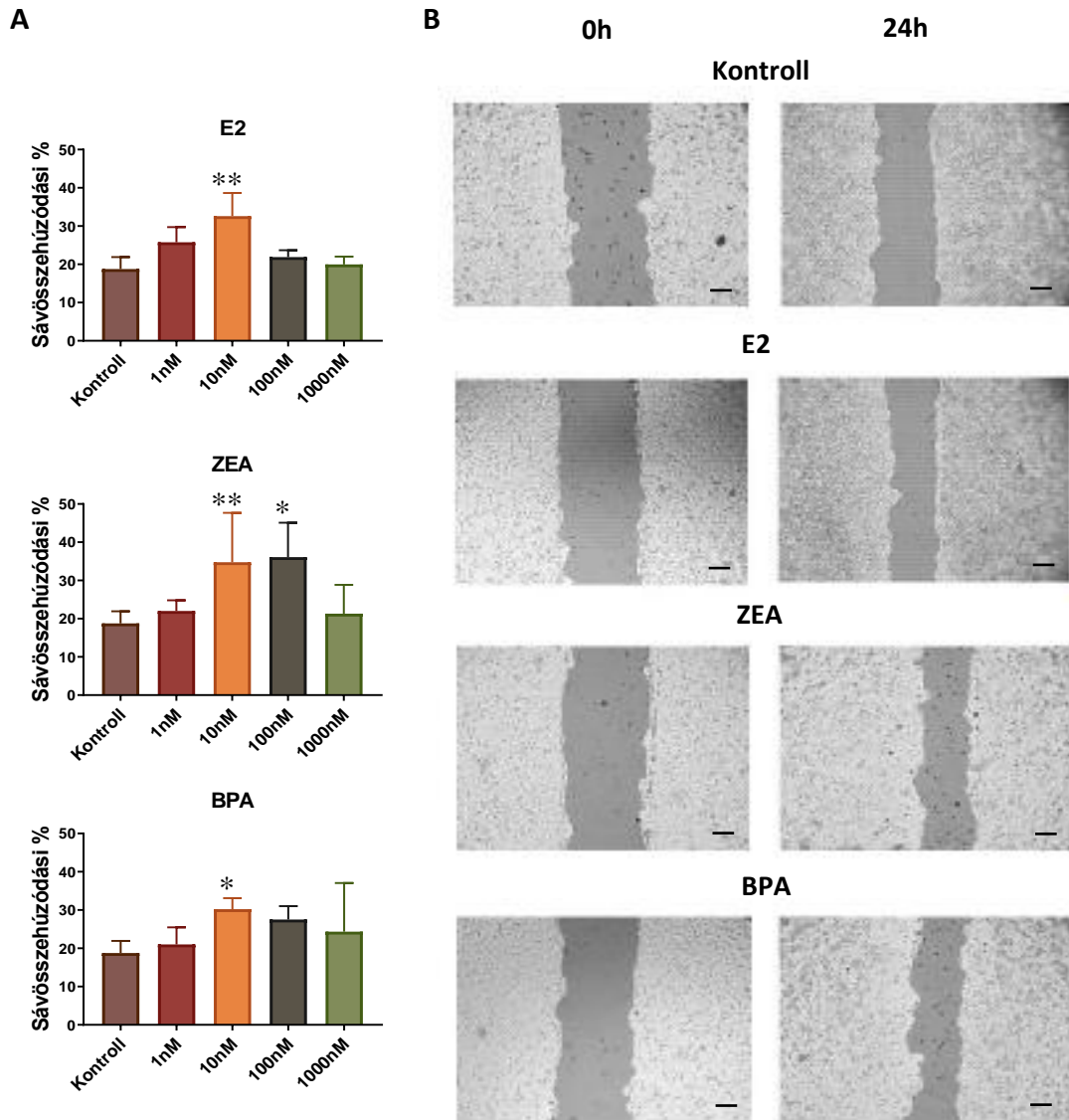
proliferációra, migrációra és sejthalál indukálására gyakorolt hatásukat tanulmányoztuk. A kezeléseket 1-1000 nM koncentráció tartományban végeztük, mely közel áll ezen molekulák fiziológias előfordulásának szintjéhez. A proliferációs vizsgálatok alkalmával a kezelések sejtszám növekedésre gyakorolt hatását határoztuk meg. Eredményeink alapján az E2, ZEA és BPA egyaránt proliferatív hatásúnak bizonyult a PEO1 sejtvonal esetében, ami a sejtszámok kezelés hatására megfigyelhető emelkedésében volt megfigyelhető (12. ábra). Érdekes azonban megemlíteni, hogy az E2 és a ZEA proliferatív hatása markánsabbnak bizonyult, mint a BPA molekuláé, melyek hatása már 1 nM kezelés hatására is megfigyelhető volt. Ezzel szemben a BPA csak a 10-100nM tartományban mutatott némi proliferációt indukáló hatást (12. ábra). Az A2780 sejtvonal esetén a sejtploriferáció szignifikáns emelkedése csupán a 10 nM ZEA-val történő kezelés hatására volt megfigyelhető.



12. ábra: Az E2, ZEA és BPA proliferatív hatása a PEO1 és A2780 sejtvonalakra. Az értékeket a kezelésen át nem esett kontrollhoz viszonyítottuk (1). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; One-way ANOVA, Dunnet's teszt

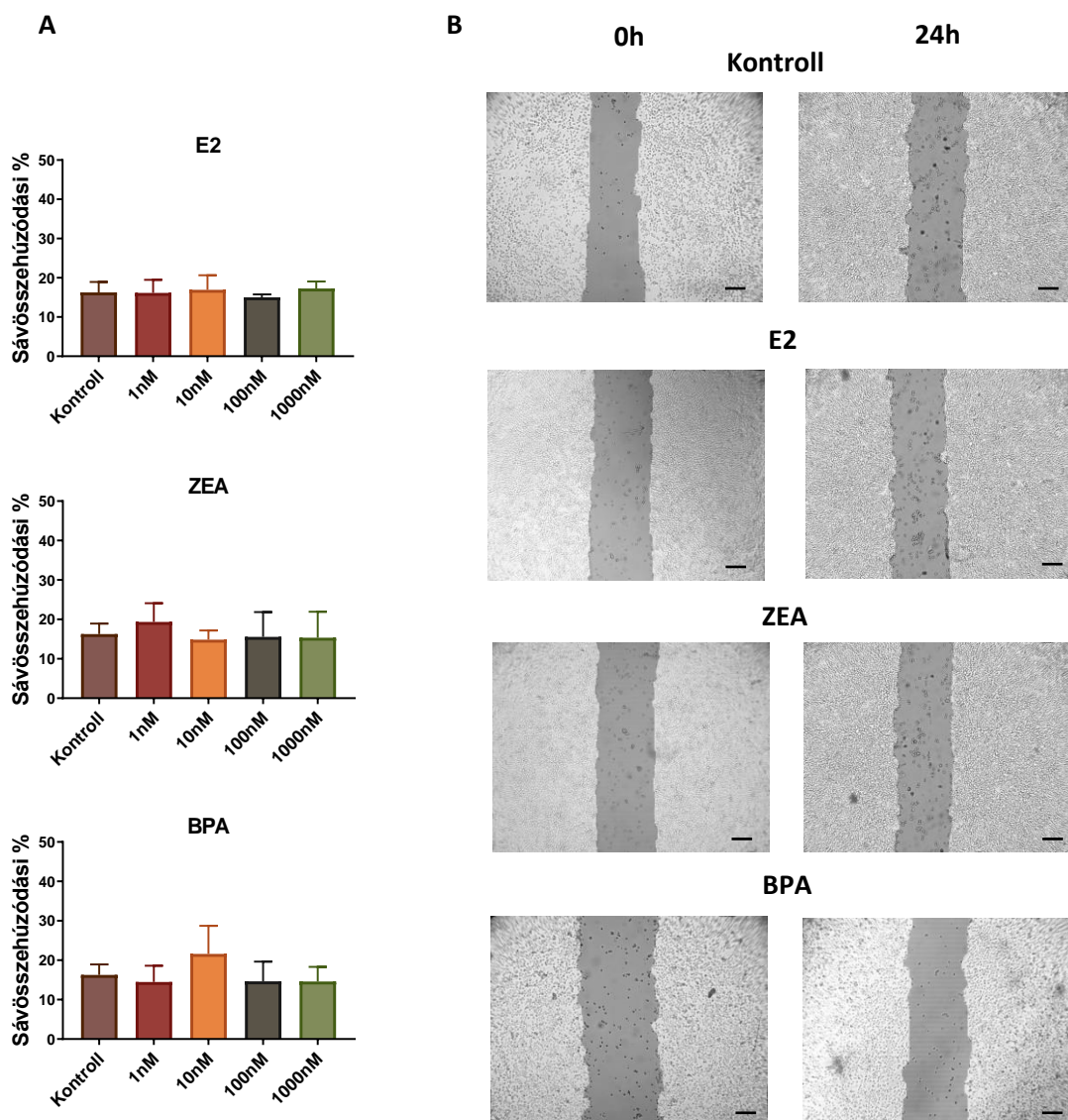
Az E2, ZEA és BPA kezelések migrációs képességre gyakorolt hatását Scratch assay segítségével vizsgáltuk. Ekkor a pázsiton meghúzott sávok összehúzódásának mértéke adott információt a sejtek migrációs képességéről. A kezelésen át nem esett sejtek esetében a sávösszehúzódás mértéke a sávok meghúzását 24h-t követően nem különbözött szignifikánsan a két sejtvonal esetében, mely a PEO1 sejtvonalnál $18,7 \pm 3$ -nak, míg az

A2780 esetében $16,5 \pm 2,6$ -nak adódott. Azonban 48h-val a sávhúzást követően ezen érték az A2780 ($36,1 \pm 5$) sejtvonalnál szignifikánsan magasabb volt, mint a PEO1 sejtvonala esetében ($24,3 \pm 4$).



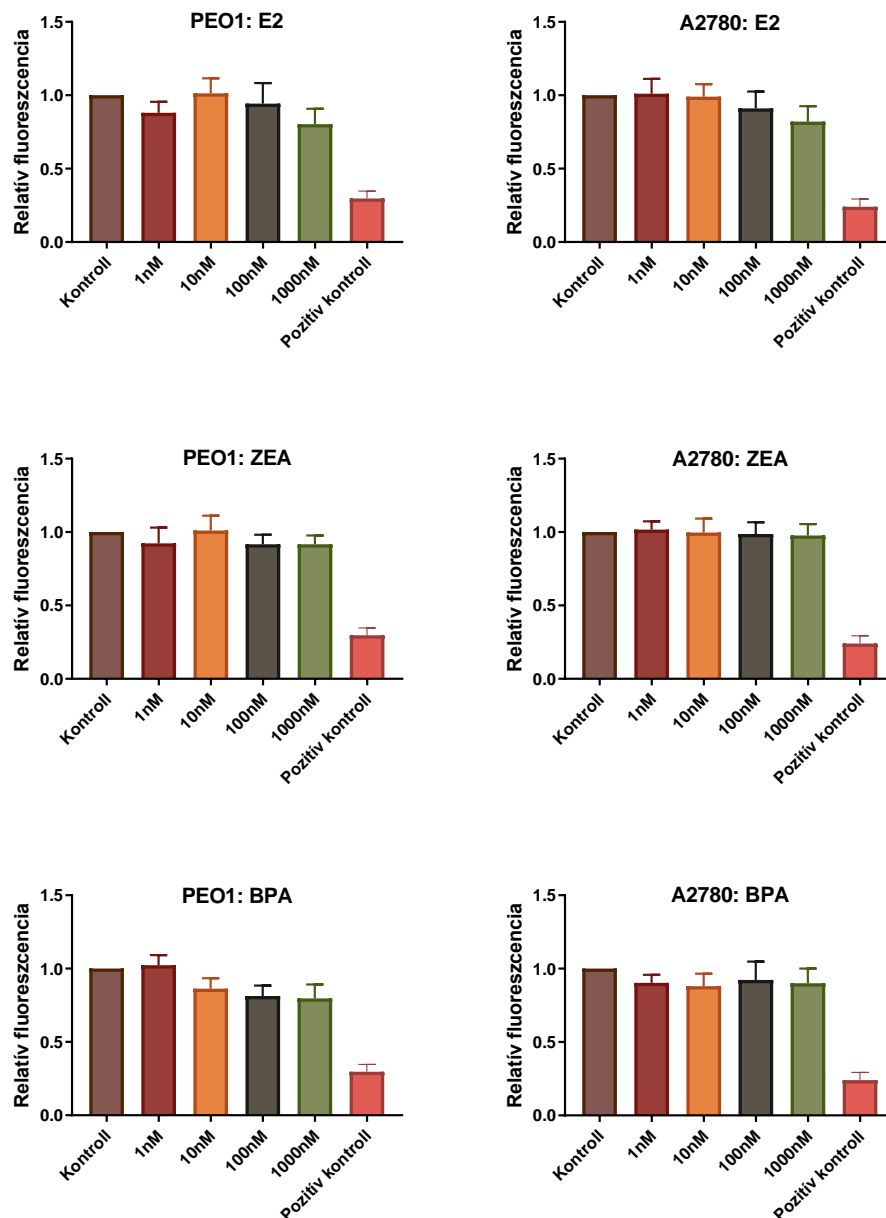
13. ábra: Az E2, ZEA és BPA migrációra kifejtett hatása a PEO1 sejtvonala esetében. (A) A sávösszehúzóási %-os értéke, mely a migrációs intenzitást jelzi. Az egyes kezelések hatását a kezeléssel nem esett kontrollhoz viszonyítottuk * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; One-way ANOVA, Dunnett's teszt (B) Egy Scratch assay kísérlet reprezentatív eredménye 10nM E2, ZEA és BPA molekulával történő kezelés hatására. Bar=100 μ m

Ez egyrészt az A2780 magasabb migrációs képességére enged következtetni, amit már mások is bizonyítottak (Hallas-Potts és mtsai, 2019). Az eredmények jobb összehasonlíthatósága érdekében ezért az E2, ZEA és BPA migráció intenzitására gyakorolt hatását a 24h időpontban hasonlítottuk össze. Ezen vizsgálatok alkalmával az E2, ZEA és BPA is növelte a migráció intenzitását a PEO1 sejtvonalnál, 10 nM koncentrációjú kezelés hatására (13. ábra). A legmigratívabbnak a ZEA bizonyult, mivel itt 100 nM koncentrációban is a migráció intenzitásának szignifikáns emelkedése volt megfigyelhető (13. ábra). Azonban az A2780 sejtvonál esetében ezen molekulák nem növelték szignifikánsan a migráció intenzitását (14. ábra).



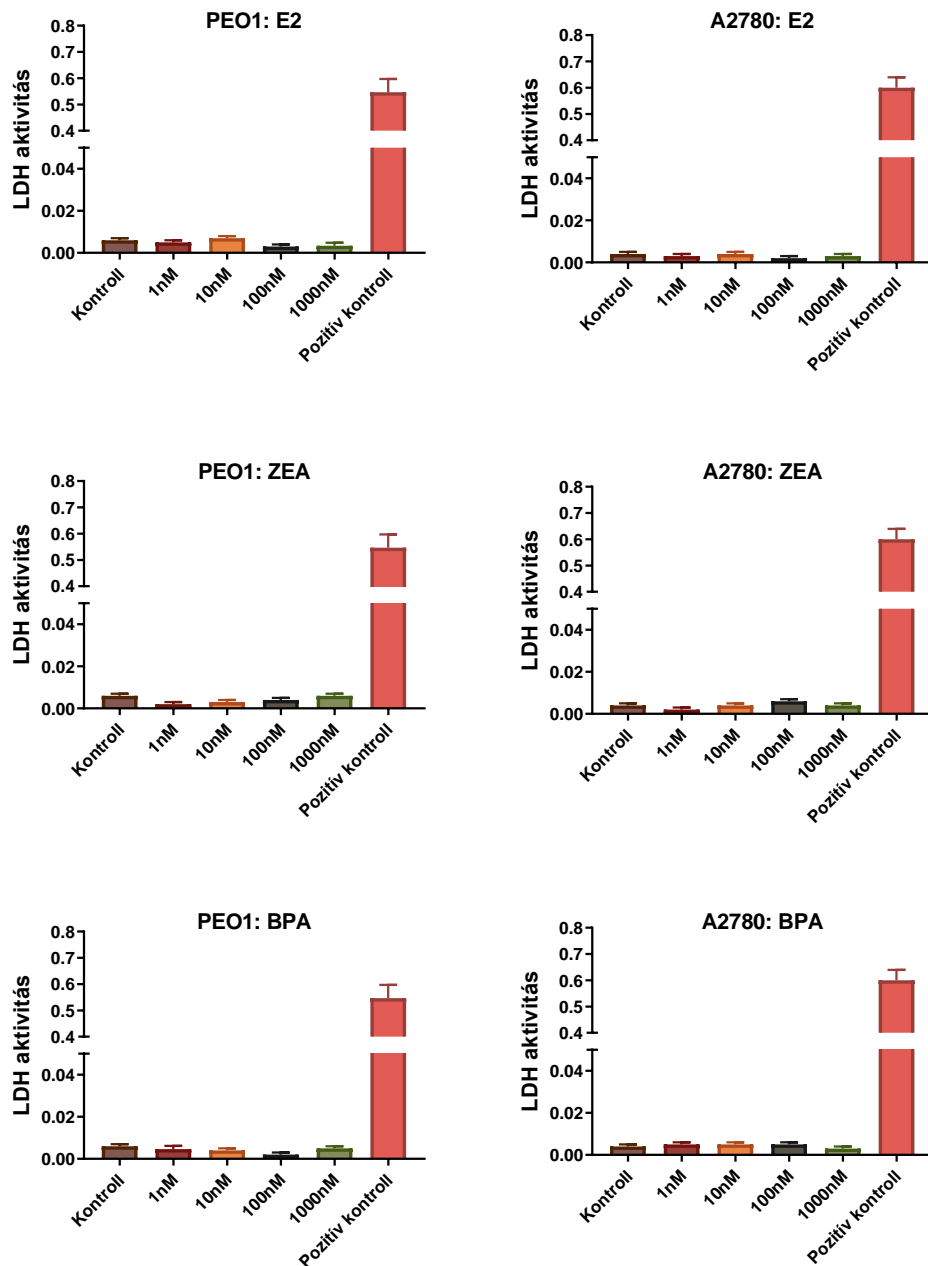
14. ábra: Az E2, ZEA és BPA migrációra kifejtett hatása az A2780 sejtvonál esetében. (A) A sávösszehúzóási %-os értéke, mely a migrációs intenzitást jelzi. Az egyes kezeléseket hatását a kezeléssel nem esett kontrollhoz viszonyítottuk. (B) Egy Scratch assay kísérlet reprezentatív eredménye 10nM E2, ZEA és BPA molekulával történő kezelés hatására. Bar=100µm

Az E2, ZEA és BPA kezelések ovárium sejtekre gyakorolt toxikus hatását az apoptózis és a sejtízis jelenlétével vizsgáltuk. Az apoptózist a mitokondriális membrán potenciál csökkenésével jellemeztük, amelyet DilC1 (5) assay segítségével vizsgáltunk. Eredményeink alapján az E2, ZEA és BPA molekulákkal ezen koncentrációtartományban való kezelések hatására nem volt megfigyelhető a mitokondriális membrán potenciál szignifikáns csökkenése (15. ábra). Ezen eredményünk alapján körülményeink között apoptózis jelenléte nem figyelhető meg egyik sejtvonal esetében sem.



15. ábra: Az E2, ZEA és BPA apoptózist indukáló hatása a PEO1 és A2780 sejtvonalakban. Az értékeket a kezelésen át nem esett kontrollhoz viszonyítottuk (1). A pozitív kontroll esetében az apoptózist CCCP hozzáadásával indukáltuk.

A kezelések hatására esetlegesen bekövetkező citotoxicitást a sejtlízis mértékének a megfigyelésével határoztuk meg. Ekkor a felülúszóban mérhető LDH aktivitásokat határoztuk meg, mely a sejtmembrán károsodására utal. Eredményeink alapján sem a PEO1 sem az A2780 tenyészeteknek felülúszójában nem volt kimutatható LDH aktivitás (16. ábra). Ezen eredmények alapján az ösztrogénkezelések nem bizonyultak toxikusnak a vizsgált sejtvonalakra a kísérleteinkben alkalmazott koncentrációtartományban.

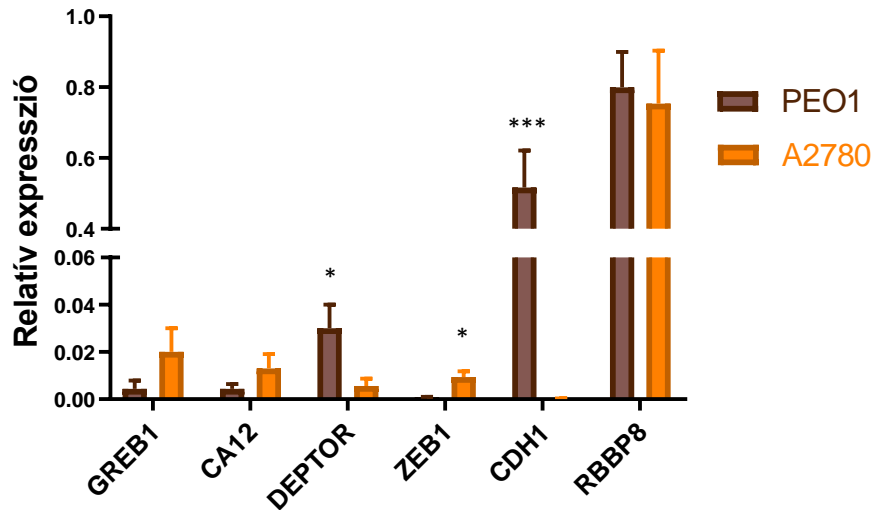


16. ábra: Az E2, ZEA és BPA sejtlízist indukáló hatása a PEO1 és A2780 sejtvonalakban. A pozitív kontroll esetében a sejtek lízisét lízis puffer hozzáadásával indukáltuk.

6.2.3 Génexpressziós vizsgálatok

Munkánk folytatásaként a két sejtvonal ösztrogén érzékenységét, valamint az E2, ZEA és BPA hatását, ösztrogén szenzitív gének expressziójára gyakorolt induktív hatásukon keresztül is összehasonlítottuk. Munkacsoportunk korábbi mRNS szekvenálási adatsorára támaszkodva négy gént választottunk ki ezen vizsgálatainkhoz (Domoszlai, 2021). Ezek a *GREB1*, mely egy erősen ösztrogén szenzitív növekedési regulátor; a *DEPTOR*, amely az *mTORC1* útvonalban működik közre; a *CA12*, amely egy anhidrázt kódol és az *RBBP8*, amely részt vesz a DNS replikáció és a transzkripció szabályozásában, a G1 és G2 ellenőrző pontok működésében és a DNS repair mechanizmusában (Rae és mtsai 2005; Barnett és mtsai, 2008; Soria-Bretones és mtsai., 2013; Cuesta és mtsai., 2019). Ezen gének mindegyike ösztrogén szenzitívnek bizonyult emlőrákos sejtvonalakkal végzett vizsgálatok alkalmával, továbbá expressziójukat petefészekrákban is megerősítették (Hynninen és mtsai, 2006; Foster és mtsai, 2010; Hodgkinson és mtsai, 2018). Megvizsgáltuk továbbá a miR-200 célgénjének számító *CDH1* és a *ZEB1* gének expresszióját is (lásd 3.3.3 fejezet).

Vizsgálataink alapján a *GREB1*, *CA12* és *RBBP8* alapexpressziója nem különbözött a PEO1 és az A2780 sejtvonalakban. Azonban szignifikáns különbséget figyeltünk meg a *DEPTOR*, *CDH1* és *ZEB1* gének alap expressziójában (17. ábra). Ezek közül a *CDH1* és a *ZEB1* gének expressziójában megfigyelhető különbség azért érdekes, mert erősen korrelált a miR-200 családnál ugyancsak megfigyelt expressziós különbséggel. A PEO1 sejtvonal esetében a *CDH1* és a miR-200 magasabb expressziót mutattak, azonban a *ZEB1* expressziója nem volt kimutatható ezen sejtvonalban (17. ábra). Ezzel ellentétben, a *ZEB1* expressziója emelkedett szintet mutatott az A2780 sejtvonalban, azonban a *CDH1* és miR-200 expressziója nehezen detektálhatónak bizonyult (17. ábra). Emellett az A2780 esetén megfigyelt magasabb migrációs képesség szintén jó összefüggést mutat az alacsonyabb *CDH1* expresszióval (14. ábra)



17. ábra: A *GREB1*, *DEPTOR*, *CA12*, *ZEB1*, *CDH1* és *RBBP8* relatív expressziója a PEO1 és A2780 sejtvonalakban. A relatív expresszió meghatározásához a GAPDH-t alkalmaztuk referenciaként. A totál RNS-t a kezelésen át nem esett sejtek sejtizátumaiból izoláltuk. A szignifikanciát a PEO1 és A2780 sejtvonala esetében kapott ΔC_t értékek között határoztuk meg: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Student t-teszt.

Megvizsgáltuk továbbá ezen gének expressziójának változását ösztrogénkezelés hatására is. Ekkor a sejteket 10nM E2, ZEA és BPA kezelésnek vetettük alá, mivel a fenotípusos vizsgálatok alkalmával ezen koncentráció tartományban mindhárom molekulánál erős fenotípusos válasz volt megfigyelhető (12. és 13. ábra). A PEO1 sejtvonala esetén a *GREB1*, *DEPTOR*, *CA12* és *RBBP8* gének expressziója az ösztrogénkezelések hatására szignifikáns emelkedést mutatott, mely gének közül a *GREB1* indukciója volt a legszembetűnőbb (11. táblázat). Megállapítható továbbá, hogy az ösztrogén molekulák közül az E2 indította el a legnagyobb válaszreakciót, melyhez a ZEA hatása hasonló mértékűnek bizonyult. A BPA ezzel ellentétben kisebb mértékű választ indukált (11. táblázat). Fontos továbbá megemlíteni, hogy a *CDH1* gén repressziót mutatott az E2, ZEA és BPA kezelése hatására a PEO1 sejtvonalaiban, ami összefüggésbe hozható ezen molekulák migrációt fokozó képességével (13. ábra, 11. táblázat). Azonban a *ZEB1* expressziójának változása a kezelése hatására nem volt kimutatható a PEO1-ben, ami rendkívül alacsony relatív expressziós szintjével magyarázható. Az A2780 sejtvonala esetében egyik kezelés sem volt hatással a *GREB1*, *DEPTOR*, *CA12*, *RBBP8* vagy *ZEB1* gének expressziójára (11. táblázat). Továbbá a *CDH1* nem detektálható expressziója az ösztrogénkezelés hatására sem mutatott változást.

11. táblázat: A GREB1, DEPTOR, CA12, RBBP8 és CDH1 expressziójának változása E2, ZEA, illetve BPA molekulákkal való kezelések hatására. A relatív expressziós arányt a kezelésem át nem esett kontroll expressziójához viszonyítva adtuk meg (1). Arány > 1 indukciót, arány <1 repressziót jelez, a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A szignifikanciát a kezelt és kezeletlen át nem esett minták ΔCt -értékei között határoztuk meg: * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; Student t-teszt; n.d.-az expresszió mértéke nem detektálható.

	E2		ZEA		BPA	
	PEO1	A2780	PEO1	A2780	PEO1	A2780
<i>GREB1</i>	263,19***	0,76	233,94***	0,79	20,53**	0,58
<i>DEPTOR</i>	5,39*	0,97	15,03*	0,84	3,03*	0,52
<i>CA12</i>	37,01**	0,72	13,45*	0,61	2,79*	0,69
<i>RBBP8</i>	9,58*	0,71	5,21*	0,81	2,13*	0,76
<i>CDH1</i>	0,42*	n.d.	0,18*	n.d.	0,44*	n.d.
<i>ZEB1</i>	n.d.	1,18	n.d.	1,01	n.d.	0,75

6.2.4 A miR-200, miR-203a és miR-205 expressziójának változása ösztrogén kezelés hatására

A továbbiakban megvizsgáltuk a miR-200, miR-203a és miR-205 expressziójának változását E2, ZEA és BPA kezelések hatására a PEO1 sejtvonalban. Mivel a miR-34a és miR-34b expressziója nagyon alacsonynak bizonyult a PEO1 sejtvonal esetében, ezért ezen miRNS-ek expresszióját ezen kísérleteink alkalmával kihagytuk. Továbbá az A2780 sem a fenotípusos, sem a génexpressziós vizsgálatok alkalmával sem bizonyult érzékenynek az ösztrogén kezelésekre, valamint a miR-200asok és miR-203a expressziója sem volt detektálható, ezért ezen sejtvonalat ezen vizsgálatainkból szintén kihagytuk. A sejtvonalat a korábbiakhoz hasonlóan 10 nM E2, ZEA és BPA kezeléseknél vetettük alá. A miRNS-ek expressziójának rövid és hosszú távú változásainak nyomon követése érdekében a méréseket a kezeléseket követően 12, illetve 24h-val is elvégeztük. Eredményeink alapján az E2, ZEA és BPA kezelések időfüggő hatást gyakoroltak a miRNS-ek expressziójára (12. táblázat). Az E2 kezelést 12h-val követően a miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 és miR-203a expressziója szignifikáns emelkedést mutatott. Azonban a 24h időpontban miR-200b és miR-200c expressziójának a csökkenése volt jellemző (12. táblázat). Ezen utóbbi hatás összefüggésbe hozható a CDH1 ezen időpontban szintén megfigyelhető repressziójával, valamint a megemelkedett migrációs képességgel (13. ábra, 11. táblázat). Érdekes módon a

ZEA kezelés hatására kisebb mértékű változások voltak megfigyelhetőek a miRNS expresszióban, mint a BPA kezelés esetében (12. táblázat).

12. táblázat: A miR-200, miR-203a és miR-205 expressziójának változása E2, ZEA, illetve BPA molekulákkal való kezelésekre hatására a PEO1 sejtlizátumában. A relatív expressziós arányt a kezelésen át nem esett kontroll expressziójához viszonyítva adtuk meg (1). Arány > 1 indukciót, arány <1 repressziót jelez, a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A szignifikanciát a kezelt és kezeletlen át nem esett minták ΔCt -értékei között határoztuk meg: * p <0,05; Student t-teszt.

		miR-200a	miR-200b	miR-200c	miR-141	miR-429	miR-203	miR-205
E2	12h	1,52*	2,9*	3,28*	3,32*	1,14	1,73*	1,04
	24h	0,56	0,28*	0,43*	0,95	1,09	0,82	1,02
ZEA	12h	1,29	0,99	1,71*	1,16	0,97	1,27	1,16
	24h	0,22*	0,42*	0,74	0,71	0,64	0,68	1,29
BPA	12h	1,89*	2,91*	2,12*	1,75*	1,85*	1,27	0,58
	24h	0,22*	0,67	1,34	1,29	1,47	0,95	0,62

13. táblázat: A miR-200, miR-203a és miR-205 expressziójának változása E2, ZEA, illetve BPA molekulákkal való kezelésekre hatására a PEO1 sejt felülűszójában. A relatív expressziós arányt a kezelésen át nem esett kontroll expressziójához viszonyítva adtuk meg (1). Arány > 1 indukciót, arány <1 repressziót jelez, a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva. A szignifikanciát a kezelt és kezeletlen át nem esett minták ΔCt -értékei között határoztuk meg: * p <0,05; Student t-teszt.

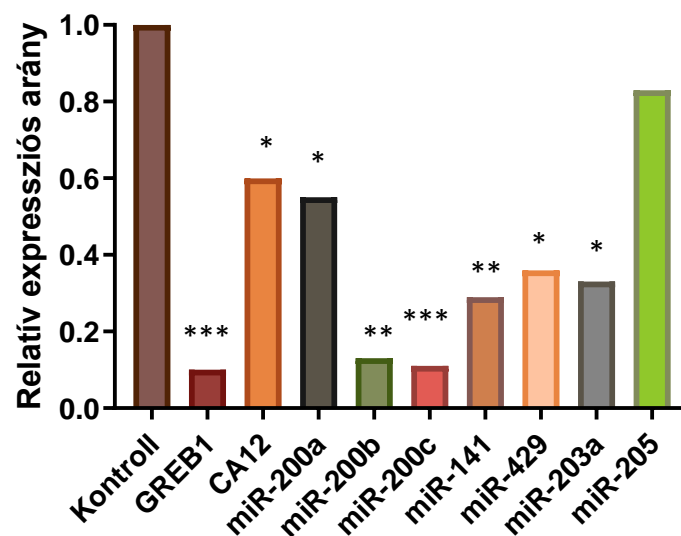
		miR-200a	miR-200b	miR-200c	miR-429	miR-203a	miR-205
E2	12h	0,058*	1,95*	1,38	1,51	0,49*	1,2
	24h	0,042*	1,57*	1,57*	1,01	1,8*	0,81
ZEA	12h	3,29*	1,59*	1,16	1,18	1,19	0,59
	24h	0,08*	0,38*	0,34*	0,44*	0,56	0,64
BPA	12h	1,89*	1,71*	1,94*	1,19	1,64*	1,21
	24h	0,09*	0,36*	0,68	0,69	1,06	0,53

Megvizsgáltuk továbbá az E2, ZEA és BPA kezelésekre a sejten kívüli miRNS-ek expressziójára gyakorolt hatását. A ZEA és BPA kezelésekre hatására az intracelluláris miRNS szinteknél tapasztalt hasonló tendenciát figyeltünk meg - 12 órával a kezelést követően magasabb miRNS expressziót detektáltunk, míg 24 órával később csökkenés volt megfigyelhető (13. táblázat). Az E2 kezelést követően azonban a miR-200b és miR-200c

szabad formáinak expressziója folyamatos emelkedést mutatott a kezeletlen kontrollhoz viszonyítva (13. táblázat).

6.2.5 Az ER α szerepe a miR-200, miR-203a és miR-205 expressziójában

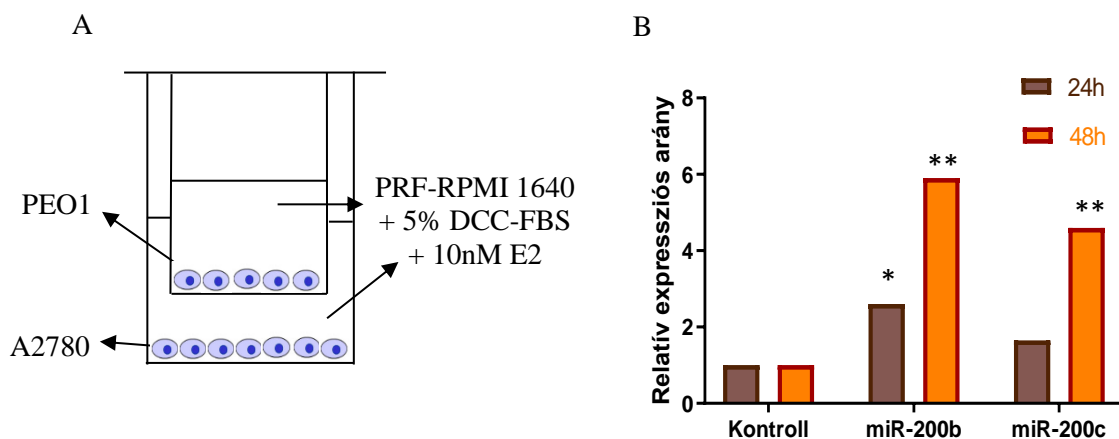
A miR-200, miR-203a és miR-205 PEO1 sejtvonalban mutatott magasabb alap expressziója, valamint a miR-200 és miR-203a ösztrogén kezelések hatására mutatott indukciója felveti az ER α transzkripciójuk szabályozásában betöltött szerepét. Ezen hipotézisünk alátámasztása érdekében megnéztük ezen miRNS-ek expressziójának változását egy ER α szelektív antagonistá, az MPP hozzáadását követően. Pozitív kontrollként az MPP hatását az erősen ösztrogén érzékeny GREB1 és CA12 esetében is meghatároztuk. Eredményeink alapján az MPP adagolása szignifikánsan csökkentette a GREB1 és CA12 gének expressziója mellett a miR-200 és miR-203a expresszióját is (18. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy ezen miRNS-ek transzkripciójában az ER α aktívan közreműködhet. Azonban a miR-205 esetében nem tapasztaltunk hasonló hatást (18. ábra).



18. ábra: A GREB1, CA12, valamint a miR-200 és miR-205 relatív expressziós aránya az ER α antagonistá MPP (metil-piperidino-pirazol) és az E2 hozzáadását követően. A relatív expressziós arányt a csak E2-vel kezelt minták expressziós értékeihez viszonyítva határoztuk meg (1). Arány > 1 indukciót, arány < 1 repressziót jelez, a kontrollhoz viszonyítva. A szignifikanciát a kezelt és kezeletlen át nem esett minták Δ Ct -értékei között határoztuk meg: * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; Student t-teszt

6.2.6 Szabad miRNS-ek környező sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata ko-kultúra segítségével

A vizsgált miRNS-ek közül a miR-200b és miR-200c rendelkeztek a legmagasabb alap expresszióval, amely ezen miRNS-ek erős biológiai relevanciáját tettezi fel az ösztrogén érzékeny tumorokban. Expressziójuk az extracelluláris közegben is magasnak bizonyult. A szabad miRNS-ek biológiai funkciójukat elsősorban a környező sejtekbe való transzportjukon keresztül fejtik ki, mellyel nagy hatást gyakorolhatnak a tumor mikrokörnyezetére. Ezért munkánk lezárásaként ko-kultúra alkalmazásával megvizsgáltuk, hogy a PEO1 sejtvonal által nagy mértékben kibocsátott miR-200b és miR-200c molekulák képesek-e befolyásolni a környező sejtek miRNS szintjeit. Ekkor az A2780 sejtvonal tenyésztetereire egy inzerthe korábban beletapasztott PEO1 sejteket helyeztünk. Így a PEO1-ből származó szabad miRNS-ek szabadon áramolhattak az A2780 tenyésztetei felé. 24 és 48h inkubációt követően az A2780 tenyészteteiben meghatároztuk a miR-200b és miR-200c szinteket. Eredményeink alapján az A2780 sejtvonalban a ko-kultúra alkalmazásának időtartamától függően a miR-200b és miR-200c szintjének emelkedése volt megfigyelhető (19. ábra). Ezáltal tehát valószínűsíthető ezen miRNS-ek környező sejtekbe való bejutásának képessége.



19. ábra: A) A ko-kultúra sematikus ábrázolása. B) A miR-200b és miR-200c relatív expressziós aránya a PEO-1 sejtekkel együtt tenyésztett A2780 sejtekben. A relatív expressziós arányt az együtt tenyésztés nélküli A2780 tenyésztetek expressziós értékeihez viszonyítva határoztuk meg (1). Arány > 1 indukciót, arány < 1 repressziót jelez, a kontrollhoz viszonyítva. A szignifikanciát a kezelt és a nem kezelt minták ΔC_t -értékei alapján határoztuk meg: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

7. Diszkusszió

Bár a petefészekrák több százezer nő halálért felel évente, a betegség kialakulásában szerepet betöltő miRNS molekulákat illetően rendkívül hiányos a szakirodalom. Ezen molekulák megismerése nagy egészségügyi jelentőséggel bír, mivel olyan új biomarkerek azonosításához vezethetnek el, amelyek nagyban segíthetik a petefészekrák hatékonyabb diagnosztizálását lehetővé tevő eljárások kidolgozását. Más tumoros megbetegedésekkel (pl. emlőrák) összehasonlítva az ösztrogén molekulák ovárium sejtekre gyakorolt hatásáról is keveset tudunk, mely molekulák proliferatív hatásuk miatt tumorok kialakulását is elősegíthetik (Yager és mtsai, 2006; Fernandez és Russo, 2010; Samavat és Kurzer, 2015). Jelentőségüket jelzi, hogy az ovárium tumorok nagy hányada rendelkezik az ösztrogén előállítás képességével, ezáltal képes lokálisan magas ösztrogén szint kialakításával saját növekedését elősegíteni (Mungenast és Talhammer, 2014; Ren és mtsai., 2015). Érdeemes megemlíteni továbbá, hogy az ösztrogének és xenoösztrogének karcinogén hatása az alábbi okok miatt egyre nagyobb aggodalomra ad okot. Előreláthatólag egyre több nő fog hormonpótló kezelésben részesülni a jövőben a meddőségi problémák, illetve a várható életkor emelkedése okán (mely a posztmenopauzában eltöltött időt is növeli). Ezen felül a környezet, valamint az élelmiszerek xenoösztrogénekkel való terheltsége is emelkedő tendenciát mutat. Ez egyrészt az egyre nagyobb mértékű műanyagszennyezéssel magyarázható, másrészt a globális felmelegedés miatti klímaváltozás kedvez a mikotoxin termelő fonalgombák növekedésének és mikotoxin termelő képességének, így a jövőben az élelmiszerek mikotoxin (köztük a ZEA) szennyezettségének növekedése várható.

7.1 Szabad miRNS szintek összehasonlítása petefészekrákban szenvedő és egészséges egyének vérmintáiban

Munkánk kezdeti szakaszában beteg és egészséges egyének vérmintáiban detektálható miRNS-eket hasonlítottuk össze ígéretes biomarker jelöltek azonosítása céljából. Ekkor tíz, irodalmi adatok alapján kiválogatott miRNS expresszióját monitoroztuk. A kiválasztott miR-203a, miR-205, valamint a miR-200, és miR-34 családba tartozó miRNS-ek közös tulajdonsága, hogy biológiai funkciójukat tekintve több, a tumorsejtek proliferációjára és invazív képességére hatást gyakorló gén expressziójának a szabályozásában is közreműködnek (Li és mtsai, 2014; Choi és Ng, 2017; Vosgha és mtsai, 2018).

A miR-200 családba tartozó miRNS-ek testfolyadékokban detektálható szintje hatékony biomarkernek bizonyult emlő-, prosztatata-, tüdő-, húgyhólyag- és vastagbélrák esetén (Feng és mtsai, 2014; Liu és mtsai, 2016; Larrea és mtsai, 2016). Eredményeinkkel összhangban, megváltozott expressziójukat petefészekrák esetén is kimutatták tumorszövetekben (Koutsaky és mtsai, 2017; Wen és mtsai, 2021), valamint testfolyadékokban egyaránt (Kan és mtsai, 2012; Gao és Wu, 2015; Kapetanakis és mtsai, 2015; Zuberi és mtsai, 2015; Meng és mtsai, 2016; Halvorsen és mtsai, 2017; Pendlebury és mtsai, 2017; Giannopoulou és mtsai, 2019). Tudomásunk szerint a saját munkánk volt az első tanulmány, amely ezen miRNS-ek szintjét kaukázusi populációban vizsgálta.

A miR-34 családba tartozó miRNS-ek közül a miR-34a és a miR-34b szintén magasabb expressziót mutatott a petefészekrákban szenvedő betegek vérmintáiban, melyek közül a miR-34b rendelkezett jobb diagnosztikai paraméterekkel. Ezen miRNS-ek nagy jelentőségét már emlő-, prosztatata-, húgyhólyag és idegrendszeri tumorok esetén is leírták, valamint a miR-34a-t ígéretes terápiás molekulaként tartják számon (Li és mtsai, 2014). A miR-34a és miR-34b testfolyadékokban mérhető szintje magasabbnak adódott emlő-, tüdő és prosztatarák esetében (Lodes és mtsai, 2009; Roth és mtsai, 2010, 2011). Megváltozott expressziójukat petefészek tumorok esetében is kimutatták (Iorio és mtsai, 2007; Zhang és mtsai, 2008; Lee és mtsai, 2009; Corney és mtsai, 2010; Schmid és mtsai, 2016; Welponer és mtsai, 2020). Testfolyadékokban mérhető szintjüket illetően azonban hiányos a szakirodalom. Egyedül a miR-34a és miR-34c expressziójáról áll rendelkezésre információ (Ayaz és mtsai, 2014; Giannopoulou és mtsai, 2019; Maeda és mtsai, 2020), azonban a miR-34c vizsgálataink során nem bizonyult megbízható markernek.

A miR-203a esetében szintén magasabb expressziót detektáltunk a betegektől származó plazma mintákban. Ezen miRNS megváltozott expresszióját tapasztalták melanómában, valamint emlő-, vastagbél- és prosztatarákban is (Shao és mtsai, 2017). Ezen felül emelkedett expressziója volt jellemző emlő- és vastagbélrákban szenvedő betegek testfolyadékaiban (Hur és mtsai, 2015; Madhavan és mtsai, 2016). Petefészek tumorokban szintje szintén a normálistól való eltérést mutatott (Iorio és mtsai, 2007; Lee és mtsai, 2009; Wyman és mtsai, 2009; Wang és mtsai, 2013; Azizmohammadi és mtsai, 2016). Azonban testfolyadékokban jellemző expresszióját illetően rendkívül hiányos a szakirodalom (Giannopoulou és mtsai, 2019). Rosszindulatú petefészek elváltozással rendelkező betegek vérplazmájában emelkedett szintet mutatott, ha jóindulatú elváltozással rendelkező egyének

mintáival hasonlították össze (Taylor és Gercel-Taylor, 2008). Azonban tudomásunk szerint a mi munkánk az első, amely egészséges egyénektől származó mintákat használt kontrollként.

MiR-205 expressziója szintén szignifikánsan magasabbnak adódott a beteg mintákban. A miR-205 központi szerepét emlő-, endometrium-, prosztata-, tüdő-, hólyag-, pajzsmirigy- és vastagbél rákban is bizonyították (Gottardo és mtsai, 2007; Lebanony és mtsai, 2009; Wu és mtsai, 2009; Boll és mtsai, 2013; Dong és mtsai, 2015; Chauhan és mtsai, 2020; Wang és mtsai, 2020). Testfolyadékokban emelkedett szintet mutatott glioblasztóma, emlő-, hólyag-, tüdő-, és hasnyálmirigyrák esetén (Wang és mtsai, 2014; Fang és mtsai, 2016; Stromek és mtsai, 2017; Chauhan és mtsai, 2020) Eredményeinkkel összhangban, petefészekrákban szenvedő betegek esetében szintén emelkedett expressziót mutatott korábbi publikációkban is (Zheng és mtsai, 2013; Wang és mtsai, 2019). Bár ezen miRNS diagnosztikai paraméterei alacsonyabbak, mint a többi vizsgált miRNS esetén tapasztaltak, de mindenképp érdemes ezen miRNS nagyobb mintaszámon történő további vizsgálata.

Megvizsgáltuk továbbá a diagnosztikai paramétereik alapján ígéretesnek mondható miRNS jelöltek, illetve a hagyományosan alkalmazott CA125 és HE4 biomarkereken alapuló diagnosztikai tesztek közötti egyezést is. A kapott Cohen kappa értékek alapján elmondható, hogy a miRNS-eken alapuló tesztek jó egyezést mutattak egymással. Azonban az ezen molekulákon alapuló tesztek CA125-el való egyezése kifejezetten alacsonynak bizonyult. A HE4 és a miR-200b, valamint miR-200c közötti egyezés ezzel ellenben közepesnek adódott. Érdeemes megemlíteni, hogy a CA125 és a HE4 közötti egyezés ugyancsak közepesnek bizonyult. A különböző biomarkereken alapuló tesztek közötti nem tökéletes egyezés oka valószínűsíthetően az alábbi tényekre vezethető vissza: 1) sem az általunk azonosított miRNS-ek, sem a CA125 és HE4 markerek diagnosztikai paraméterei nem tökéletesek (Montagnana és mtsai, 2017); 2) a munkánk során alkalmazott alacsony mintaszám torzíthatta eredményeinket. Valószínűsíthetően ezzel magyarázható, hogy a szakirodalom is rendkívül ellentmondásos a miRNS-ek és a CA125 közötti korrelációt illetően. Egyes publikációk alapján a testfolyadékokban mérhető miRNS szintek alacsony korrelációt mutatnak a CA125 szintjével (Resnick és mtsai, 2009; Kapetanakis és mtsai, 2015). Míg mások pozitív korrelációra utalnak (Meng és mtsai, 2015, 2016). Fontos azonban megjegyezni, hogy az egyes biomarkerek között megfigyelhető nem tökéletes – de legalább közepes - korreláció nem feltétlenül hátrány, hiszen ezek kombinálásán alapuló diagnosztikai tesztek alkalmazásával jobb lefedés érhető el, ezáltal pedig hatékonyabb diagnózis állítható fel. A

klínikai gyakorlatban már bevezetésre került a CA125 és HE4 kombinálásán alapuló ROMA indexen alapuló diagnosztika, mely teszt ezen markerek mellett a beteg menopauzális státuszát is figyelembe veszi (Cui és mtsai, 2019; Aslan és mtsai, 2020). Azonban a CA125 és/vagy HE4 szabad miRNS-ekkel való kombinálásán alapuló diagnosztikai tesztekben is nagy a potenciál, melyek több tanulmányban is nagyobb hatékonyságot mutattak, mint az egyedüli markereken alapulók (Elias és mtsai, 2017; Montagnana és mtsai, 2017; Ren és mtsai, 2018; Shah és mtsai, 2018). Eredményeink alapján a miR-200b és miR-200c HE4-el való kombinálása akár ígéretes jövőbeli stratégia lehet, de a többi, jó diagnosztikai paraméterekkel rendelkező miRNS (pl.: miR-200a, miR-203a, miR-34b) is ígéretes jelöltek lehetnek a jövőben a hasonló többváltozós diagnosztikai tesztek fejlesztéséhez. Ezért mindenképp érdemes ezen miRNS-ek nagyobb mintaszám bevonásával való további tesztelése.

Megvizsgáltuk továbbá a vizsgált miRNS-ek között fennálló funkcionális kapcsolatot, amelyhez a vérplazmában mérhető expressziós szintjük között mutatott korrelációt, valamint a közösen szabályozott célgének számát használtuk fel. Itt érdekes, korábban nem tapasztalt összefüggést figyeltünk meg. Azon miRNS-ek expressziós szintje közötti korreláció adódott magasabbnak, amelyek több közös célgénen osztoztak. Erős pozitív korrelációt kaptunk a miR-200 család tagjai között, melyek közül kiemelném a miR-200b és miR-200c közötti erős korrelációt, valamint a közösen szabályozott célgének számát. A miR-34 család esetében szintén hasonló jelenséget tapasztaltunk, ahol a miR-34a jobban korrelált a miR-34b-vel, mint a miR-34c-vel, mely utóbbi miRNS-el nem rendelkezik közös célgénnel. Mivel ezen miRNS-ek egy jelentős része exoszómákba csomagoltan van jelen a testfolyadékokban, melyek kibocsátása aktív transzport folyamatok eredménye (Bayraktar és mtsai, 2017), ezért fennáll annak a biológiai lehetősége, hogy a hasonló funkcióval rendelkező miRNS-ek expressziójának szabályozása összekapcsolódik. Ezen jelenség alaposabb vizsgálata érdekében munkánk folytatásaként megvizsgáltuk ezen miRNS-ek expresszióját humán epitéliális ovárium sejt kultúrákban is.

7.2 A miR-200, miR-34, miR-203a és miR-205 expressziójának vizsgálata humán epitéliális ovárium sejt kultúrákban

A vizsgált miRNS-ek petefészekrákban betöltött biológiai relevanciájának megismerése érdekében, első lépésben bioinformatikai analízist végeztünk az adatbázisokban rendelkezésünkre álló információkat felhasználva. Keresésünk eredményeként, a miR-200,

miR-34, miR-203a és miR-205 célgénjei is több, sejtproliferációhoz és migrációhoz köthető folyamatban is dúsulást mutattak. Ezen miRNS-ek közül a miR-203a célgénjei, valamint a miR-34 család tagjai által közösen szabályozott gének mutatták a legerősebb dúsulást a különböző ráktípusok kialakulásához köthető folyamatokban.

Az ovárium sejtekben megfigyelhető biológiai relevanciájuk feltérképezése érdekében megvizsgáltuk ezen miRNS-ek expresszióját humán epitéliális ovárium sejt kultúrákban is. Első szembetűnő megfigyelésünk, hogy a miRNS-ek expressziója erősen függött az ösztrogén válaszban központi jelentőséget betöltő ER α jelenlététől. A miR-200 - különösen a miR-200b és miR-200c - a miR-203a, és a miR-205 szignifikánsan magasabb expressziót mutattak az ER α -val rendelkező sejt vonalban, azonban a miR-34a expressziója ezen sejt vonalban alacsonynak bizonyult. A miRNS expresszió ER α -tól való függését már emlőrákos sejt vonalak esetén is bizonyították (Iorio és mtsai, 2007; Klinge, 2012). Érdeemes továbbá megemlíteni, hogy a miR-200 és miR-205 szintén magasabb expressziót mutattak ER pozitív endometrium daganatokban (Dong és mtsai, 2015). Ez alapján feltételezhető ezen miRNS-ek ösztrogének karcinogénitálásában, valamint az ösztrogén pozitív petefészekrák patofiziológiájában betöltött nagy biológiai relevanciája. Ezt bizonyítja továbbá, hogy a bioinformatikai elemzésünk során a miR-200 és miR-203a célgénjeinek dúsulása figyelhető meg a „GO:0032355~response to estradiol” és a „hsa04915: Estrogen signaling pathway” útvonalakban. Ezért a továbbiakban megvizsgáltuk, hogyan változik ezen miRNS-ek szintje ösztrogén kezelés hatására. Vizsgálatainkat egyben felhasználtuk, a ZEA és BPA által kiváltott válasz, E2 hatásával való összehasonlításához is.

Vizsgálataink alapján az E2, a ZEA és a BPA egyaránt képesek voltak a sejtproliferáció, valamint a migráció intenzitásának növelésére. Mivel e hatásuk csak az ER α -t expresszáló sejt vonalban érvényesült, feltehetően hatásukat elsősorban ezen receptor közvetítésével fejtik ki, mely összhangban van korábbi irodalmi adatokkal (Zinedine és mtsai, 2007; Frizzell és mtsai, 2011; Rochester, 2013). Az E2 szintén proliferatív és migratív hatással rendelkezett számos, az ER α -t expresszáló ovárium sejt vonalon korábbi vizsgálatok alkalmával, beleértve az általunk vizsgált PEO1 sejt vonalat is (O'Donell és mtsai, 2005; Li és Durbin, 2009; Andersen és mtsai, 2017). Azon megfigyelésünk, hogy a kiválogatott, ösztrogénekre érzékeny gének (*GREB1*, *CA12*, *DEPTOR*, *RBBP8*) erős indukciót mutattak az E2 kezelés hatására a PEO1 sejt vonalban, szintén alátámasztja, hogy a megfigyelt fenotípus az E2 által indukált génextpressziós változásoknak köszönhető. Sem a fenotípusos, sem a gén

expresszióban megmutatkozó hatás nem volt megfigyelhető az A2780 sejtvonalonban. Eredményeinkkel összhangban, a ZEA és a BPA szintén képes volt a sejtproliferáció és a migráció indukálására más sejtvonalakban is (Ptak és mtsai, 2014; Kowalska és mtsai, 2018; Wang és mtsai, 2018; Zhang és mtsai, 2018). Munkánk jelentőségét növeli, hogy humán ovárium sejtekre gyakorolt hatásukat illetően rendkívül hiányos a szakirodalom. Fenotípusos és génextpressziós vizsgálataink egyaránt azt mutatják, hogy a ZEA hasonló mértékű hatás kiváltására képes, mint az E2. Bár a BPA-val történő kezelés szintén szignifikánsan indukálta a sejtek proliferációs és migrációs képességét, azonban e molekula hatása kisebb mértékűnek bizonyult (12. és 13. ábra). Érdeemes megemlíteni, hogy a PEO1 sejtvonalon ZEA-ra és BPA-ra mutatott válasza már fiziológiailag releváns dózisosokban is megfigyelhető volt (Takeuchi és mtsai, 2002; Ren és mtsai, 2015; Pajewska és mtsai, 2018). Ezért mindenképp szükséges e molekulák hatásának pontosabb feltérképezése a jövőben.

A miR-200-asok és a miR-203a expressziója szintén változást mutatott az E2, ZEA és BPA kezelések hatására, mely erősen függött a vizsgálat időtartamától. Az E2 kezelést követően ezen miRNS-ek gyors indukciója volt jellemző, melyet represszió követett a későbbi időpontban. Ez jó összefüggésben van korábbi tanulmányok eredményeivel, melyekben hasonló mechanizmus volt megfigyelhető emlőrákos sejtvonalakon (Bhat-Nakshatri és mtsai, 2009; Klinge, 2015). A BPA és a ZEA hatása a miRNS-ek expressziójára korábban már megerősítést nyert több sejtvonalon esetén is (Avisar-Whiting és mtsai, 2010; Klinge, 2015; Reed és mtsai, 2018; Sabry és mtsai, 2019; Wang és mtsai, 2019). Megfigyeléseink alátámasztják továbbá azon korábbi feltételezésünket, hogy a miR-200 család tagjai, valamint a miR-203a szerepet tölthetnek be ezen molekulák hatásmechanizmusában. Ovárium sejtekben betöltött pontos funkciójuk megismerése további vizsgálatokat igényel. Érdeemes azonban megemlíteni, hogy a miR-200b és miR-200c, ösztrogén válaszban betöltött jelentőségét emlőrákos sejtvonalakon végzett kísérletekben már bizonyították, ahol expressziójuk mértéke meghatározó volt a tamoxifénnel szembeni rezisztencia kialakításában is (Manavalan és mtsai, 2013; Gao és mtsai, 2019). Eredményeink feltételezik továbbá az ER α szerepét ezen miRNS-ek transzkripciójának szabályozásában. Ezt alátámasztja azon megfigyelésünk, hogy az E2 induktív hatása visszaszorítható egy ER α szelektív antagonistá adagolásával. Ezen felül a miR-200a, miR-200b és miR-429 miRNS-eket kódoló klaszter regulációs régiójában valószínűsíthető az ER α bekötődése endometrium és emlőrákos sejtvonalakból származó Chip-seq adatok alapján (Márton és mtsai, 2020). Ezzel ellenben a miR-205 – mely miRNS szintén magasabb expressziót mutatott a PEO1 sejtvonalonban – nem

ragált az ösztrogénnel történő kezelésre, valamint az MPP hatására. Ezen miRNS, ösztrogén szenzitív sejtekben való jelentősége valószínűsíthetően azzal hozható összefüggésbe, hogy részt vesz az ESSRG (Estrogen related receptor γ) szabályozásában, mely endometrium sejtekben bizonyítottak (Su és mtsai, 2013). Érdeemes megjegyezni továbbá, hogy bár a szakirodalom (Di Leva és mtsai, 2014; Wang és mtsai, 2014), illetve a bioinformatikai keresésünk alapján a miR-34 tumoros folyamatok kialakulásában betöltött jelentősége nagyobbnak tekinthető, mint a miR-200 családé, azonban sejt kultúrákkal végzett vizsgálataink alapján a petefészekrákban betöltött jelentőségük feltehetően alacsony.

Felhívnam továbbá a figyelmet egy további érdekes összefüggésre. A miR-200, PEO1 sejtvonalban mutatott magasabb alap expressziója jó korrelációt mutatott a magas *CDHI* és detektálhatatlanul alacsony *ZEB1* expresszióval. Ezzel ellentétben az A2780 sejtvonal esetében az alacsony miR-200 expresszió magasabb *ZEB1* és alacsonyabb *CDHI* expressziót eredményezett, valamint fokozottabb migrációs képességgel párosult (14. és 17. ábra). Ezen megfigyelésünk azzal hozható összefüggésbe, hogy a miR-200-asok a *ZEB1*-re gyakorolt befolyásukon keresztül hatást gyakorolnak a *CDHI* expressziójára, valamint az EMT folyamatára (Koutsaki és mtsai, 2014). Hasonló jelenséget más sejtvonalakban is megfigyeltek már korábban (Park és mtsai, 2008). Ezen felül a miR-200 expressziójának, 24h-val a kezelést követően megfigyelhető csökkenése hozzájárulhatott a szintén csökkenő *CDHI* expresszióhoz, valamint a migráció fokozódásához a PEO1 sejtvonalban (13. ábra; 11. és 12. táblázat).

Ugyan a szabad miRNS-ek biológiai funkcióját/jelentőségét illetően rendkívül hiányos a szakirodalom, azonban általánosan elfogadott tény, hogy fontosak lehetnek a tumor mikro környezetének meghatározásában (Muralidharan-Chari és mtsai, 2010; Ingenito és mtsai, 2019; Kogure és mtsai, 2019). A legmagasabb sejten belüli és kívüli expresszió a miR-200b és miR-200c molekulákat jellemezte, amely miRNS-ek expressziója egyébként a vérmintákkal végzett vizsgálataink során is erős korrelációt mutattak. Ezáltal ezen miRNS-ek feltehetően nagy biológiai relevanciával rendelkeznek az ösztrogén szenzitív ovárium tumorok fiziológiájának meghatározásában. Ko-kultúras vizsgálataink során bizonyítottuk, hogy ezen miRNS-ek képesek hatást gyakorolni a környező sejtek miRNS szintjeire. A miR-200b és miR-200c, sejtek fenotípusára gyakorolt hatását számos sejt típuson bizonyították (Dyckhoorn és mtsai, 2009; Yang és mtsai, 2012; Carter és mtsai, 2019). Ezek közül kiemelném, összefüggésbe hozták őket többek között a tumorsejtek eliminálást végző

immunfolyamatok blokkolásával, például az MDSC (Myeloid-derived suppressor cells) sejtek immunszuppresszív tulajdonságának fokozásán keresztül (Mei és mtsai, 2015). Érdemes kiemelni, hogy kísérleti körülményeink között nem volt apoptózis, vagy nekrozis megfigyelhető, így ezen miRNS-ek sejten kívüli megjelenése feltehetően nem a sejthalál következtében bekövetkező passzív kiáramlás következménye. Ezzel összefüggésben ezen szabad miRNS-ek nagyrésze feltehetően exoszómákban van jelen a betegek testfolyadékaiban (Taylor és Gercel-Taylor, 2008). Mindez megerősíti ezen miRNS-ek transzportjának szabályozásának lehetőségét.

Másrészről a miR-200 és az ER α expresszió közötti kapcsolat egy ígéretes jövőbeli felhasználási területet vet fel. Habár az ER α feltehetőleg fontos szerepet tölt be az ovárium tumorok kialakulásában, az ösztrogén választ blokkoló ágensek (pl. tamoxifén) terápiás alkalmazása mégsem váltotta be a hozzá fűzött reményeket (Voutsadakis, 2016; Langdon és mtsai, 2020). Ennek fő oka, hogy az ovárium tumorok ösztrogén érzékenysége különböző lehet, és jelenleg nem áll rendelkezésre erre specifikus biomarker, mivel az ER egyedüli megléte még nem jelenti, hogy a sejt valóban érzékeny az ösztrogénekre – ezáltal pedig reagál az ösztrogén blokkolókra (Voutsadakis, 2016; Langdon és mtsai, 2020). Feltételezésünk szerint a miRNS-ek hatékony markerek lehetnek erre a célra, melyek közül a miR-200b lehet a legideálisabb jelölt, mivel: 1) erős relatív expresszió jellemezte ösztrogénekre érzékeny sejtekben (11. ábra); 2) intra-, és extracelluláris expressziója egyaránt reagált az E2 kezelésre (12. és 13. táblázat); 3) transzkripciója feltehetően az ER α szabályozása alatt áll (Márton és mtsai, 2020); 4) jól detektálhatónak bizonyult vérmintákban, és jó diagnosztikai paraméterekkel rendelkezett (9. ábra, 4. táblázat).

Munkánk jelentőségét növeli továbbá, hogy vérmintákban megfigyelhető miRNS expresszió mellett sejtkultúrákban detektálható intracelluláris és szabad miRNS szintekről is egyaránt információt szolgáltat. Ez azért fontos, mivel a miRNS-ek folyadék biopsziában való alkalmazásának korlátja elsősorban az alkalmas biomarker jelöltek azonosítása jelentette kihívás akadályozza. Hagyományosan e célból, betegektől származó tumor és/vagy vérminták miRNS expresszióját hasonlítják össze, mely módszer több szempontból sem elegendő. Egyrészt a tumorszövetek miRNS expresszióját nagyban torzítja az ovárium tumorokra nagymértékben jellemző heterogenitás, másrészről a tumorban jellemző miRNS expresszió viszonyítása legtöbbször nem egészséges szövethez történik (mely korlátozott mennyiségben áll rendelkezésre), hanem a tumor egészségesnek vélt részeihez, jóindulatú tumorokból

származó mintákhoz, vagy sejtkultúrákból származó eredményekhez. Többek között ezzel magyarázható, hogy számos miRNS tumor szupresszor vagy onkogén besorolását illetően – mely elsősorban a tumorokban megváltozott expresszióján alapul – mai napig ellentmondásos a szakirodalom. A testfolyadékokban mérhető miRNS expresszió monitorozása jó alternatíva az előbb említett problémák kiküszöbölésére, mivel a minta egészséges egyénektől is könnyedén gyűjthető és a tumor heterogenitása sem gyakorol oly mértékben befolyást a miRNS expresszióra. Azonban a testfolyadékokban mérhető alacsony szabad miRNS szintek nehézkessé teszik a globális miRNS profilozáson alapuló molekuláris biológiai módszerek (pl. miRNS szekvenálás) alkalmazását. Mivel sejtkultúrákon végzett vizsgálataink alapján a sejten belüli és kívüli miRNS expresszió jó korrelációt mutatott, ezért a biomarkerek azonosítását nagyban segítheti, ha a jelöltek kezdeti azonosítása sejtkultúrákon végzett kísérletek eredményein alapul, mivel a miRNS-ekre feltehetően sejttípus függő expresszió jellemző, ezáltal egy tumor növekedése, nagyobb mennyiségű, az adott tumortípusra jellemző miRNS mennyiséget eredményez a beteg testfolyadékaiban (Larrea és mtsai, 2016; Szilágyi és mtsai, 2020). Továbbá a szabad miRNS szintek meghatározása segítheti a sejtkultúrákkal végzett kutatásokat (pl. a sejtek fiziológiai állapotának monitorozására alkalmas markerek lehetnek), vagy a sejtenyészetek alkalmazásán alapuló biotechnológiai eljárásokat is.

8. Összefoglalás

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

Munkánk első szakaszában sikerült azonosítanunk kilenc miRNS-t, amelyek emelkedett expressziót mutattak a petefészekrákban szenvedő egyének vérmintáiban. Ezek közül hét (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-203a, miR-34b) ígéretes diagnosztikai paraméterekkel rendelkezett. Ezen miRNS-ek közül a miR-200b és miR-200c expressziója erős korrelációt mutatott egymással, illetve az ezen miRNS-eken alapuló diagnosztikai tesztek között jó egyezést tapasztaltunk. Ezen miRNS-ek közepes egyezést mutattak továbbá a HE4 markerrel, ezáltal ígéretes jelöltek lehetnek a jövőben többváltozós diagnosztikai tesztek kidolgozásánál. Megvizsgáltuk továbbá ezen miRNS-ek expresszióját humán ovárium sejtvonalakban is, mely alapján megállapítható, hogy a miRNS expresszió erősen függött az ovárium sejtek ösztrogén érzékenységétől. Feltehetőleg a legnagyobb biológiai relevanciával a miR-200b és miR-200c rendelkezik ösztrogén érzékeny petefészek tumorokban, mely miRNS-ek extracelluláris formái képesek hatást gyakorolni a környező sejtek miRNS tartalmára is. Ösztrogénkezelésre mutatott érzékenységük, valamint az ER α transzkripciójukra gyakorolt feltehető befolyása alapján jó markerei lehetnek az ovárium sejtek érzékenységének, ezáltal pedig segíthetik a petefészekrák megfelelő terápiájának kiválasztását. Fenotípusos és génexpressziós vizsgálataink alapján az E2 mellett a ZEA és BPA is képes ösztrogén válasz elindítására az ER α -val rendelkező sejtekben, már fiziológiailag releváns dózisokban is. Ezért mindenképp szükséges e molekulák hatásmechanizmusának alaposabb megismerése.

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

9. Summary

Ovarian cancer is the most lethal form of gynaecological malignancy. The low survival rate is mainly due to the late diagnosis of the disease. Identification of non-invasive biomarkers might improve ovarian cancer diagnostics that would also contribute to the increase of survival chances. MiRNAs are considered to be promising candidates for this purpose that are small, non-coding RNA molecules and might be involved in the development of cancer by the post-transcriptional regulation of genes involved in cell proliferation, migration or cell death. Furthermore, miRNAs are also detectable in body fluids that makes them promising candidates for liquid biopsy. In this study our aim was to identify miRNAs that might have high biological relevance in ovarian cancer and might be good biomarker candidates in ovarian cancer diagnostics in the future.

In the beginning of our work we identified 9 miRNAs that were overrepresented in the plasma samples of patients suffered from ovarian cancer. Among these, 7 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-203a, miR-34b) had good diagnostic parameters. The expression of miR-200b and miR-200c correlated well and the diagnostic tests based on these miRNAs showed high agreement with each other and medium agreement with HE4. We conclude that these miRNAs might be good candidates for the development of multivariable diagnostic tests in the future. We also studied the miRNA expression of estrogen sensitive and non-sensitive ovarian cell cultures. Our results show that the miRNA expression of ovarian cells highly depends on the presence of ER α . MiR-200b and miR-200c might have high biological relevance in estrogen sensitive ovarian cells and their cell free counterparts might have a high influence on the miRNA expression of surrounding cells. We conclude that these miRNAs might be good markers for estrogen sensitivity of ovarian tumors that might highly support ovarian cancer therapy. Our phenotypic studies present that ZEA and BPA are able to increase cell proliferation and migration in ovarian cells that is highly comparable with the effect of E2. These results suggest the urgent need for more studies in this field in order to understand the carcinogenic effect of these molecules.

We also suggest that monitoring cell-free miRNA expression in cell cultures might be applied as an initial step in the search for biomarker candidates that might be further tested in body fluids.

10. Értekezés új megállapításai

- A miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-34a, miR-34b, miR-203a és miR-205 relatív expressziója szignifikánsan magasabbnak bizonyult a petefészekrákban szenvedő betegek plazma mintáiban.
- A miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-34b és miR-203a ígéretes diagnosztikai paraméterekkel rendelkeztek.
- Az miR-200b és miR-200c expressziója jó korrelációt mutatott egymással és a HE4 markerekkel, ezáltal alkalmas jelöltek lehetnek többváltozós diagnosztikai tesztek kidolgozásában a jövőben.
- A miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429, miR-203a és miR-205 expressziója erősen függött az ovárium sejtek ösztrogén érzékenységtől sejt kultúrákkal végzett vizsgálataink alapján.
- A miR-200b és miR-200c magas alapexpressziót mutatott az ER α -val rendelkező PEO1 sejt vonalban, mely magas biológiai relevanciájukat feltételezi ösztrogén érzékeny sejtekben.
- A miR-200a, miR-200-b, miR-200c, miR-141 és miR-203a expressziója időfüggő módon változást mutatott ösztrogén kezelés hatására a PEO1 sejt vonalban. Ezen hatás nem jelentkezett MPP adagolását követően, ami arra utal, hogy az ER α hatást gyakorolhat transzkripciójukra.
- A szabad miR-200b és miR-200c expressziós szintek magasnak adódtak a PEO1 sejt vonalban, illetve ko-kultúras vizsgálatunk alkalmával képesek voltak a környező sejtekbe bejutni.
- Fenotípusos és génexpressziós vizsgálataink alapján az E2 mellett a ZEA és BPA is képes a sejtprolifерáció és a migráció elindítására az ER α -val rendelkező sejtekben, már fiziológiailag releváns dózisokban is.

11. Irodalomjegyzék

Alshannaq, A., Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 632.

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., V. Lee, A., Elishaev, E., Edwards, R. P., Oesterreich, S. (2017). Active estrogen receptor-alpha signaling in ovarian cancer models and clinical specimens. *Clinical Cancer Research*, 23(14), 3802-3812.

Angioli, R., Capriglione, S., Aloisi, A., Guzzo, F., Luvero, D., Miranda, A., Damiani, P., Montera, R., Terranova, C., Plotti, F. (2014). Can HE4 predict platinum response during first-line chemotherapy in ovarian cancer? *Tumor Biology*, 35(7), 7009-7015.

Armitage, M., Nooney, J., Evans, S. (2003). Recent concerns surrounding HRT. *Clinical Endocrinology*, 59(2), 145-155.

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.

Avissar-Whiting, M., Veiga, K. R., Uhl, K. M., Maccani, M. A., Gagne, L. A., Moen, E. L., Marsit, C. J. (2010). Bisphenol A exposure leads to specific microRNA alterations in placental cells. *Reproductive Toxicology*, 29(4), 401-406.

Ayaz, L., Cayan, F., Balci, Ş., Görür, A., Akbayir, S., Yıldırım Yaroğlu, H., Unal, N. D., Tamer, L. (2014). Circulating microRNA expression profiles in ovarian cancer. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 34(7), 620-624.

Azizmohammadi, S., Azizmohammadi, S., Safari, A., Kosari, N., Kaghazian, M., Yahaghi, E., Seifoleslami, M. (2016). The role and expression of miR-100 and miR-203 profile as prognostic markers in epithelial ovarian cancer. *American Journal of Translational Research*, 8(5), 2403.

Bai, Z., Wei, J., Yu, C., Han, X., Qin, X., Zhang, C., Liao, W., Li, L., Huang, W. (2019). Non-viral nanocarriers for intracellular delivery of microRNA therapeutics. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(8), 1209-1225.

Baker, M. E., Chang, D. J., Chandsawangbhuwana, C. (2009). 3D model of lamprey estrogen receptor with estradiol and 15 α -hydroxy-estradiol. *PLoS One*, 4(6), e6038.

Barnett, D. H., Sheng, S., Charn, T. H., Waheed, A., Sly, W. S., Lin, C. Y., Liu, E. T., Katzenellenbogen, B. S. (2008). Estrogen receptor regulation of carbonic anhydrase XII through a distal enhancer in breast cancer. *Cancer Research*, 68(9), 3505-3515.

Bayraktar, R., Van Roosbroeck, K., Calin, G. A. (2017). Cell-to-cell communication: microRNAs as hormones. *Molecular Oncology*, 11(12), 1673-1686.

Bhat-Nakshatri, P., Wang, G., Collins, N. R., Thomson, M. J., Geistlinger, T. R., Carroll, J. S., Brown, M., Hammond, S., Srour, E. F., Liu, Y., Nakshatri, H. (2009). Estradiol-regulated microRNAs control estradiol response in breast cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 37(14), 4850-4861.

Bjornstrom, L., Sjoberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology*, 19(4), 833-842.

Blenkiron, C., Miska, E. A. (2007). miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Human Molecular Genetics*, 16(R1), R106-R113.

Bobadilla, A. V. P., Arévalo, J., Sarró, E., Byrne, H. M., Maini, P. K., Carraro, T., Balocco, S., Mesequer, A., Alarcón, T. (2019). In vitro cell migration quantification method for scratch assays. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(151), 20180709.

Boll, K., Reiche, K., Kasack, K., Mörbt, N., Kretzschmar, A. K., Tomm, J. M., Verhaegh, G., Schalken, J., von Bergen, M., Horn, F., Hackermüller, J. (2013). MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma. *Oncogene*, 32(3), 277-285.

Bracken, C. P., Khew-Goodall, Y., Goodall, G. J. (2015). Network-based approaches to understand the roles of miR-200 and other microRNAs in cancer. *Cancer Research*, 75(13), 2594-2599.

Bratulic, S., Gatto, F., Nielsen, J. (2019). The translational status of cancer liquid biopsies. *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, 1-41.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.

Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15524-15529.

Callegari, E., Elamin, B. K., Giannone, F., Milazzo, M., Altavilla, G., Fornari, F., Giacomelli, L., D'Abundo, L., Ferracin, M., Bassi, C., Zagatti, B., Corrá, F., Miotto, E., Lupini, L., Bolondi, L., Gramantieri, L., Croce, C. M., Sabbioni, S., Negrini, M. (2012). Liver tumorigenicity promoted by microRNA-221 in a mouse transgenic model. *Hepatology*, 56(3), 1025-1033.

Caroli, A., Cardillo, M. T., Galea, R., Biasucci, L. M. (2013). Potential therapeutic role of microRNAs in ischemic heart disease. *Journal of Cardiology*, 61(5), 315-320.

Carter, J. V., O'brien, S. J., Burton, J. F., Oxford, B. G., Stephen, V., Hallion, J., Bishop, C., Galbraith, N. J., Eichenberger, M. R., Sarojini, H., Hattab, E., Galandiuk, S. (2019). The microRNA-200 family acts as an oncogene in colorectal cancer by inhibiting the tumor suppressor RASSF2. *Oncology Letters*, 18(4), 3994-4007.

Cavaliere, C., Antonelli, M., Cerrato, A., La Barbera, G., Laganà, A., Laus, M., Piovesana, S., Capriotti, A. L. (2019). A Novel Magnetic Molecular Imprinted Polymer for Selective Extraction of Zearalenone from Cereal Flours before Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Determination. *Toxins*, 11(9), 493.

Chakraborty, C., Das, S. (2016). Profiling cell-free and circulating miRNA: a clinical diagnostic tool for different cancers. *Tumor Biology*, 37(5), 5705-5714.

Chauhan, N., Dhasmana, A., Jaggi, M., Chauhan, S. C., Yallapu, M. M. (2020). Mir-205: A potential biomedicine for cancer therapy. *Cells*, 9(9), 1957.

Chen, V. W., Ruiz, B., Killeen, J. L., Coté, T. R., Wu, X. C., Correa, C. N., Howe, H. L. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society*, 97(S10), 2631-2642.

Chen, W., Zheng, R., Baade, P. D., Zhang, S., Zeng, H., Bray, F., DVM, A. J., Yu, X. Q., He, J. (2016). Cancer statistics in China, 2015. *CA: A Cancer Journal For Clinicians*, 66(2), 115-132.

Choi, P. W., Ng, S. W. (2017). The functions of microRNA-200 family in ovarian cancer: beyond epithelial-mesenchymal transition. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1207.

Christopher, A. F., Kaur, R. P., Kaur, G., Kaur, A., Gupta, V., Bansal, P. (2016). MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspectives in Clinical Research*, 7(2), 68.

Cittelly, D. M., Das, P. M., Salvo, V. A., Fonseca, J. P., Burow, M. E., Jones, F. E. (2010). Oncogenic HER2 Δ 16 suppresses miR-15a/16 and deregulates BCL-2 to promote endocrine resistance of breast tumors. *Carcinogenesis*, 31(12), 2049-2057.

Cohen, A., Burgos-Aceves, M. A., Smith, Y. (2016). Estrogen repression of microRNA as a potential cause of cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78, 234-238.

Coleman, R. L., Sill, M. W., Bell-McGuinn, K., Aghajanian, C., Gray, H. J., Tewari, K. S., Rubin, S. C., Rutherford, T. J. Chan, J. K., Chen, A., Swisher, E. M. (2015). A phase II evaluation of the potent, highly selective PARP inhibitor veliparib in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal cancer in patients who carry a germline BRCA1 or BRCA2 mutation—an NRG oncology/gynecologic oncology group study. *Gynecologic Oncology*, 137(3), 386-391.

Condrat, C. E., Thompson, D. C., Barbu, M. G., Bugnar, O. L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suci, N., Cretoiu, S. M., Voinea, S. C. (2020). miRNAs as biomarkers in disease: latest findings regarding their role in diagnosis and prognosis. *Cells*, 9(2), 276.

Corney, D. C., Hwang, C. I., Matoso, A., Vogt, M., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A. K., Kamat, A. a., Sood, A. K., Ellenson, L. H., Hermeking, H., Nikitin, A. Y. (2010). Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clinical Cancer Research*, 16(4), 1119-1128.

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.

Creugny, A., Fender, A., Pfeffer, S. (2018). Regulation of primary micro RNA processing. *FEBS Letters*, 592(12), 1980-1996.

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*, 18(8), 1607-1618.

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.

Cui, J., Shu, J. (2020). Circulating microRNA trafficking and regulation: computational principles and practice. *Briefings in Bioinformatics*, 21(4), 1313-1326.

Cui, R., Wang, Y., Li, Y., Li, Y. (2019). Clinical value of ROMA index in diagnosis of ovarian cancer: meta-analysis. *Cancer Management and Research*, 11, 2545.

Di Leva, G., Garofalo, M., Croce, C. M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 9, 287-314.

Dickins, R. A., Hemann, M. T., Zilfou, J. T., Simpson, D. R., Ibarra, I., Hannon, G. J., Lowe, S. W. (2005). Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nature Genetics*, 37(11), 1289-1295.

Domoszlai, D. (2021) A biszfenol A és a zearalenon kiváltotta transzkripcionális válasz vizsgálata ovárium sejtekben. BSc diplomamunka. <http://hdl.handle.net/2437/324147>

Dong, Y., Si, J. W., Li, W. T., Liang, L., Zhao, J., Zhou, M., Li, D., Li, T. (2015). miR-200a/miR-141 and miR-205 upregulation might be associated with hormone receptor status and prognosis in endometrial carcinomas. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(3), 2864.

Dyxhoorn, D. M., Wu, Y., Xie, H., Yu, F., Lal, A., Petrocca, F., Martinvalet, D., Song, E., Lim, B., Lieberman, J. (2009). miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. *PloS One*, 4(9), e7181.

Elias, K. M., Fendler, W., Stawiski, K., Fiascone, S. J., Vitonis, A. F., Berkowitz, R. S., Frendl, Gy., Konstantinopoulos, P., Crum, C. P., Kedzierska, M., Cramer, D. W., Chowdhury, D. (2017). Diagnostic potential for a serum miRNA neural network for detection of ovarian cancer. *Elife*, 6, e28932.

Esau, C., Davis, S., Murray, S. F., Yu, X. X., Pandey, S. K., Pear, M., Watts, L., Booten, S. L., Graham, M., McKay, R., Subramaniam, A., Propp, S., Lollo, B. A., Freier, S., Bennett, C. F., Bhanot, S., Monia, B. P. (2006). miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metabolism*, 3(2), 87-98.

Eyking, A., Reis, H., Frank, M., Gerken, G., Schmid, K. W., Cario, E. (2016). MiR-205 and MiR-373 are associated with aggressive human mucinous colorectal cancer. *PloS One*, 11(6), e0156871.

Fang, Z., Dai, W., Wang, X., Chen, W., Shen, C., Ye, G., Li, L. (2016). Circulating miR-205: a promising biomarker for the detection and prognosis evaluation of bladder cancer. *Tumor Biology*, 37(6), 8075-8082.

Feng, X., Wang, Z., Fillmore, R., Xi, Y. (2014). MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Letters*, 344(2), 166-173.

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., Bray, F. (2018). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European Journal of Cancer*, 103, 356-387.

Fernandez, S. V., Russo, J. (2010). Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicologic Pathology*, 38(1), 110-122.

Florczuk, M., Szpechcinski, A., Chorostowska-Wynimko, J. (2017). miRNAs as biomarkers and therapeutic targets in non-small cell lung cancer: current perspectives. *Targeted Oncology*, 12(2), 179-200.

Forterre, A., Komuro, H., Aminova, S., Harada, M. (2020). A comprehensive review of cancer MicroRNA therapeutic delivery strategies. *Cancers*, 12(7), 1852.

Foster, H., Coley, H. M., Goumenou, A., Pados, G., Harvey, A., Karteris, E. (2010). Differential expression of mTOR signalling components in drug resistance in ovarian cancer. *Anticancer Research*, 30(9), 3529-3534.

Frizzell, C., Ndossi, D., Verhaegen, S., Dahl, E., Eriksen, G., Sørli, M., Ropstad, E., Muller, M., Elliott, C.T., Connolly, L. (2011). Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha-and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicology Letters*, 206(2), 210-217.

Fuentes, N., Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*, 116, 135.

Gadzała-Kopciuch, R., Cendrowski, K., Cesarz, A., Kielbasa, P., Buszewski, B. (2011). Determination of zearalenone and its metabolites in endometrial cancer by coupled separation techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(7), 2069-2078.

Gao, H., Yang, B. J., Li, N., Feng, L. M., Shi, X. Y., Zhao, W. H., Liu, S. J. (2015). Bisphenol A and hormone-associated cancers: current progress and perspectives. *Medicine*, 94(1):e211.

Gao, Y. C., Wu, J. (2015). MicroRNA-200c and microRNA-141 as potential diagnostic and prognostic biomarkers for ovarian cancer. *Tumor Biology*, 36(6), 4843-4850.

Gao, Y., Zhang, W., Liu, C., Li, G. (2019). miR-200 affects tamoxifen resistance in breast cancer cells through regulation of MYB. *Scientific Reports*, 9(1), 1-6.

Gavin, K. M., Seals, D. R., Silver, A. E., Moreau, K. L. (2009). Vascular endothelial estrogen receptor α is modulated by estrogen status and related to endothelial function and endothelial nitric oxide synthase in healthy women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(9), 3513-3520.

Gebäck, T., Schulz, M. M. P., Koumoutsakos, P., Detmar, M. (2009). TScratch: a novel and simple software tool for automated analysis of monolayer wound healing assays: Short Technical Reports. *Biotechniques*, 46(4), 265-274.

George, A., McLachlan, J., Tunariu, N., Della Pepa, C., Migali, C., Gore, M., Kaye, S., Banerjee, S. (2017). The role of hormonal therapy in patients with relapsed high-grade ovarian carcinoma: a retrospective series of tamoxifen and letrozole. *BMC Cancer*, 17(1), 1-8.

Ghafouri-Fard, S., Shoorei, H., Taheri, M., Sanak, M.) (2020). Emerging role of non-coding RNAs in allergic disorders. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110615.

Gharpure, K. M., Pradeep, S., Sans, M., Rupaimoole, R., Ivan, C., Wu, S. Y., Bayraktar, E., Nagaraja, A. S., Mangala, L. S., Zhang, X., Haemmerle, M., Hu, W., Rodriguez-Aguayo, C.,

McGuire, M., Mak, C. S. L., Chen, X., Tran, M. A., Villar- Prados, A., Pena, G. A., Kondetimmanahalli, R., Nini, R., Koppula, P., Ram, P., Liu, J., Lopez- Berestein, G., Baggerly, K., Eberlin, L. S., Sood, A. K. (2018). FABP4 as a key determinant of metastatic potential of ovarian cancer. *Nature Communications*, 9(1), 1-14.

Gholamin, S., Pasdar, A., Sadegh Khorrami, M., Mirzaei, H., Reza Mirzaei, H., Salehi, R., A. Ferns, G., Ghayour-Mobarhan, M., Avan, A. (2016). The potential for circulating microRNAs in the diagnosis of myocardial infarction: a novel approach to disease diagnosis and treatment. *Current Pharmaceutical Design*, 22(3), 397-403.

Giannopoulou, L., Zavridou, M., Kasimir-Bauer, S., Lianidou, E. S. (2019). Liquid biopsy in ovarian cancer: the potential of circulating miRNAs and exosomes. *Translational Research*, 205, 77-91.

Gottardo, F., Liu, C. G., Ferracin, M., Calin, G. A., Fassan, M., Bassi, P., Sevignani, C., Byrne, D., Negrini, M., Pagano, F., Gomella, L. G., Croce, C. M., Baffa, R. (2007). Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. In *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (Vol. 25, No. 5, pp. 387-392). Elsevier.

Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., Falanga, V. (2017). Research techniques made simple: analysis of collective cell migration using the wound healing assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), e11-e16.

Greiser, C. M., Greiser, E. M., Dören, M. (2007). Menopausal hormone therapy and risk of ovarian cancer: systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 13(5), 453-463.

Guessous, F., Alvarado-Velez, M., Marcinkiewicz, L., Zhang, Y., Kim, J., Heister, S., Kefas, B., Godlewski J., Schiff, D., Purow, B. Abounader, R. (2013). Oncogenic effects of miR-10b in glioblastoma stem cells. *Journal of Neuro-Oncology*, 112(2), 153-163.

Hallas-Potts, A., Dawson, J. C., Herrington, C. S. (2019). Ovarian cancer cell lines derived from non-serous carcinomas migrate and invade more aggressively than those derived from high-grade serous carcinomas. *Scientific Reports*, 9(1), 1-10.

Halvorsen, A. R., Kristensen, G., Embleton, A., Adusei, C., Barretina-Ginesta, M. P., Beale, P., Helland, Å. (2017). Evaluation of prognostic and predictive significance of circulating microRNAs in ovarian cancer patients. *Disease Markers*, 2017.

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

Han, M., Liu, M., Wang, Y., Chen, X., Xu, J., Sun, Y., Zhao, L., Qu, H., Fan, Y., Wu, C. (2012). Antagonism of miR-21 reverses epithelial-mesenchymal transition and cancer stem

cell phenotype through AKT/ERK1/2 inactivation by targeting PTEN. *PloS One*, 7(6), e39520.

Hayes, J., Peruzzi, P. P., Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 20(8), 460-469.

Hergenreider, E., Heydt, S., Tréguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A. J., Zeiher, A. M., Scheffer, M. P., Frangakis, A. S., Yin, X., Mayr, M., Braun, T., Urbich, C., Boon, R. A., Dimmeler, S. (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature Cell Biology*, 14(3), 249-256.

Hewitt, S. C., Korach, K. S. (2018). Estrogen receptors: new directions in the new millennium. *Endocrine Reviews*, 39(5), 664-675.

Hildebrand, J. S., Gapstur, S. M., Feigelson, H. S., Teras, L. R., Thun, M. J., Patel, A. V. (2010). Postmenopausal hormone use and incident ovarian cancer: Associations differ by regimen. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2928-2935.

Ho, S. M. (2003). Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 73.

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.

Holschneider, C. H., Berek, J. S. (2000). Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. In *Seminars in Surgical Oncology* (Vol. 19, No. 1, pp. 3-10). New York: John Wiley & Sons, Inc.

Horta, M., Cunha, T. M. (2015). Sex cord-stromal tumors of the ovary: a comprehensive review and update for radiologists. *Diagnostic and Interventional Radiology*, 21(4), 277.

Hosseinahli, N., Aghapour, M., Duijf, P. H., Baradaran, B. (2018). Treating cancer with microRNA replacement therapy: A literature review. *Journal of Cellular Physiology*, 233(8), 5574-5588.

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

Humphries, B., Yang, C. (2015). The microRNA-200 family: small molecules with novel roles in cancer development, progression and therapy. *Oncotarget*, 6(9), 6472.

Hur, K., Toiyama, Y., Okugawa, Y., Ide, S., Imaoka, H., Boland, C. R., Goel, A. (2017). Circulating microRNA-203 predicts prognosis and metastasis in human colorectal cancer. *Gut*, 66(4), 654-665.

Hussain, M. U. (2012). Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell and Tissue Research*, 349(2), 405-413.

Hynninen, P., Vaskivuo, L., Saarnio, J., Haapasalo, H., Kivelä, J., Pastorekova, S., Pastorek, J., Waheed, A., Sly, W. S., Puistola, U., Parkkila, S. (2006). Expression of transmembrane carbonic anhydrases IX and XII in ovarian tumours. *Histopathology*, 49(6), 594-602.

Ingenito, F., Roscigno, G., Affinito, A., Nuzzo, S., Scognamiglio, I., Quintavalle, C., Condorelli, G. (2019). The role of exo-miRNAs in cancer: a focus on therapeutic and diagnostic applications. *International journal of molecular sciences*, 20(19), 4687.

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.

Iorio, M. V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C. G., Alder, H., Calin, G. A., Ménard, S., Croce, C. M. (2007). MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Research*, 67(18), 8699-8707.

Jalal, N., Surendranath, A. R., Pathak, J. L., Yu, S., Chung, C. Y. (2018). Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicology Reports*, 5, 76-84.

Jelovac, D., Armstrong, D. K. (2011). Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(3), 183-203.

Jiang, Q., Wang, Y., Hao, Y., Juan, L., Teng, M., Zhang, X., Li, M., Wang, G., Liu, Y. (2009). miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl_1), D98-D104.

Jonsson, P., Bandlamudi, C., Cheng, M. L., Srinivasan, P., Chavan, S. S., Friedman, N. D., Rosen, E. Y., Richards, A. L., Bouvier, N., Selcuklu, S. D., Bielski, C. M., Abida, W., Mandelker, D., Birsoy, O., Zhang, L., Zehir, A., Donoghue, M. T. A., Baselga, J., Offit, K., Scher, H. I., O'Reilly, E. M., Stadler, Zs. K., Schultz, N., Socci, N. D., Viale, A., Ladanyi, M., Robson, M. E., Hyman, D. M., Berger, M. F., Solit, D. B. (2019). Tumour lineage shapes BRCA-mediated phenotypes. *Nature*, 571(7766), 576-579.

Kabekkodu, S. P., Shukla, V., Varghese, V. K., D'Souza, J., Chakrabarty, S., Satyamoorthy, K. (2018). Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biological Reviews*, 93(4), 1955-1986.

Kan, C. W., Hahn, M. A., Gard, G. B., Maidens, J., Huh, J. Y., Marsh, D. J., Howell, V. M. (2012). Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*, 12(1), 627.

Kapetanakis, N. I., Uzan, C., Jimenez-Pailhes, A. S., Gouy, S., Bentivegna, E., Morice, P., Caron, O., Gourzones-Dmitriev, C., Le Teuff, G., Busson, P. (2015). Plasma miR-200b in ovarian carcinoma patients: distinct pattern of pre/post-treatment variation compared to CA-125 and potential for prediction of progression-free survival. *Oncotarget*, 6(34), 36815.

Kappelmayer, J., Antal-Szalmás, P., Nagy Jr, B. (2015). Human epididymis protein 4 (HE4) in laboratory medicine and an algorithm in renal disorders. *Clinica Chimica Acta*, 438, 35-42.

Katoh, T., Yasuda, M., Hasegawa, K., Kozawa, E., Maniwa, J. I., Sasano, H. (2012). Estrogen-producing endometrioid adenocarcinoma resembling sex cord-stromal tumor of the ovary: a review of four postmenopausal cases. *Diagnostic Pathology*, 7(1), 1-7.

Kinose, Y., Sawada, K., Nakamura, K., Kimura, T. (2014). The role of microRNAs in ovarian cancer. *BioMed Research International*, 2014.

Klinge, C. M. (2012). miRNAs and estrogen action. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(5), 223-233.

Klinge, C. M. (2015). miRNAs regulated by estrogens, tamoxifen, and endocrine disruptors and their downstream gene targets. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 273-297.

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

Kosaka, N., Izumi, H., Sekine, K., Ochiya, T. (2010). microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 1(1), 7.

Koutsaki, M., Libra, M., Spandidos, D. A., Zaravinos, A. (2017). The miR-200 family in ovarian cancer. *Oncotarget*, 8(39), 66629.

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

Kowalska, K., Habrowska-Górczyńska, D. E., Piastowska-Ciesielska, A. W. (2016). Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48, 141-149.

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.

Kurman, R. J., Shih, I. M. (2016). The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. *The American Journal of Pathology*, 186(4), 733-747.

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.

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.

Larrea, E., Sole, C., Manterola, L., Goicoechea, I., Armesto, M., Arestin, M., Caffarel, M. M., Araujo, A. M., Araiz, M., Fernandez- Mercado, M., Lawrie, C. H. (2016). New concepts in cancer biomarkers: circulating miRNAs in liquid biopsies. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5), 627.

Lebanony, D., Benjamin, H., Gilad, S., Ezagouri, M., Dov, A., Ashkenazi, K., Grefen, N., Izraeli, S., Rechavi, G., Pass, H., Nonaka, D., Li, J., Spector, Y., Rosenfeld, N., Chajut, A., Cohen, D., Aharonov, R., Mansukhani, M. (2009). Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *Journal of Clinical Oncology*, 27(12), 2030-2037.

Lee, C. H., Subramanian, S., Beck, A. H., Espinosa, I., Senz, J., Zhu, S. X., Huntsman, D., van de Rijn, M., Gilks, C. B. (2009). MicroRNA profiling of BRCA1/2 mutation-carrying and non-mutation-carrying high-grade serous carcinomas of ovary. *PLoS One*, 4(10), e7314.

Leonardi, A., Cofini, M., Rigante, D., Lucchetti, L., Cipolla, C., Penta, L., Esposito, S. (2017). The effect of bisphenol A on puberty: a critical review of the medical literature. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(9), 1044.

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.

Li, H., Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25(14), 1754-1760.

Li, X. J., Ren, Z. J., Tang, J. H. (2014). MicroRNA-34a: a potential therapeutic target in human cancer. *Cell Death & Disease*, 5(7), e1327-e1327.

Lim, L. P., Lau, N. C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J. M., Castle, J., Bartel, D. P., Linsley, P. S., Johnson, J. M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027), 769-773.

Liu, J. F., Matulonis, U. A. (2016). What is the place of PARP inhibitors in ovarian cancer treatment?. *Current Oncology Reports*, 18(5), 29.

Liu, L. Z., Li, C., Chen, Q., Jing, Y., Carpenter, R., Jiang, Y., Kung, H. F., Lai, L., Jiang, B. H. (2011). MiR-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 α expression. *PloS One*, 6(4), e19139.

Lodes, M. J., Caraballo, M., Suci, D., Munro, S., Kumar, A., Anderson, B. (2009). Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PloS one*, 4(7), e6229.

Loh, H. Y., Norman, B. P., Lai, K. S., Rahman, N. M. A. N. A., Alitheen, N. B. M., Osman, M. A. (2019). The regulatory role of MicroRNAs in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 4940.

Loret, N., Denys, H., Tumeurs, P., Berx, G. (2019). The role of epithelial-to-mesenchymal plasticity in ovarian cancer progression and therapy resistance. *Cancers*, 11(6), 838.

Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, R., Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834-838.

Lu, Y., Thavarajah, T., Gu, W., Cai, J., Xu, Q. (2018). Impact of miRNA in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 38(9), e159-e170.

Madhavan, D., Peng, C., Wallwiener, M., Zucknick, M., Nees, J., Schott, S., Rudolph, A., Riethdorf, S., Trumpp, A., Pantel, K., Sohn, C., Chang-Claude, J., Schneeweiss, A., Burwinkel, B. (2016). Circulating miRNAs with prognostic value in metastatic breast cancer and for early detection of metastasis. *Carcinogenesis*, 37(5), 461-470.

Maeda, K., Sasaki, H., Ueda, S., Miyamoto, S., Terada, S., Konishi, H., Kogata, Y., Ashihara, K., Fujiwara, S., Tanaka, Y., Tanaka, T., Hayashi, M., Ito, Y., Kondo, Y., Ochiya, T., Ohmichi, M. (2020). Serum exosomal microRNA-34a as a potential biomarker in epithelial ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 13, 1-9.

Malekinejad, H., Maas-Bakker, R. F., Fink-Gremmels, J. (2005). Enzyme kinetics of zearalenone biotransformation: pH and cofactor effects. *Archives of Toxicology*, 79(10), 547-553.

Malvezzi, M., Carioli, G., Rodriguez, T., Negri, E., La Vecchia, C. (2016). Global trends and predictions in ovarian cancer mortality. *Annals of Oncology*, 27(11), 2017-2025.

Manavalan, T. T., Teng, Y., Litchfield, L. M., Muluhngwi, P., Al-Rayyan, N., Klinge, C. M. (2013). Reduced expression of miR-200 family members contributes to antiestrogen resistance in LY2 human breast cancer cells. *PloS One*, 8(4), e62334.

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.

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.

Mei, S., Xin, J., Liu, Y., Zhang, Y., Liang, X., Su, X., Yan, H., Huang, Y., Yang, R. (2015). MicroRNA-200c promotes suppressive potential of myeloid-derived suppressor cells by modulating PTEN and FOG2 expression. *PLoS One*, 10(8), e0135867.

Melone, M. A. B., Valentino, A., Margarucci, S., Galderisi, U., Giordano, A., Peluso, G. (2018). The carnitine system and cancer metabolic plasticity. *Cell Death & Disease*, 9(2), 1-12.

Meng, X., Joosse, S. A., Müller, V., Trillsch, F., Milde-Langosch, K., Mahner, S., Geffken, M., Pantel, K., Schwarzenbach, H. (2015). Diagnostic and prognostic potential of serum miR-7, miR-16, miR-25, miR-93, miR-182, miR-376a and miR-429 in ovarian cancer patients. *British Journal of Cancer*, 113(9), 1358-1366.

Meng, X., Müller, V., Milde-Langosch, K., Trillsch, F., Pantel, K., Schwarzenbach, H. (2016). Diagnostic and prognostic relevance of circulating exosomal miR-373, miR-200a, miR-200b and miR-200c in patients with epithelial ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(13), 16923.

Meric-Bernstam, F., Mills, G. B. (2012). Overcoming implementation challenges of personalized cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 9(9), 542-548.

Metzler, M., Pfeiffer, E., Hildebrand, A. (2010). Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World Mycotoxin Journal*, 3(4), 385-401.

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

Mungenast, F., Thalhammer, T. (2014). Estrogen biosynthesis and action in ovarian cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 5, 192.

Muralidhar, G. G., Barbolina, M. V. (2015). The miR-200 family: versatile players in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 16833-16847.

Muralidharan-Chari, V., Clancy, J. W., Sedgwick, A., D'Souza-Schorey, C. (2010). Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *Journal of Cell Science*, 123(10), 1603-1611.

Murdoch, W. J., McDonnell, A. C. (2002). Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction-Cambridge-*, 123(6), 743-750.

Murdoch, W. J., Townsend, R. S., McDonnell, A. C. (2001). Ovulation-induced DNA damage in ovarian surface epithelial cells of ewes: prospective regulatory mechanisms of repair/survival and apoptosis. *Biology of Reproduction*, 65(5), 1417-1424.

Nilsson, S., Gustafsson, J. Å. (2011). Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 89(1), 44-55.

Nimmagadda, S., Penet, M. F. (2020). Ovarian Cancer Targeted Theranostics. *Frontiers in Oncology*, 9, 1537.

O'Donnell, A. J., Macleod, K. G., Burns, D. J., Smyth, J. F., Langdon, S. P. (2005). Estrogen receptor- α mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocrine-Related Cancer*, 12(4), 851-866.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Frontiers in Endocrinology*, 9, 402.

Ostry, V., Malir, F., Toman, J., Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33(1), 65-73.

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

Pajewska, M., Łojko, M., Cendrowski, K., Sawicki, W., Kowalkowski, T., Buszewski, B., Gadzała-Kopciuch, R. (2018). The determination of zearalenone and its major metabolites in endometrial cancer tissues. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(5), 1571-1582.

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

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.

Pendlebury, A., Hannan, N. J., Binder, N., Beard, S., McGauran, M., Grant, P., Tong, S., Whitehead, C. L. (2017). The circulating microRNA-200 family in whole blood are potential biomarkers for high-grade serous epithelial ovarian cancer. *Biomedical Reports*, 6(3), 319-322.

Penfornis, P., Vallabhaneni, K. C., Whitt, J., Pochampally, R. (2016). Extracellular vesicles as carriers of microRNA, proteins and lipids in tumor microenvironment. *International Journal of Cancer*, 138(1), 14-21.

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), 1-11.

Pramanik, D., Campbell, N. R., Karikari, C., Chivukula, R., Kent, O. A., Mendell, J. T., Maitra, A. (2011). Restitution of tumor suppressor microRNAs using a systemic nanovector inhibits pancreatic cancer growth in mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(8), 1470-1480.

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

Qin, A. Y., Zhang, X. W., Liu, L., Yu, J. P., Li, H., Wang, S. Z. E., Ren, X. B., Cao, S. (2013). MiR-205 in cancer: an angel or a devil?. *European Journal of Cell Biology*, 92(2), 54-60.

Rae, J. M., Johnson, M. D., Scheys, J. O., Cordero, K. E., Larios, J. M., Lippman, M. E. (2005). GREB1 is a critical regulator of hormone dependent breast cancer growth. *Breast Cancer Research and Treatment*, 92(2), 141-149.

Rai, A., Das, M., Tripathi, A. (2019). Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(16), 2710-2729.

Ramón y Cajal, S., Segura, M. F., Hümmel, S. (2019). Interplay between ncRNAs and cellular communication: A proposal for understanding cell-specific signaling pathways. *Frontiers in Genetics*, 10, 281.

Ramus, S. J., Song, H., Dicks, E., Tyrer, J. P., Rosenthal, A. N., Intermaggio, M. P., Fraser, J., Gentry-Maharaj, A., Hayward, J., Philpott, S., Anderson, C., Edlund, C. K., Conti, D., Harrington, P., et al. (2015). Germline mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN genes in women with ovarian cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(11).

Reddy, K. B. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*, 15(1), 1-6.

Reed, B. G., Babayev, S. N., Chen, L. X., Carr, B. R., Word, R. A., Jimenez, P. T. (2018). Estrogen-regulated miRNA-27b is altered by bisphenol A in human endometrial stromal cells. *Reproduction*, 156(6), 559-567.

Reid, B. M., Permuth, J. B., Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biology & Medicine*, 14(1), 9.

- Reid, G., Pel, M. E., Kirschner, M. B., Cheng, Y. Y., Mugridge, N., Weiss, J., Williams, M., Wright, C., Edelman, J. J. B., Vallety, M. P., McCaughan, B.C., Klebe, S., Brahmabhatt, H., MacDiarmid, J. A., van Zandwijk, N. (2013). Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Annals of Oncology*, 24(12), 3128-3135.
- Ren, X., Wu, X., Hillier, S. G., Fegan, K. S., Critchley, H. O. D, Mason, J. I., Sarvi, S., Harlow, C. R. (2015). Local estrogen metabolism in epithelial ovarian cancer suggests novel targets for therapy. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 150, 54-63.
- Ren, X., Zhang, H., Cong, H., Wang, X., Ni, H., Shen, X., Ju, S. (2018). Diagnostic model of serum miR-193a-5p, HE4 and CA125 improves the diagnostic efficacy of epithelium ovarian cancer. *Pathology & Oncology Research*, 24(4), 739-744.
- Resnick, K. E., Alder, H., Hagan, J. P., Richardson, D. L., Croce, C. M., Cohn, D. E. (2009). The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecologic Oncology*, 112(1), 55-59.
- Richards, M., Anderson, M., Carter, P., Ebert, B. L., Mossialos, E. (2020). The impact of the COVID-19 pandemic on cancer care. *Nature Cancer*, 1(6), 565-567.
- Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42, 132-155.
- Rojas, V., Hirshfield, K. M., Ganesan, S., Rodriguez-Rodriguez, L. (2016). Molecular characterization of epithelial ovarian cancer: implications for diagnosis and treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 2113.
- Roth, C., Kasimir-Bauer, S., Pantel, K., Schwarzenbach, H. (2011). Screening for circulating nucleic acids and caspase activity in the peripheral blood as potential diagnostic tools in lung cancer. *Molecular Oncology*, 5(3), 281-291.
- Roth, C., Rack, B., Müller, V., Janni, W., Pantel, K., Schwarzenbach, H. (2010). Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Research*, 12(6), R90.
- Rothschild, S. I. (2014). microRNA therapies in cancer. *Molecular and Cellular Therapies*, 2(1), 1-8.
- Sabry, R., Yamate, J., Favetta, L., LaMarre, J. (2019). MicroRNAs: potential targets and agents of endocrine disruption in female reproduction. *Journal of Toxicologic Pathology*, 32(4), 213-221.
- Samavat, H., Kurzer, M. S. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Letters*, 356(2), 231-243.

Santucci, C., Carioli, G., Bertuccio, P., Malvezzi, M., Pastorino, U., Boffetta, P., Negri, E., Bosetti, C., La Vecchia, C. (2020). Progress in cancer mortality, incidence, and survival: a global overview. *European Journal of Cancer Prevention*, 29(5), 367-381.

Sayed, A. S. M., Xia, K., Yang, T. L., Peng, J. (2013). Circulating microRNAs: a potential role in diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction. *Disease Markers*, 35.

Schmid, G., Notaro, S., Reimer, D., Abdel-Azim, S., Duggan-Peer, M., Holly, J., Fiegl, H., Rössler, J., Wiedemair, A., Concin, N., Altevogt, P., Marth, C., Zeimet, A. G. (2016). Expression and promotor hypermethylation of miR-34a in the various histological subtypes of ovarian cancer. *BMC Cancer*, 16(1), 102.

Sekhon, K., Bucay, N., Majid, S., Dahiya, R., Saini, S. (2016). MicroRNAs and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *Oncotarget*, 7(41), 67597.

Shah, J. S., Gard, G. B., Yang, J., Maidens, J., Valmadre, S., Soon, P. S., Marsh, D. J. (2018). Combining serum microRNA and CA-125 as prognostic indicators of preoperative surgical outcome in women with high-grade serous ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 148(1), 181-188.

Shao, Y., Gu, W., Ning, Z., Song, X., Pei, H., Jiang, J. (2017). Evaluating the prognostic value of microRNA-203 in solid tumors based on a meta-analysis and the Cancer Genome Atlas (TCGA) Datasets. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 41(4), 1468-1480.

Shih, I. M., Kurman, R. J. (2004). Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *The American Journal of Pathology*, 164(5), 1511-1518.

Si, W., Shen, J., Zheng, H., Fan, W. (2019). The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical Epigenetics*, 11(1), 1-24.

Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. (2018) Cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 68:7-30.

Song, H., Dicks, S. J. R., Tyrer, J. P., Intermaggio, M. P., Hayward, J., Edlund, C. K., Conti, D., Harrington, P., Fraser, L., Philpott, S., Anderson, C., Rosenthal, A., et al. (2015). Contribution of germline mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D genes to ovarian cancer in the population. *Journal of Clinical Oncology*, 33(26), 2901.

Soria-Bretones, I., Sáez, C., Ruíz-Borrego, M., Japón, M. A., Huertas, P. (2013). Prognostic value of Ct IP/RBBP 8 expression in breast cancer. *Cancer Medicine*, 2(6), 774-783.

Sölétormos, Gy., Duffy, M. J., Hassan, S. O. A., Verheijen, R. H. M, Tholander, B., Bast, R. C., Gaarenstroom, K. N., Sturgeon, C., Bonfrer, J. M., Petersen, P. H., Troonen, H., Torre, G. C., Kulpa, J. K., Tuxen, M. K., Molina, R. (2016). Clinical use of cancer biomarkers in

epithelial ovarian cancer: updated guidelines from the European Group on Tumor Markers. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 26(1).

Sromek, M., Glogowski, M., Chechlinska, M., Kulinczak, M., Szafron, L., Zakrzewska, K., Owczarek, J., Wisniewski, P., Wlodarczyk, R., Talarek, L., Turski, M., Siwicki, J. K. (2017). Changes in plasma miR-9, miR-16, miR-205 and miR-486 levels after non-small cell lung cancer resection. *Cellular Oncology*, 40(5), 529-536.

Stewart, C., Ralyea, C., Lockwood, S. (2019). Ovarian cancer: an integrated review. *Seminars in Oncology Nursing*, Vol. 35, No. 2, pp. 151-156 WB Saunders.

Su, L., Hu, A., Luo, Y., Zhou, W., Zhang, P., Feng, Y. (2014). HMGN2, a new anti-tumor effector molecule of CD8+ T cells. *Molecular Cancer*, 13(1), 1-10.

Su, N., Qiu, H., Chen, Y., Yang, T., Yan, Q., Wan, X. (2013). miR-205 promotes tumor proliferation and invasion through targeting ESRRG in endometrial carcinoma. *Oncology Reports*, 29(6), 2297-2302.

Sun, P., Liu, D. Z., Jickling, G. C., Sharp, F. R., Yin, K. J. (2018). MicroRNA-based therapeutics in central nervous system injuries. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 38(7), 1125-1148.

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*.

Svoronos, A. A., Engelman, D. M., Slack, F. J. (2016). OncomiR or tumor suppressor? The duplicity of microRNAs in cancer. *Cancer Research*, 76(13), 3666-3670.

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.

Takai, M., Terai, Y., Kawaguchi, H., Ashihara, K., Fujiwara, S., Tanaka, T., Tsunetoh, S., Tanaka, Y., Sasaki, H., Kanemura, M., Tanabe, A., Ohmichi, M. (2014). The EMT (epithelial-mesenchymal-transition)-related protein expression indicates the metastatic status and prognosis in patients with ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*, 7(1), 1-8.

Takeuchi, T., Tsutsumi, O. (2002). Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(1), 76-78.

Tang, L., Yang, B., Cao, X., Li, Q., Jiang, L., Wang, D. (2019). MicroRNA-377-3p inhibits growth and invasion through sponging JAG1 in ovarian cancer. *Genes & Genomics*, 41(8), 919-926.

Taylor, D. D., Gercel-Taylor, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110(1), 13-21.

Tomao, F., Russo, G. L., Spinelli, G. P., Stati, V., Prete, A. A., Prinzi, N., Sinjari, M., Vici, P., Papa, A., Chiotti, M. S., Panici, P. B., Tomao, F. (2014). Fertility drugs, reproductive strategies and ovarian cancer risk. *Journal of Ovarian Research*, 7(1), 51.

Torre, L. A., Trabert, B., DeSantis, C. E., Miller, K. D., Samimi, G., Runowicz, C. D., Gaudet, M. M., Jemal, A., Siegel, R. L. (2018). Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(4), 284-296.

Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(16), 7223-7233.

Ulitsky, I. (2018). Interactions between short and long noncoding RNAs. *FEBS Letters*, 592(17), 2874-2883.

Vercellini, P., Crosignani, P., Somigliana, E., Vigano, P., Buggio, L., Bolis, G., Fedele, L. (2011). The 'incessant menstruation' hypothesis: a mechanistic ovarian cancer model with implications for prevention. *Human Reproduction*, 26(9), 2262-2273.

Viñas, R., Jeng, Y. J., Watson, C. S. (2012). Non-genomic effects of xenoestrogen mixtures. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9(8), 2694-2714.

Vosgha, H., Ariana, A., Smith, R. A., Lam, A. K. Y. (2018). miR-205 targets angiogenesis and EMT concurrently in anaplastic thyroid carcinoma. *Endocrine-Related Cancer*, 25(3), 323-337.

Voutsadakis, I. A. (2016). Hormone receptors in serous ovarian carcinoma: prognosis, pathogenesis, and treatment considerations. *Clinical Medicine Insights: Oncology*, 10, CMO-S32813.

Vrtačnik, P., Ostanek, B., Mencej-Bedrač, S., Marc, J. (2014). The many faces of estrogen signaling. *Biochemia Medica: Biochemia Medica*, 24(3), 329-342.

Walker, J. L., Powell, C. B., Chen, L. M., Carter, J., Bae Jump, V. L., Parker, L. P., Borowsky, M. E., Gibb, R. K. (2015). Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer. *Cancer*, 121(13), 2108-2120.

Wang, H., Liu, S., Jia, L., Chu, F., Zhou, Y., He, Z., Guo, M., Chen, C., Xu, L. (2018). Nanostructured lipid carriers for MicroRNA delivery in tumor gene therapy. *Cancer Cell International*, 18(1), 1-6.

Wang, H., Zhao, X., Ni, C., Dai, Y., Guo, Y. (2018). Zearalenone regulates endometrial stromal cell apoptosis and migration via the promotion of mitochondrial fission by activation of the JNK/Drp1 pathway. *Molecular Medicine Reports*, 17(6), 7797-7806.

Wang, J., Chen, J., Sen, S. (2016). MicroRNA as biomarkers and diagnostics. *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 25-30.

Wang, J., Raimondo, M., Guha, S., Chen, J., Diao, L., Dong, X., Wallace, M. B., Killary, A. M., Frazier, M. L., Woodward, T. A., Wang, J., Sen, S. (2014). Circulating microRNAs in pancreatic juice as candidate biomarkers of pancreatic cancer. *Journal of Cancer*, 5(8), 696.

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.

Wang, S., Zhao, X., Wang, J., Wen, Y., Zhang, L., Wang, D., Chen, H., Chen, Q., Xiang, W. (2013). Upregulation of microRNA-203 is associated with advanced tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Medical Oncology*, 30(3), 681.

Wang, W., Yin, Y., Shan, X., Zhou, X., Liu, P., Cao, Q., Zhu, D., Zhang, J. Y., Zhu, W. (2019). The value of plasma-based microRNAs as diagnostic biomarkers for ovarian cancer. *The American Journal of the Medical Sciences*, 358(4), 256-267.

Wang, X., Zhang, H., Jiao, K., Zhao, C., Liu, H., Meng, Q., Wang, Z., Feng, C., Li, Y. (2020). Effect of miR-205 on proliferation and migration of thyroid cancer cells by targeting CCNB2 and the mechanism. *Oncology Letters*, 19(3), 2568-2574.

Wang, Y., Kim, S., Kim, I. M. (2014). Regulation of metastasis by microRNAs in ovarian cancer. *Frontiers in Oncology*, 4, 143.

Weiderpass, E., Tyczynski, J. E. (2015). Epidemiology of patients with ovarian cancer with and without a BRCA1/2 mutation. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 19(6), 351-364.

Welponer, H., Tsibulak, I., Wieser, V., Degasper, C., Shivalingaiah, G., Wenzel, S., Sprung, S., Marth, C., Hackl, H., Fiegl, H., Zeimet, A. G. (2020). The miR-34 family and its clinical significance in ovarian cancer. *Journal of Cancer*, 11(6), 1446.

Wen, B., Zhu, R., Jin, H., Zhao, K. (2021). Differential expression and role of miR-200 family in multiple tumors. *Analytical Biochemistry*, 114243.

Wong, M. Y., Yu, Y., Walsh, W. R., Yang, J. L. (2011). microRNA-34 family and treatment of cancers with mutant or wild-type p53. *International Journal of Oncology*, 38(5), 1189-1195.

Wu, H., Zhu, S., Mo, Y. Y. (2009). Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell research*, 19(4), 439-448.

Wyman, S. K., Parkin, R. K., Mitchell, P. S., Fritz, B. R., O'Briant, K., Godwin, A. K., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Tewari, M. (2009). Repertoire of microRNAs in epithelial ovarian cancer as determined by next generation sequencing of small RNA cDNA libraries. *PLoS One*, 4(4), e5311.

Xiao, Y., Humphries, B., Yang, C., Wang, Z. (2019). MiR-205 dysregulations in breast cancer: the complexity and opportunities. *Non-Coding RNA*, 5(4), 53.

Yager, J. D., Davidson, N. E. (2006). Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 354(3), 270-282.

Yang, S., Banerjee, S., de Freitas, A., Sanders, Y. Y., Ding, Q., Matalon, S., Thannickal, V. J., Abraham, E., Liu, G. (2012). Participation of miR-200 in pulmonary fibrosis. *The American Journal of Pathology*, 180(2), 484-493.

Yarmolinsky, J., Relton, C. L., Lophatananon, A., Muir, K., Menon, U., Gentry-Maharaj, A., Walther, A., Zheng, J., Fasching, P., Zheng, W., Yin Ling, W., Park, S. K., Kim, B. G., Choi, J. Y., Park, B., Smith, G. D., Martin, R. M., Lewish, S. J. (2019). Appraising the role of previously reported risk factors in epithelial ovarian cancer risk: a Mendelian randomization analysis. *PLoS Medicine*, 16(8), e1002893.

Yates, L. A., Norbury, C. J., Gilbert, R. J. (2013). The long and short of microRNA. *Cell*, 153(3), 516-519.

Yeung, K. T., Yang, J. (2017). Epithelial–mesenchymal transition in tumor metastasis. *Molecular Oncology*, 11(1), 28-39.

Zaman, M. S., Maher, D. M., Khan, S., Jaggi, M., Chauhan, S. C. (2012). Current status and implications of microRNAs in ovarian cancer diagnosis and therapy. *Journal of Ovarian Research*, 5(1), 1-11.

Zaporozhchenko, I. A., Ponomaryova, A. A., Rykova, E. Y., Laktionov, P. P. (2018). The potential of circulating cell-free RNA as a cancer biomarker: challenges and opportunities. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 18(2), 133-145.

Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology*, 302(1), 1-12.

Zhang, G. L., Song, J. L., Ji, C. L., Feng, Y. L., Yu, J., Nyachoti, C. M., Yang, G. S. (2018). Zearalenone exposure enhanced the expression of tumorigenesis genes in donkey granulosa cells via the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *Frontiers in Genetics*, 9, 293.

Zhang, L., Volinia, S., Bonome, T., Calin, G. A., Greshock, J., Yang, N., Liu, C. G., Giannakakis, A., Alexiou, P., Hasegawa, K., Johnstone, C. N., Megraw, M. S., Adams, S., Lassus, H., Huang, J., Kaur, S., Liang, S., Sethupathy, P., Leminen, A., Simossis, V. A.,

Sandaltzopoulos, R., Naomoto, Y., Katsaros, D., Gimotty, P. A., DeMichele, A., Huang, Q., Bützow, R., Rustgi, A. K., Weber, B. L., Birrer, M. J., Hatzigeorgiou, A. G., Croce, C. M., Coukos, G. (2008). Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 7004-7009.

Zhang, W., Dahlberg, J. E., Tam, W. (2007). MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *The American Journal of Pathology*, 171(3), 728-738.

Zhao, C., Sun, X., Li, L. (2019). Biogenesis and function of extracellular miRNAs. *ExRNA*, 1(1), 1-9.

Zheng, H., Kang, Y. (2014). Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene*, 33(14), 1755-1763.

Zhu, L., Zhuang, H., Wang, H., Tan, M., Schwab, C. L., Deng, L., Gao, J., Hao, Y., Li, X., Gao, S., Liu, J., Lin, B. (2016). Overexpression of HE4 (human epididymis protein 4) enhances proliferation, invasion and metastasis of ovarian cancer. *Oncotarget*, 7(1), 729.

Zinedine, A., Soriano, J. M., Molto, J. C., Manes, J. (2007). Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. *Food and Chemical Toxicology*, 45(1), 1-18.

Zuberi, M., Mir, R., Das, J., Ahmad, I., Javid, J., Yadav, P., Masroor, M., Ahmad, S., Ray, P. C., Saxena, A. (2015). Expression of serum miR-200a, miR-200b, and miR-200c as candidate biomarkers in epithelial ovarian cancer and their association with clinicopathological features. *Clinical and Translational Oncology*, 17(10), 779-787.

11. Tárgyszavak

Biomarker, miRNS, folyadék biopszia, miR-200 , miR-34, miR-203a, miR-205
ösztadiol, Biszfenol-A, Zearalenon, petefészekrák

12. Key words

Biomarker, miRNA, fluid biopsy, miR-200, miR-34, miR-203a, miR-205, estradiol, Bisphenol-A, Zearalenone, ovarian cancer

13. Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek **Prof. Dr. Nagy Bálintnak**, amiért lehetővé tette és biztosította munkámat és előrehaladásomat, továbbá a felém nyújtott bizalmát és támogatását. Halás vagyok továbbá, amiért lehetővé tette, hogy eredményeimet magyar és nemzetközi konferenciákon is bemutathassam. Hálásan köszönöm **Dr. Szilágyi-Bónizs Melindának** az évek során nyújtott támogatását és tudományos tevékenységem ösztönzését. Szakmai útmutatása, munkám mindennapi irányítása és szakmai felkészültségem támogatása nélkül nem valósulhatott volna meg e tanulmány. Továbbá köszönöm, hogy bármikor fordulhattam hozzá bármilyen tanácsért

Hálával tartozom a Humán-genetikai tanszék minden munkatársának, amiért végig támogattak és segítettek munkám során. Külön köszönet illeti **Dr. Penyige András**t és **Dr. Széles Lajost** a bioinformatikai vizsgálatokban nyújtott segítségükért, illetve szakmai tanácsaikért, melyek nélkülözhetetlenek voltak e munka megvalósulásában. Szeretnék továbbá köszönetet mondani **Hádáné Dr. Birkó Zsuzsannának** amiért mindig számíthattam támogatására, önzetlen segítségére, valamint **Dr. Soltész Beátának** a plazmaminták feldolgozásában nyújtott segítségéért. Hálásan köszönöm **Magyarné Trefán Katalinnak**, hogy mindig számíthattam pontos és precíz munkavégzésére, mellyel messzemenően megkönnyítette a mindennapi munkámat, továbbá köszönöm önzetlen segítségét, biztatását és támogatását. Köszönet illeti korábbi és jelenlegi TDK hallgatóimat **Diana Maricela Herrera Villarroel-t**, **Szabó Rékát**, **Kiss Grétát** és **Domoszlai Dórát**, amiért lelkes segítségükkel hozzájárultak munkám megvalósulásához. Külön köszönettel tartozom **Varga Alexandrának**, aki később PhD hallgatóként folytatta e munka megvalósulásában nyújtott szorgalmas és precíz segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani kooperációs partnereinknek, **Dr. Janka Eszter-nek** a statisztikai vizsgálatok elvégzésében nyújtott professzionális segítségéért. Hálával tartozom **Prof. Dr. Póka Róbertnek** és **Dr. Lukács Jánosnak** a DEKK Szülészeti és Nőgyógyászati Klinika orvosainak, amiért rendelkezésünkre bocsájtották a vérmintákat. Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Markovics Arnoldnak** a sejtkultúrákkal végzett kísérletek lebonyolításában nyújtott segítségéért.

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

14. Függelék

14.1 Kiegészítő táblázatok

Kiegészítő táblázat 1: A miR-200 családba tartozó miRNS-ek által közösen szabályozott célgének a miRTargetLink alapján.

miR-200	
ACVR2B	activin A receptor type 2B Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked; Chromatin
ATRX	Remodeler
BAP1	BRCA1 Associated Protein 1
BCL2	B-Cell Lymphoma 2; Apoptosis Regulator
BMI1	B Lymphoma Mo-MLV Insertion Region 1; Proto-Oncogene
BTC	Betacellulin
CCNE2	Cyclin E2
DLC1	Deleted In Liver Cancer 1 Protein; Rho GTPase Activating Protein
DLX5	Distal-Less Homeobox 5
DNMT1	DNA Methyltransferase 1
DNMT3A	DNA Methyltransferase 3 Alpha
DNMT3B	DNA Methyltransferase 3 Beta
E2F3	E2F Transcription Factor 3
ELMO2	Engulfment And Cell Motility 2
ERBB2IP	ErbB2 Interacting Protein
ETS1	ETS Proto-Oncogene 1, Transcription Factor
EZH2	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2
FLT1	Fms Related Receptor Tyrosine Kinase 1
FN1	Fibronectin 1
GATA4	GATA Binding Protein 4
HFE	Homeostatic Iron Regulator
HOXB5	Homeobox B5
KDR	Kinase Insert Domain Receptor
KEAP1	Kelch Like ECH Associated Protein 1
KLF11	Kruppel Like Factor 11
KLHL20	Kelch Like Family Member 20
MAPK14	Mitogen-Activated Protein Kinase 14
MSN	Moesin
MYB	MYB Proto-Oncogene, Transcription Factor
NOTCH1	Notch Receptor 1; Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1
PHLPP1	PH Domain And Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase 1
PIN1	Peptidylprolyl Cis/Trans Isomerase, NIMA-Interacting 1
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PTPRD	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type D

miR-200

RASSF2	Ras Association Domain Family Member 2
RERE	Arginine-Glutamic Acid Dipeptide Repeats
RIN2	Ras And Rab Interactor 2
RND3	Rho Family GTPase 3
RNF2	Ring Finger Protein 2
ROCK2	Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2
SEC23A	SEC23 Homolog A, COPII Coat Complex Component
SEPT7	Septin 7
SHC1	SHC Adaptor Protein 1
SIP1	Survival Of Motor Neuron Protein Interacting Protein 1
SMAD2	SMAD Family Member 2
SP1	Specificity Protein 1; Sp1 Transcription Factor
SUZ12	SUZ12 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit
TCF7L1	Transcription Factor 7 Like 1
TIMP2	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2; Tissue Inhibitor Of Metalloproteinase 2
TRAPPC2P1	Trafficking Protein Particle Complex Subunit 2B
VAC14	VAC14 Component Of PIKFYVE Complex
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
WASF3	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein Family Member 3
WDR37	WD Repeat Domain 37
XIAP	X-Linked Inhibitor Of Apoptosis
YAP1	Yes1 Associated Transcriptional Regulator
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2
ZFPM2	Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2

Kiegészítő táblázat 2: A miR-34 családba tartozó miRNS-ek által közösen szabályozott célgének a miRTargetLink alapján.

miR-34	
AXIN2	axin-like protein
BCL2	BCL2 Apoptosis Regulator; B-Cell/Lymphoma 2
CCND1	Cyclin D1
CDK4	Cyclin Dependent Kinase 4
CDK6	Cyclin Dependent Kinase 6
GALNT7	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7
IL6R	Interleukin 6 Receptor
JAG1	Jagged Canonical Notch Ligand 1
LEF1	Lymphoid Enhancer Binding Factor 1
MAP2K1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 1
MET	MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase
MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
MYCN	MYCN Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
NANOG	Nanog Homeobox
NOTCH1	Notch Receptor 1; Neurogenic Locus Notch Homolog Protein 1
SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1
SOX2	SRY-Box Transcription Factor 2
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
YY1	YY1 Transcription Factor
ZAP70	Zeta Chain Of T Cell Receptor Associated Protein Kinase 70

Kiegészítő táblázat 3: A miR-203a által szabályozott célgének a miRTargetLink alapján.

miR-203a	
ABCE1	ATP Binding Cassette Subfamily E Member 1
ABL1	ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase
AKT2	AKT Serine/Threonine Kinase 2
ASAP1	ArfGAP With SH3 Domain, Ankyrin Repeat And PH Domain 1
ATM	ATM Serine/Threonine Kinase
BCL2L2	Bcl-2-Like Protein 2
BIRC5	Baculoviral IAP Repeat Containing 5
BMI1	BMI1 Proto-Oncogene, Polycomb Ring Finger
CASK	Calcium/Calmodulin Dependent Serine Protein Kinase
CAV1	Caveolin 1
CBLL1	Cbl Proto-Oncogene Like 1
CDK6	Cyclin Dependent Kinase 6
CREB1	CAMP Responsive Element Binding Protein 1
DLX5	Distal-Less Homeobox 5
E2F1	E2F Transcription Factor 1
E2F3	E2F Transcription Factor 3
EDNRA	Endothelin Receptor Type A
EYA4	Eyes Absent Homolog 4 ; EYA Transcriptional Coactivator And Phosphatase 4
GDAP1	Ganglioside Induced Differentiation Associated Protein 1
IFIT1	Interferon Induced Protein With Tetratricopeptide Repeats 1
IL24	Interleukin 24
JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
KIF2A	Kinesin Family Member 2A
KIF5B	Kinesin Family Member 5B
LASP1	LIM And SH3 Protein 1
LIFR	LIF Receptor Subunit Alpha
MMP10	Matrix Metalloproteinase 10
MYD88	MYD88 Innate Immune Signal Transduction Adaptor
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
PLD2	Phospholipase D2
PPM1D	Protein Phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ Dependent 1D
RAN	RAN, Member RAS Oncogene Family; Ras-Related Nuclear Protein
RAPH1	Ras Association (RalGDS/AF-6) And Pleckstrin Homology Domains 1
RUNX2	RUNX Family Transcription Factor 2
SMAD4	SMAD Family Member 4
SNAI1	Snail Family Transcriptional Repressor 1
SNAI2	Snail Family Transcriptional Repressor 2
SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signaling 3
SOCS6	Suppressor Of Cytokine Signaling 6
SRC	SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase
TJP2	Tight Junction Protein 2
TNF	Tumor Necrosis Factor

miR-203a

TP63	Tumor Protein P63
UVRAG	UV Radiation Resistance Associated
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2
ZNF148	Zinc Finger Protein 148; Zinc Finger DNA-Binding Protein 89

Kiegészítő táblázat 4: A miR-205 által szabályozott célgének a miRTargetLink alapján.

miR-205	
ACSL1	Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 1
ACSL4	Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 4
AR	Androgen Receptor
BCL2	BCL2 Apoptosis Regulator; B-Cell/Lymphoma 2
BCL6	BCL6 Transcription Repressor; B-Cell Lymphoma 6 Protein
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
CYR61	Cysteine Rich Angiogenic Inducer 61
DDX5	DEAD-Box Helicase 5
E2F1	E2F Transcription Factor 1
E2F5	E2F Transcription Factor 5
EGLN2	Egl-9 Family Hypoxia Inducible Factor 2
ERBB2	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2
ERBB3	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3
ESRRG	Estrogen Related Receptor Gamma
HMGB3	High Mobility Group Box 3
IL24	Interleukin 24
IL32	Interleukin 32
INPPL1	Inositol Polyphosphate Phosphatase Like 1
ITGA5	Integrin Subunit Alpha 5
KCNJ10	Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 10
LAMC1	Laminin Subunit Gamma 1
LRP1	LDL Receptor Related Protein 1
LRRK2	Leucine Rich Repeat Kinase 2
MED1	Mediator Complex Subunit 1
PHLPP2	PH Domain And Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase 2
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
PTPRM	Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type M
SIGMAR1	Sigma Non-Opioid Intracellular Receptor 1
SMAD1	SMAD Family Member 1
SMAD4	SMAD Family Member 4
SRC	SRC Proto-Oncogene, Non-Receptor Tyrosine Kinase
TP73	Tumor Protein P73
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A
YES1	YES Proto-Oncogene 1, Src Family Tyrosine Kinase
YY1	YY1 Transcription Factor
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1
ZEB2	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2

14.2 Saját közlemények jegyzéke



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

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

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

Jelölt: Márton Éva
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10067424

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További közlemények

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





5. Penyige, A., **Márton, É.**, Soltész, B., Szilágyi, M., Póka, R., Lukács, J., Széles, L., Nagy, B.:
Circulating miRNA Profiling in Plasma Samples of Ovarian Cancer Patients.
Int. J. Mol. Sci. 20 (18), E4533, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20184533>
IF: 4.556
6. Késérő, J., Soltész, B., Lukács, J., **Márton, É.**, Szilágyi, M., Penyige, A., Póka, R., Nagy, B.:
Detection of cell-free, exosomal and whole blood mitochondrial DNA copy number in plasma
or whole blood of patients with serous epithelial ovarian cancer.
J. Biotechnol. 298, 76-81, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.04.015>
IF: 3.503
7. Soltész, B., Lukács, J., Szilágyi, E., **Márton, É.**, Szilágyi, M., Penyige, A., Póka, R., Nagy, B.:
Expression of CD24 in plasma, exosome and ovarian tissue samples of serous ovarian
cancer patients.
J. Biotechnol. 298, 16-20, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.03.018>
IF: 3.503
8. Soltész, B., Lukács, J., **Márton, É.**, Szilágyi, M., Penyige, A., Póka, R., Nagy, B.: A CD24 mRNS-
expresszió meghatározása kvantitatív valósídejű PCR-módszerrel alacsonyán differenciált
szerózus papilláris petefészekrákos szöveti mintákból.
Magyar Nőorv. L. 81 (5), 254-258, 2018.
9. Szilágyi, M., **Márton, É.**, Lukács, D., Hádáné Birkó, Z., Kele, Z., Biró, S.: Mutation in afsR Leads to
A-Factor Deficiency in *Streptomyces griseus* B2682.
J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 28 (5), 216-224, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000495410>
IF: 1.457

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 28,108

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

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

Debrecen, 2021.05.18.

