

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Lengyel Máté

**A monoamin jelátvitel és rexinoid alapú kombinációs
kezelések szerepe az emlőrák kemoprevenciójában**

DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

A monoamin jelátvitel és rexinoid alapú kombinációs kezelések szerepe az emlőrák kemoprevenciójában

Lengyel Máté

Témavezető: *Dr. Uray Iván Péter*



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2026

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	6
1.1 Az emlőrák epidemiológiája és kockázatbecslési lehetőségei	6
1.2 Az emlőtumorer molekuláris klasszifikációja	8
1.3 Klasszikus kemoprevenációs megközelítések és célcsoportjaik.....	9
1.4 Retinoidok és retinoidok alkalmazása kemoprevenációban.....	11
1.5 A monoamin jelátvitel szerepe és lehetőségei a hormonfüggetlen kemoprevenációban.	13
1.6 A szerotonin jelátvitel és homeosztázis szerepe az emlősejtek működésében.....	17
1.7 Az extracelluláris mátrix kompozíciójának szerepe és potenciálja a kemoprevenációban	22
1.8 A Zymogene Granule Protein 16B szekretált faktor, mint mátriszóma újraszerveződést támogató új célpont	27
2. Célkitűzések	30
3. Anyagok és Módszerek	33
3.1 Sejtvonalak és sejtenyésztés.....	33
3.2 <i>ZG16B</i> klónozása expressziós vektorba	34
3.3 Farmakológiai és biológiai kezelések, hatóanyag-könyvtár.....	35
3.4 Proliferációs assay.....	38
3.5 Kolóniaformáló assay.....	39
3.6 Sejt-migráció, adhézió és morfológia vizsgálata.....	39
3.7 Immunfestés, immunhisztokémia és fluoreszcens mikroszkópia	40
3.8 Western blot analízis	41
3.9 Másodlagos hírvivők (IP3, cAMP) kvantitálása	41
3.10 Transzkriptomika, RNS szekvenálás és RT-qPCR	42
3.11 Kromatin-immunprecipitáció, szekvenálás és qPCR	43
3.12 Valós idejű kvantitatív PCR.....	45
3.13 Állatkísérletes vizsgálatok.....	46
3.14 Genomikai adatbázisból származó adatok feldolgozása	46
3.15 Statisztikai elemzés és ábrakészítés	47
4. Eredmények	47
4.1 A SERT gátlása és 5-HT stimuláció antiproliferatív hatást fejt ki HME-hTert sejtekben	47

4.2 Normál emlő epithel sejtek kifejezik a 5-HT termeléséhez és jelátviteléhez szükséges fehérjéket.....	50
4.3 Paroxetine hatására megváltozik az emlő epithel sejtek transzkriptomikai profilja	52
4.4 Az emlő epithel sejtekbe bejutó 5-HT hatására fokozódik a szabadgyök (ROS) termelés és DNS-károsodás indukálódik	56
4.5 A normál emlő epithel sejteken kifejeződő 5-HT receptorok funkcionálisan aktívak és képesek az Erk 1/2 aktivitását befolyásolni	57
4.6 Szelektív 5-HT receptor modulátorok szűrővizsgálata potenciálisan antiproliferatív hatású hatóanyagokat azonosított HME-hTert sejtekben.....	61
4.7 A receptorok G-fehérje kapcsoltsága meghatározza a receptor izoforma aktivációja során a proliferációra kifejtett hatását	68
4.8 A 5-HT receptorok sejtfelszíni stimulációja szinergikusan potenciálja a bexarotene antiproliferatív hatását normál emlő epithel sejtekben.....	72
4.9 A bexarotene alapú szinergikus kombinációk célgénje, a <i>ZG16B</i> expressziója az <i>ARID1A</i> -n keresztül farmakológiailag modulálható	74
4.10 A <i>ZG16B</i> fokozza a proliferációt normál emlősejtekben és hormon-receptor pozitív emlőtumor sejtekben	78
4.11 A <i>ZG16B</i> fokozza a normál epithel sejtek és az emlőtumor sejtek motilitását.....	80
4.12 A <i>ZG16B</i> migrációt stimuláló hatását a <i>PI3K</i> -Akt jelátviteli útvonal közvetíti	83
4.13 Az ECM átstrukturálásához és sejtmotilitáshoz kapcsolódó útvonalak inverz módon szabályozottak <i>ZG16B</i> és a bexarotene + carvedilol kombinációja által	86
4.14 A <i>ZG16B</i> normál emlő epithel sejtekben és emlőtumor sejtekben EMT-t indukál	90
4.15 <i>ZG16B</i> és bexarotene + carvedilol kombinációja ellentétes módon szabályozzák az emlőtumorsejtek kolóniaképző képességét	93
4.16 A bexarotene + carvedilol kombinációja csökkenti a <i>ZG16B</i> és <i>FN1</i> expresszióját normál emlőszövetben és xenograft emlőtumor szövetben	96
5. Diszkusszió	98
5.1 A monoamin jelátvitel klinikai jelentősége és potenciális transzlációs szerepe emlőrákban	98
5.2 Az intra- és extracelluláris 5-HT hatások elkülönítésének koncepcionális és technikai korlátai.....	100
5.3 A szerotonin jelátvitel proliferációt szabályozó jelentősége normál emlő epithel sejtekben.....	100
5.4 A SERT gátlásához társuló transzkriptomikai változások jellemzése	102

5.5 A sejtfelszíni 5-HT receptor-mediált jelátvitel szerepe a proliferáció és a mitogén jelátviteli útvonalak szabályozásában	104
5.6 Az 5-HT receptorok expresszióbeli és funkcionális heterogenitása normál emlő epithel sejtekben.....	105
5.7 A 5-HT receptor útvonalak célzott farmakológiai szűrése az antiproliferatív jelátviteli elemek azonosítására.....	107
5.8 A G-fehérje-kapcsolt jelátvitel általános szerepe a proliferáció szabályozásában normál emlő epithel sejtekben.....	109
5.9 A rexinoid alapú kemoprevenció szinergikus erősítése 5-HT jelátviteli modulációval	110
5.10 A <i>ZGI6B</i> epigenetikai szabályozása rexinoid alapú szinergikus kombinációk hatására	112
5.11 A <i>ZGI6B</i> tumorbiológiai szerepe és feltáratlan biológiai szerepe az emlőszövetben	114
5.12 A <i>ZGI6B</i> szekretált faktor funkcionális validálása és proliferációra gyakorolt hatása emlősejtekben.....	115
5.13 A <i>ZGI6B</i> migrációt fokozó hatásának jellemzése	116
5.14 A <i>ZGI6B</i> által indukált extracelluláris mátrix-újraszerveződés jelentősége.....	117
5.15 <i>ZGI6B</i> hatására EMT indukálódik, és fokozódik az emlőtumorsejtek transzformáltsága	120
5.16 A doktori kutatás jelentősége, limitációi és lehetséges jövőbeli irányai.....	122
6. Összefoglalás - Magyar	125
7. Összefoglalás – Angol (Summary)	126
8. Irodalomjegyzék.....	127
9. Kulcsszavak - Magyar.....	146
10. Kulcsszavak – Angol (Keywords)	146
11. Támogatások és Köszönetnyilvánítás	146
12. Függelék	148
12.1 Hivatalos publikációs lista	148
12.2 Rövidítések jegyzéke.....	150

1. Bevezetés

1.1 Az emlőrák epidemiológiája és kockázatbecslési lehetőségei

Az emlőrák a nők körében világszerte az egyik leggyakoribb daganattípus, és napjainkig is jelentős halálozási oknak számít. A GLOBOCAN 2022 becslése szerint évente több mint 2,3 millió új esetet diagnosztizálnak, melyből közel 670 000 haláleset következik. A globális előfordulás növekedése több tényezőre vezethető vissza: az életmódbeli változásokra, a szülési mintázatok átalakulására, az elhízás egyre gyakoribbá válására, a reprodukív életszakaszok megváltozására és a népesség öregedésére. A betegség továbbra is jelentős társadalmi terhet jelent. A túlélési arányok régióként nagy eltéréseket mutatnak, ugyanis a magas jövedelmű országokban a túlélés kedvezőbb, míg az alacsonyabb erőforrásokkal rendelkező régiókban az emlőrák továbbra is a halálozás vezető oka a nők körében a többi daganattípushoz képest¹.

Az emlőtumor kialakulásában szerepet játszanak genetikai, hormonális, környezeti és életmódbeli tényezők. A legnagyobb genetikai kockázattal a *BRCA1* és *BRCA2* gének öröklött mutációi járnak. Ezek fennállása több mint tízszeres emlőrákkockázatot eredményez, és gyakran agresszív, hormonreceptor-negatív daganatok kialakulásával jár². Hormonális tényezők, például korai menarche, késői menopauza vagy a nulliparitás szintén erősen növelik az ösztrogénfüggő emlőrák kialakulásának kockázatát³. Ugyancsak jelentős szerepe van az életmódnak, ugyanis az elhízás, az alkoholfogyasztás, a dohányzás, a fizikai inaktivitás mind növelik a betegség előfordulását⁴⁻⁶. Az emlő mammográfiával detektált magas szöveti denzitása szintén egy fontos rizikófaktorként említhető meg a daganat kialakulása szempontjából⁷.

Az emlőrák megelőzésének egyik kulcskérdése a megfelelő kockázatbecslés, amely lehetővé teszi a megelőző kezelések és a megfelelő szűrővizsgálatok célzott alkalmazását^{8,9}. A jelenleg rendelkezésre álló rizikóbecslő eszközök többféle metódust integrálhatnak, például a klinikai-epidemiológiai modelleket, genetikai teszteket, képalapú kockázatbecslő módszereket és szöveti biomarkereket¹⁰. A legelterjedtebb klinikai kockázatbecslő modellek közé tartozik a Gail-modell, amely életkor, menarche, első szülés ideje, családi anamnézis és biopsziás előzmények alapján határozza meg az 5 és 10 éves emlőrákkockázatot¹¹. A Tyrer–Cuzick (IBIS) modell ugyanakkor integrálja a családi halmozódást, genetikai predispozíciót,

hormonális tényezőket és mammográfiás denzitást is¹². A genetikai vizsgálat alapú modellek a *BRCA1/2*, *PALB2*, *CHEK2*, *ATM*, *TP53* és egyéb magas vagy közepes penetranciájú gének szekvenálásával becsülik meg a kockázatot, kiegészítve ezt sokgénés kockázati pontszámok (polygenic risk scores, PRS) alkalmazásával, amelyek több száz alacsony hatású variánst is belefoglalhatnak a kockázatbecslésbe^{13,14}. Emellett elterjedten vizsgálnak még olyan szöveti (Ki-67, ösztrogén receptor – *ESR1*, lysyl-oxidase – *LOX*, kollagén-1, -3, periostin – *POSTN*, cyclooxygenase 2 – *COX2*, aldehyde dehydrogenase 1 – *ALDH1*) vagy szisztémás biomarkereket, például többféle cirkuláló DNS fragmens, mammaglobin A/B, insulin-like growth factor 1 (*IGF-1*) szérumszintjét, amelyek esszenciális kiegészítői a többi kockázatbecslő módszernek^{15–24}. Végül, a mammográfiás vizsgálat a betegség legelterjedtebb szűrőmódszereként említhető, mely diagnosztikán túl képes mérni az emlő strómális denzitását. Egészséges szövetben mért magas denzitás esetén önállóan akár négyszeres rizikónövekedést jelezhet^{7,25}. A mesterséges intelligencia (MI), különösen a 'deep-learning' és a modern multimodális modellek alkalmazása alapvetően új dimenziót nyitott az emlőrák személyre szabott rizikóbecslésében. Ezek az algoritmusok képesek a nagy méretű, heterogén adatforrások, például genomikai variánsadatok, sokgénés rizikóprofilok, mammográfiás nyersképek, digitális szövettani textúraparaméterek és hosszabb időtartamon át monitorozott klinikai adatok együttes analízisére. Ezen modellek előnye, hogy olyan mintázatokat, interakciókat és rejtett logikai összefüggéseket képesek feltárni, amelyek a konvencionális rizikóbecslő algoritmusok, például a logisztikus regresszió vagy Cox-modellek számára nem hozzáférhetők. Számos vizsgálat igazolta, hogy a neurális hálózatokból, radiológiai felvételek analízisére fejlesztett modellekből vagy sokgénés prediktor modellekből felépített rendszerek a középtávú (5–10 éves) rizikóbecslésben szignifikánsan felülmúlhatják a jelenleg használt standard klinikai módszereket^{26,27}. Az MI adaptív tanulási kapacitása potenciálisan lehetővé teszi a jövőben egy dinamikus rizikóbecslő modell kialakítását is, amelyben az egyéni kockázat időben frissíthető, reflektálva a hormonális állapot, életmód- és környezeti faktorok, egyéb klinikai állapotjelzők változásaira. Mindezek miatt az MI-alapú megközelítések egyre inkább a személyre szabott prevenció és rizikóbecslés kulcsfontosságú elemeivé válnak. Továbbá, az MI-alapú megközelítések egészség-gazdaságtani szempontból is jelentős potenciált hordoznak, ugyanis a pontosabb rizikóbecslés hozzájárulhat a fölösleges diagnosztikai beavatkozások számának csökkentéséhez, miközben lehetővé teszi a rizikó alapján történő irányított szűrési stratégiák bevezetését, ahol a szűrés gyakorisága és módszertana az egyén jósolt kockázatához

igazítható²⁸. Mindazonáltal, a technológia klinikai alkalmazása több módszertani és infrastrukturális kihívással jár. A prediktív teljesítmény és standardizálhatóság nagymértékben függ a modell-építéshez használt adatok minőségétől és heterogenitásától, azonban jelenleg hiányoznak a globálisan elfogadott, standardizált, 'benchmark' adatszetek, amelyek lehetővé tennék a különböző MI-modellek reprodukálható és objektív összehasonlítását^{29,30}. A klinikai ellátóegységek között továbbá jelentős a technikai és populációs variabilitás, mivel használhatnak eltérő képző protokollokat, a betegpopulációt pedig különböző etnikai és genetikai háttérrel rendelkező betegcsoportok jelenthetik³¹. Emiatt a mesterséges intelligencia jelenleg leginkább hibrid rendszerként értelmezhető, amely predikcióit a genetikai panelvizsgálatok, PRS-modellek, mammográfiás denzitáselemzés és biomarkerek eredményeivel összhangban, azok kontextusában képes a legmegbízhatóbban szolgáltatni. A jövőben a standardizált adatarchitektúrák, 'benchmark'-adatbázisok és prospektív validációs vizsgálatok kialakítása kulcsfontosságú lesz ahhoz, hogy a mesterséges intelligencia valóban a személyre szabott emlőrák-megelőzés és rizikóbecslés meghatározó pillérévé váljon.

A kockázatbecslés tehát meghatározza, hogy mely egyéneknél merülhet fel célzott prevenció beavatkozása, de önmagában nem ad választ arra, hogy milyen biológiai folyamatokat kellene befolyásolni. Ehhez az emlőrák molekuláris heterogenitásának megértése is szükséges, mivel az egyes altípusok eltérő jelátviteli hálózataik és génexpressziós mintázataik alapján eltérő megelőzésük és terápiájuk eltérő mechanizmusokra épül.

1.2 Az emlőtumorok molekuláris klasszifikációja

Az emlőrák nem egységes betegség, hanem biológiailag és klinikailag is heterogén kórkép, amely számos, eltérő molekuláris altípusból áll. A modern precíziós onkológiai klasszifikáció alapja a tumorok genomikai, metabolomikai, transzkriptomikai és fehérjeexpressziós jellemzőinek elemzésén alapul, amely lehetővé teszi a különböző biológiai viselkedésű csoportok elkülönítését, illetve teret nyithat az újabb mesterséges intelligencia alapú klasszifikációnak is³². A klinikai gyakorlatban azonban jelenleg a legszélesebb körben használt felosztás az immunhisztokémiai markereken alapul, amelyek a hormonreceptor-státuszt és a proliferációs aktivitást tükrözik³³. Ennek megfelelően négy fő alcsoport különíthető el: a luminalis A (ER+, progesteron receptor - PR+, alacsony Ki-67, jó prognózis), a luminalis B (ER+, gyakran PR-, magas Ki-67, agresszív lefolyás), a human epidermal growth factor

receptor type 2 - HER2+ (HER2 amplifikáció, gyors proliferáció, célzott kezelésre érzékeny) és a tripla negatív emlőrák (ER-, PR- és HER2-, biológiailag agresszív és heterogén csoport)³⁴. A génexpressziós profilok vizsgálata további finomítást tesz lehetővé, amelyet a PAM50 teszt vezetett be. Ez alapján öt molekuláris alcsoport különíthető el: Luminal A, Luminal B, HER2+, Basal-like és Normal-like. Ezek a csoportok nem csupán a prognózist határozzák meg, hanem azt is, hogy mely jelátviteli utak aktívak a tumorban, így különböző terápiás érzékenységet is előre jelezhetnek. A basal-like és HER2+ altípusokban gyakoribb a genom instabilitás, a fokozott proliferáció és az agresszív lefolyás, míg a luminalis daganatok differenciáltabbak és progressziójuk hormonfüggő³⁵.

A molekuláris klasszifikáció ezért alapvető a prognózis megítélésében és a terápiás döntésekben, de a kemoprevenció szempontjából is meghatározó ugyanis a konvencionális kemopreventív stratégiák nem minden altípus esetén azonos hatékonyságúak.

1.3 Klasszikus kemoprevenciós megközelítések és célcsoportjaik

A kockázatbecslés és a molekuláris klasszifikáció egyre pontosabb eszköztárai ugyan lehetővé teszik a daganatos megbetegedésre való hajlam predikcióját és a daganatok prognózisára való jóslást, ám ennek valódi klinikai jelentősége csak akkor érvényesül, ha ez olyan prevenciós módszerekkel párosul, amelyek a malignus transzformációt még annak korai, fiziológias szöveti állapotában képesek megakadályozni. A kemoprevenció olyan farmakológiai megközelítés, amely a daganatos folyamatok megjelenését megelőző biológiai állapotok modulálásával törekszik csökkenteni a malignus transzformáció valószínűségét és fenntartani a normál szöveti funkciókat³⁶. A módszer legfontosabb jelentősége, hogy mivel a premalignus sejtek még nem halmoztak fel olyan mértékű mutációs terhelést és mikrokörnyezeti átalakulást, mint a már kialakult heterogén sejtállományból álló daganatok, a normál sejtek működése farmakológiai úton jóval fiziológiasabb körülmények között befolyásolható^{36,37}. Továbbá a normál emlő epitheliumban a jelátviteli utak modulációja jóval kisebb dózisok mellett is hatásos lehet, szemben a kialakult tumorokkal, ahol a jelátviteli hálózatok redundánsak, adaptívak, és a tumorsejtek gyorsan rezisztenciát alakítanak ki. Ennek megfelelően a primer kemoprevenció fő célcsoportjai azok az egyének, akiknél a daganat kialakulásának valószínűsége objektíven emelkedett, ugyanakkor még nem áll fenn klinikailag kimutatható malignus elváltozás. A szekunder kemoprevenciós kezelések célcsoportját azok a páciensek képezik, akiknél

kimutatható a premalignus lézió jelenléte, azonban annak malignus transzformációja farmakológiai gátolható. Rajtuk kívül, a kemopreventív kezelés potenciális célcsoportjába sorolhatóak azok a betegek is, akiket korábban sikeresen kezeltek már emlődaganat miatt. Esetükben a terciér prevenció kiemelt jelentőségű, hiszen a kiújulás kockázata évekig megmaradhat. Ez utóbbi két betegcsoport fokozott igényt támaszthat hosszú távú farmakológiai beavatkozásra, mivel számukra a daganat kiújulásának megelőzése közvetlen és erős motivációt jelent, míg sok egészséges, de magas rizikójú nő számára a hosszú távú, gyógyszeres, preventív kezelés elfogadása fenntartásokkal járhat³⁸.

A klasszikus kemoprevenációs megközelítések elsősorban a hormonérzékeny emlőtumor altípusok kialakulásának megelőzésére irányulnak. A szelektív ösztrogénreceptor-modulátorok, mint a tamoxifen és a raloxifen, valamint az aromatázgátlók (pl. anastrozol) bizonyítottan csökkentik az ösztrogénreceptor-pozitív (ER+) emlőrákok incidenciáját magas kockázatú nőknél^{39,40}. A Breast Cancer Prevention Trial eredményei szerint a tamoxifen akár 49%-kal képes csökkenteni az ER+ daganatok kialakulását⁴¹. Az aromatáz gátlók hasonlóan hatékonynak bizonyultak posztmenopauzában⁴². Ennek ellenére alkalmazásukat jelentősen korlátozzák a mellékhatások: thromboembóliás kockázat, endometrium-karcinóma, arthralgia, menopauzális tünetek⁴³. A legfontosabb hiányosság azonban az, hogy ezek a kezelések nem hatékonyak a hormonfüggetlen daganattípusok, így a HER2+ és különösen a tripla negatív emlőrák megelőzésében⁴⁴⁻⁴⁷. Mivel a triplanegatív daganatok az összes eset legalább 15%-át teszi ki és gyakran agresszív viselkedésű daganattípus, olyan alternatív preventív megközelítésekre van szükség, amelyek az ösztrogén jelátviteltől független módon gátolják a transzformáció korai folyamatait⁴⁸. A tripla negatív emlőrák megelőzésében jelenleg alkalmazott megközelítések döntően nem specifikus farmakológiai kemoprevención, hanem kockázatcsökkentő stratégiákon alapulnak. Magas genetikai rizikó esetén, különösen *BRCA1/2* mutációhordozóknál, szóba kerülhet a fokozott klinikai és képalkotó szűrés, valamint a bilaterális rizikócsökkentő mastectomia, amely jelentős kockázatcsökkenést eredményezhet, ugyanakkor invazív és csak jól definiált, magas rizikójú csoportokban alkalmazható megközelítés⁴⁹. A triplanegatív daganatok biológiai agresszivitása, hormonreceptor-negatív jellege és célzott preventív és terápiás lehetőségeinek korlátozottsága miatt továbbra sincs olyan széles körben klinikailag is elfogadott és alkalmazott, jól tolerálható farmakológiai kemoprevenációs stratégia, amely kifejezetten ezen altípus kialakulásának megelőzésére

irányulna^{44,50}. Ez a terápiás és preventív hiányterület különösen indokoltá teszi olyan hormonreceptor-független preventív célpontok azonosítását, amelyek a malignus transzformáció korai folyamatait képesek befolyásolni.

A klasszikus hormonalapú kemoprevenció korlátai miatt különösen értékesek azok a jelátviteli rendszerek, amelyek a sejtciklust, differenciációt és szöveti homeosztázist hormonreceptor-státusztól függetlenül szabályozzák. A retinoid és rexinoid jelátvitel ebbe a kategóriába tartozik, mivel nukleáris receptorokon keresztül több, tumorigenezis szempontjából releváns sejtfunkciót képes összehangoltan befolyásolni.

1.4 Retinoidok és rexinoidok alkalmazása kemoprevencióban

A hormon receptor-független daganatok megelőzésének igénye szükségszerűen olyan új farmakológiai célpontok kereséséhez vezetett, amelyek az ösztrogén- és progeszteron receptortól független mechanizmusokon keresztül képesek beavatkozni a malignus transzformáció korai folyamataiba. A retinoidok kemoprevenziós alkalmazása több évtizede ígéretes kutatási irányként van jelen az onkológiában. Az A-vitamin-származékok már korai állatkísérletes modellekben is képesek voltak mérsékelni a kémiai karcinogének által kiváltott tumoros transzformációt, ami felvetette ezeknek a hatóanyagoknak prevenciós célra való felhasználhatóságát⁵¹. A későbbi klinikai vizsgálatok során a fenretinid mérsékelni tudta az emlődaganat kiújulásának esélyét, ugyanakkor a használhatóságát jelentősen korlátozta kedvezőtlen mellékhatás profilja^{52,53}. A retinoidokon belül az egyik legígéretesebb új alcsoportot a retinoid X receptor (RXR) agonisták, azaz a rexinoidok családja képezte, amelyek a sejtműködés több, egymással összekapcsolt biológiai folyamatának pleiotrop szabályozói.

Az RXR a nukleáris receptor-szupercsalád központi tagja, amely több mint egy tucat partner receptorral képes heterodimert alkotni. A heterodimerizációs partnerek lehetnek egyéb ligandkötő partnerek, mint például VDR, PPAR, RAR, LXR, TR, PXR, ROR, FXR vagy "árva", saját ligand nélküli partnerek COUP-TF I, -II, NGFIB, NURR1, MOR-1, EAR-2, CAR^{54,55}. Az RXR-aktiváció képes a sejtciklus-szabályozására (p21, p27 szabályozása), a terminális differenciáció fokozására, szabályozza a lipid- és glükóz-homeosztázist, továbbá a gyulladásos folyamatokat és a genomstabilitást is képes befolyásolni^{54,56}. A bexarotene (Bex) az elsőként engedélyezett és egyedüli, klinikumban is alkalmazott RXR-szelektív agonista⁵⁷.

Bár kezdetben a kután T-sejtes limfóma kezelésére vezették be, preklinikai vizsgálatokban a rexinoidok az emlőrák megelőzésében is ígéretesnek bizonyultak, különösen hormon receptor-negatív modellekben, ahol a klasszikus hormonális célpontú kemoprevenció hatástalan^{44,58}. Az MMTV-*ERBB2* transzgén egérmodell egy ER-/PR-, HER2+ emlőtumor-modell, amelyben az *ERBB2*/HER2 onkogén emlőmirigy-specifikus expressziója spontán emlődaganatok kialakulásához vezet. Az MMTV-*ERBB2* transzgenikus egérmodellben a bexarotene szignifikánsan késleltette vagy gátolta a tumorok kialakulását, ami a hormonfüggetlen prevenció egyik legmeggyőzőbb bizonyítéka⁵⁷. A klinikai alkalmazást ugyanakkor korlátozza a hatóanyag dózisfüggő mellékhatásprofilja (hyperlipidaemia, hypothyreosis, májenzimek szintjeinek emelkedése), amelyek jelentős akadályt jelentenek főként a hosszú távú preventív alkalmazásában⁵⁴.

A retinoidok és rexinoidok kedvezőtlen mellékhatásai így a kombináció alapú kemoprevenció fejlesztési irányába terelik a kemopreventív megközelítésű kutatásokat, amelynek célja, hogy ezeket a hatóanyagokat alacsonyabb, jobban tolerálható dózisok mellett lehessen alkalmazni, miközben a hatásosság akár szinergia útján fokozható egyéb szerek kombinálásával.

Az egyik első és legkézenfekvőbb megközelítés az ösztrogén receptor-modulátorokkal való kombinálás volt, ahol az RXR-szelektív szintetikus rexinoid (LG100268) különböző szelektív ösztrogén receptor modulátorokkal (tamoxifénnel, arzoxifénnel és acolbifénnel) kombinálva együtt jóval erősebb proliferáció gátlást eredményezett, és több esetben gátolta a daganat kialakulását, mint az egyes szerek egyenként^{59,60}. Ezzel párhuzamosan egy másik kutatási irány a szintetikus oleanán-triterpenoidokkal (CDDO-Me, CDDO-EA vagy CDDO-MA) való rexinoid kombináció hatásait térképezte fel. A triterpenoidok az oxidatív és gyulladásos stresszre adott sejtválaszt (Nrf2, NF- κ B, STAT3) befolyásoló hatóanyagok. Ezen hatóanyagok rexinoiddal való kombinált alkalmazásuk során a proliferáció és az angiogenezis gátlása volt megfigyelhető⁶¹. A rexinoidok és a nonszteroid gyulladásgátló (NSAID) sulindac kombinálása a bélhám polipképződésének számottevő csökkenését eredményezte, miközben a gyulladásos és Wnt-kapcsolt jelátviteli aktivitás jelentősen mérséklődött⁶². A retinoidok és cirkadián ritmus fenntartásáért felelős melatonin kombinációja több vizsgálatban is jelentős kemopreventív hatást eredményezett, továbbá a kialakult tumorok kezelése során is elérhető volt a tumorok ~78%-os regressziója⁶³. A carvedilol (Carv) egy nem szelektív β -adrenerg antagonist, mely az

eddig vizsgálatokban erőteljesen növelte a bexarotene antiproliferatív hatását mind ER+ emlőtumor, mind ER-negatív, immortalizált, normál emlő epithel sejtvonalakban^{64,65}. Korábbi kutatások kimutatták, hogy normál emlő epithel sejtekben a bexarotene és carvedilol kombinációja fokozza az AT-rich interaction domain 1A (*ARID1A*) és a brahma-related gene 1 (*BRG1*) 'SWItch/Sucrose Non-Fermentable' kromatin remodelláló komplex komponenseinek kifejeződését olyan enhancer régiókban, amelyek az epitheliális fenotípust fenntartó génekhez kötődnek, miközben csökkenti a TGF β jelátvitelhez kapcsolt transzkripciós programok (pl. *FoxQ1*, *KLF4*, *TGFBR2*) aktivitását. Ezen mechanizmusok alapján a kombináció képes stabilizálni a sejtpolaritást, csökkenteni az epitheliális-mesenchymális tranzíciót (EMT), mérsékelni a mesenchymális markerek (N-cadherin – *CDH2*, fibronectin-1 - *FNI*) expresszióját és növelni az epitheliális marker E-cadherin (*CDH1*) kifejeződését⁶⁴.

Bár a rexinoidok és retinoidok egyéb hatóanyagokkal történő kombinálására számos példa született, ezek többsége nem alacsony, hosszú távú preventív alkalmazásra is reálisan tolerálható dózistartományban készült, és a kombinációk döntő részénél a szisztematikus dózis-hatás alapú szinergiavizsgálat is hiányzik. A bexarotene és carvedilol esetében rendelkezésre állnak olyan adatok, amelyek igazolják a kombináció szinergikus voltát, más kombinációk esetében azonban továbbra sem egyértelmű, hogy a megfigyelhető hatások szinergikus vagy additív módon érvényesülnek az egyes szerek önálló alkalmazásához képest⁶⁵.

A bexarotene és carvedilol kombinációjára vonatkozó előzetes eredmények alapján, két új kutatási irány bizonyulhat különösen ígéretesnek. Egyrészt szükséges a monoamin jelátvitel perifériás, emlőmirigy fiziológiájában betöltött szerepének feltárása. Továbbá, szükséges a bexarotene és carvedilol közötti szinergikus kölcsönhatásban kulcs-szerepet játszó molekuláris mechanizmusok azonosítása és karakterizálása. Végül, az emlőmirigy extracelluláris mátrixának és az azt formáló regulátoroknak a vizsgálata is fontos szerepet tölthet be a rexinoid alapú kombinációk hatásmechanizmusának megértésében.

1.5 A monoamin jelátvitel szerepe és lehetőségei a hormonfüggetlen kemoprevencióban

A hormonoktól és növekedési faktoroktól független útvonalak egy másik fontos és alulértékelt eleme a monoaminok jelátvitele. A bexarotene és carvedilol közötti szinergia arra utal, hogy a

rexinoidok normál emlő epithel sejtekre kifejtett hatása jelentősen befolyásolható különböző monoaminerg modulátorokkal⁶⁴. A carvedilol nem csak β -adrenerg antagonist, hanem több egyéb monoamin-receptor altípushoz (pl. α_1 -adrenerg, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₆) és a szerotonin (5-HT) transzporterhez (SERT) is mutat affinitást a GtoPdb és ChEMBL farmakológiai adatbázisok alapján⁶⁶⁻⁶⁸. Ez a megfigyelés felveti a 5-HT-, vagy egyéb monoamin receptorcsaládokra ható hatóanyagok rexinoiddal való kombinálását is kemopreventív megközelítésből. A 5-HT-, dopamin-, hisztamin- és muszkarinos acetyl-cholin receptorok közös jellemzője, hogy a legkonzerváltabb G-fehérje-kapcsolt receptor (GPCR) családként monoamin jelátvitel útján a sejtek alapvető állapotváltozásait szabályozzák több szervrendszert összefogó homeosztatisz módon^{69,70}.

A monoamin receptorokhoz asszociált G-fehérjék receptor-aktivációt követően α és $\beta\gamma$ alegységekre esnek szét, és mindkét komponens önálló jelátviteli funkciót tölt be. A G_s-hez kapcsolt receptorok esetén az α alegységek aktiválják az adenylate-cyclase enzimet, növelve a cyclic-adenosine-monophosphate (cAMP) szintet és protein kinase A (PKA) aktivációt indukálva, ugyanakkor a cAMP/PKA útvonal szabályozza az Erk 1/2 aktivitását is. A G_i-fehérjék ezzel szemben csökkentik a cAMP-képződést az α_i alegységen keresztül, miközben a $\beta\gamma$ alegységek képesek közvetlenül aktiválni a phosphoinositide-3-kinase-t (PI3K), phospholipase-C- β -t (PLC β) vagy a mitogén-asszociált kináz (MAPK) útvonalakat, így csupán néhány receptor izoforma szimultán stimulálásából fakadóan is kialakulhatnak egymással ellentétes irányú jeláramok. A G_{q/11} típusú receptorok a PLC β aktiválásán keresztül inositol-monophosphate- (IP3) és diacyl-glycerol (DAG) képződéshez vezetnek, amelyek a Ca²⁺-felszabadulást és a protein kinase C (PKC) izoformák aktivációját eredményezik, mely több ponton keresztül kapcsolódik az Erk-, c-Jun N-terminal kinase (JNK)- és p38-kinase-okhoz, valamint a RhoA/ROCK hálózathoz⁷¹. A jel intenzitását és időbeli lefutását a β -arresztin fehérjék is alakítják, mivel egyrészt receptor-phosphoryláció útján hozzájárulnak a GPCR internalizációjához és deszenzitizációjához, másrészt önállóan működve képesek G-fehérje-független módon aktiválni például az Erk, JNK vagy Akt jelátviteli útvonalakat^{72,73}. A különböző monoamin receptor izoformák ezért gyakran mutatnak jelátviteli bias-t, amelyben egy adott receptor preferáltan egyik vagy másik jelátviteli kaszkádot aktiválja, mely elsősorban a receptor ligand kötésre specifikus konformációs változásain múlik^{74,75}. A G-fehérje által közvetített és a β -arresztin által közvetített útvonalak nem pusztán egymás alternatívái, hanem

részen egymást moduláló, egy- vagy több irányba mutató útvonalak. Ebből következően, a 5-HT receptorok jelátvitel valójában egy dinamikusan integrálódó hálózatként működik, amelyben a receptor altípus, a kötődő ligand, a G-fehérje alegységek disszociációs mintázata és a β -arresztin fehérjék működése együttesen határozza meg a sejten kialakuló jelátviteli választ és a receptor stimulációra adott biológiai választ.

A 5-HT mellett több más monoamin rendszer is potenciálisan célozható jelátviteli rendszerként említhető az emlődaganatok kialakulásának megelőzésére, az eddigi szakirodalmi anyagok alapján. A dopaminerg rendszer például elsősorban a prolaktin hormonhoz kapcsolható jelátvitel modulációján keresztül hat az emlősejtekre. A D2-receptor aktivációja csökkenti a prolaktin felszabadulását, amely hormon kulcsfontosságú a ductalis hám proliferációjában és a laktáció előtti differenciációban⁷⁶. A hisztamin jelátvitel komponensei közül mind a négy hisztamin receptor (H1–H4) expresszálódik normál emlő epithel sejtekben, továbbá mérhető mennyiségű endogén hisztamin található ezekben a sejtekben, jellemzően alacsonyabb mennyiségben, mint az emlőtumor sejtekben⁷⁷. Míg korábbi vizsgálatok alapján a hisztamin nem vált ki jelentős választ normál sejtekben, a tripla negatív tumorsejtekben dóziszfüggő módon képes serkenteni vagy gátolni a proliferációt. Magasabb koncentrációban sejtciklus blokkoló, differenciációt elősegítő és apoptózist fokozó hatást vált ki, továbbá növeli a reaktív oxigéngyökök megjelenését⁷⁷. A muszkarinos acetyl-cholin receptorok (M1, -2, -3) elsősorban emlőtumorokban mutatott fokozott kifejeződésük, proliferációt és angiogenezist serkentő hatásuk alapján emelkednek ki, mint terápiás célpontok. Ezen receptor családok célzott modulálása gyakori, alacsony dózissal kezeléssel hatékonyan gátolta a tumorsejtek osztódását, továbbá két gyakorta használt kemoterápiás szer, a paclitaxel és doxorubicin tumorelleses hatása is kapcsolható részben a muszkarinos acetyl-cholin receptorok gátlásához^{78–80}. Az adrenerg receptorok tekintetében normál emlő epithel sejtekkel (MCF-10A és HBL-100) végzett kísérletek azt bizonyították, hogy ezek a sejtek viszonylag magas β_2 -adrenerg receptor (*ADRB2*) expresszióval és erős G_s /cAMP válasszal rendelkeznek, míg az α_2 -receptor kötőhelyek száma jóval alacsonyabb, és epinephrin vagy β -agonisták (isoproterenol, salbutamol) hatására csökken a proliferáció, mérséklődik a migráció és fokozódik a sejt–mátrix adhézió, részben mesenchymális-epitheliális átrendeződéssel (MET)⁸¹. Ezzel szemben több emlőtumor sejtvonalban (például MCF-7, MDA-MB-231) relatív β_2 adrenerg receptor expresszióbeli csökkenés és α_2 -adrenerg receptor túlsúly figyelhető meg a normál sejtekhez

képest. Ezekben a sejtekben az epinefrin az α_2 -adrenerg receptoron keresztül, Erk-aktiváció révén fokozta a proliferációt, míg szelektív β -agonisták ugyanezekben a sejtekben inkább gátló hatást mutattak. Az α_2 -antagonisták, például a rauwolscin tumornövekedést mérséklő hatást mutatnak *in vivo* xenograft modellekben⁸². Retrospektív vizsgálatok alapján megállapítható, hogy a β -adrenerg receptor antagonisták használata képes volt csökkenteni a tripla negatív emlődaganat kialakulásának rizikóját, továbbá tripla negatív emlődaganatos betegek esetén képes elnyújtani a recidíva- és progresszió mentes időszakot és az emlőtumorra vonatkoztatott túlélés esélyét is emelni^{83,84}.

Összefoglalva, az utóbbi évek eredményei egyre világosabban mutatják, hogy az emlő hámsejtek viselkedése nem kizárólag hormonális és növekedési faktor által vezérelt folyamatok eredménye, hanem érzékenyen reagál olyan monoaminerg jelzésekre is, amelyek az adrenerg-, 5-HT-, dopamin- és hisztamin rendszerekhez kötődnek. Mivel ezek a monoamin jelátviteli útvonalak mindegyike jelentős szerepet tölt be a proliferáció szabályozásában, a normál epitheliumban betöltött funkcióik megértése alapvető jelentőségű a korai transzformáció megakadályozásához. A rexinoidok pleiotrop hatásprofilja, valamint az a megfigyelés, hogy egyes monoaminerg modulátorok, például a carvedilol képes szinergikusan fokozni a bexarotene antiproliferatív hatását, arra utal, hogy a nukleáris receptorok és a GPCR-alapú jelátviteli rendszerek között eddig alulértékelt funkcionális kapcsolat állhat fenn. Ennek feltárása olyan új prevenciós stratégiák alapját teremtheti meg, amelyek a jelenlegi hormon receptor-függő megközelítéseknel szélesebb betegpopulációban alkalmazhatók és alacsonyabb dózisok mellett is hatékonyak lehetnek.

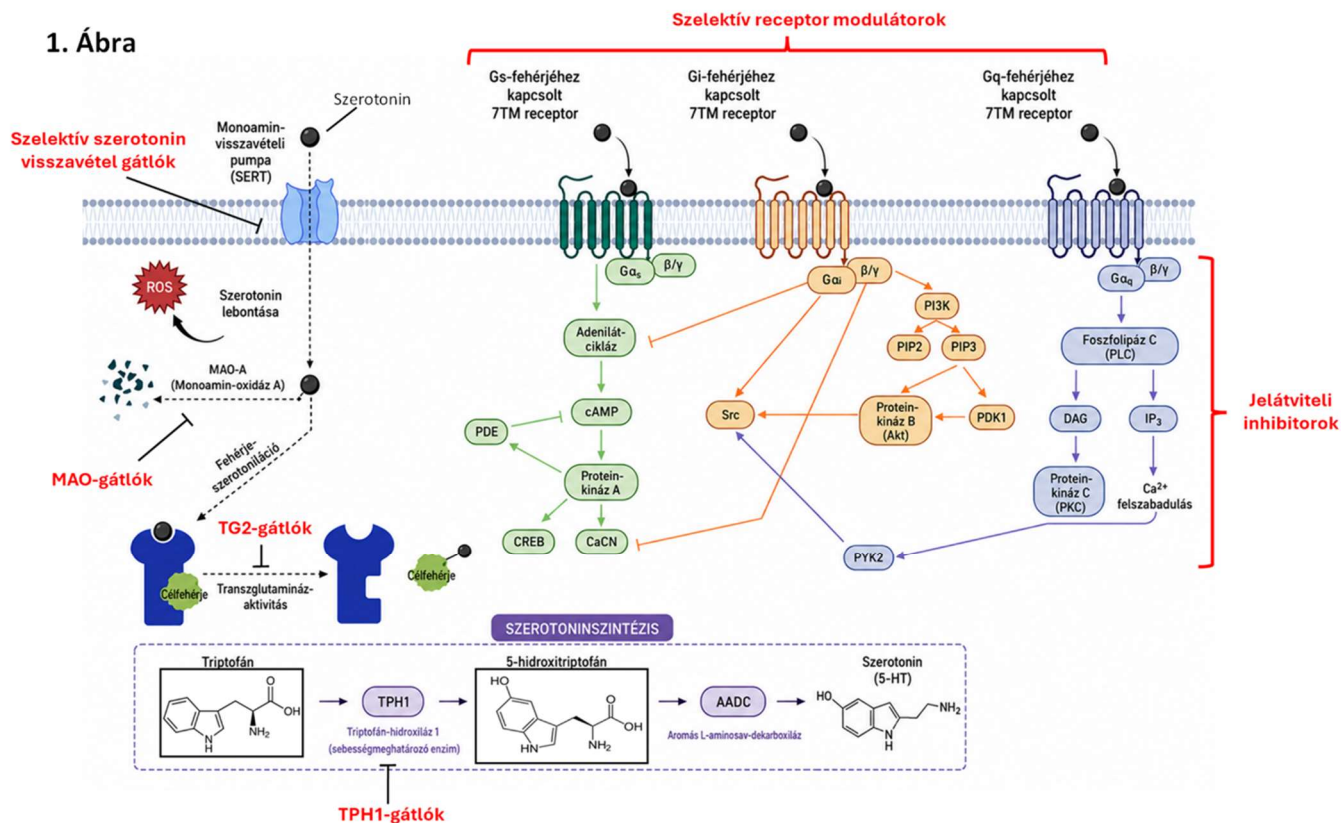
A monoaminerg rendszerek közül a szerotonin jelátvitel különösen releváns kiindulópontot jelentett, mert egyszerre rendelkezik jól ismert farmakológiai eszköztárral és kevésbé feltárt perifériás, epithelialis funkciókkal. A szerotonin rendszer vizsgálata lehetőséget ad arra, hogy elkülöníthető legyen a sejtfelszíni GPCR-mediált jelátvitel, a transzportfolyamatok és az intracelluláris monoamin-metabolizmus lehetséges szerepe. Ezért a következő alfejezet a szerotonin homeosztázis és jelátvitel emlőhámsejtekben releváns komponenseit részletezi.

1.6 A szerotonin jelátvitel és homeosztázis szerepe az emlősejtek működésében

A szerotonin, más néven 5-hydroxytryptamine (5-HT), klasszikusan neurotranszmitterként ismert molekula, ugyanakkor a központi idegrendszeren kívül számos perifériás szövetben is lokálisan termelődik és autokrin vagy parakrin szabályozó faktorként működik. A perifériás 5-HT legnagyobb része nem neuronális eredetű, hanem elsősorban enterochromaffin sejtekhez, thrombocytákhoz és különböző epithelialis szövetekhez kapcsolódik⁸⁵. Emiatt a szerotonin biológiai szerepe nem korlátozható a neurotransmisszióra, hanem részt vesz a vaszkuláris tónus, a thrombocyta-aktiváció, a bélmotilitás, az immunválasz, a csontanyagcsere és a mirigyhámok működésének szabályozásában is⁸⁶.

Az emlőmirigy szempontjából különösen fontos, hogy a hámsejtek maguk is képesek 5-HT előállítására (1. ábra), így a szerotonin lokális szöveti homeosztázist szabályozó faktorként értelmezhető, nem pusztán szisztémásan érkező jelként⁸⁷. Korábbi emlőmirigy-vizsgálatok alapján az emlőhám eredetű 5-HT fontos szerepet játszik a laktációs homeosztázisban, a tight junction-ök szabályozásában, a tejtermelés visszacsatolt kontrolljában és az involúció elindításában^{88,89}.

A 5-HT bioszintézise triptofánból indul ki. A folyamat sebességmeghatározó lépését a tryptophan hydroxylase enzimek katalizálják. A központi idegrendszerben elsősorban a TPH2 izoforma, míg perifériás, nem neuronális szövetekben döntően a *TPH1* izoforma felelős a 5-hydroxytryptophan képződéséért⁸⁵. Ezt követően az aromatic L-amino acid decarboxylase alakítja át a 5-hydroxytryptophan-t 5-HT-ná. Az emlőmirigyben a *TPH1* expressziója különösen a laktációval és az involúcióval összefüggésben jelentős, ami azt támasztja alá, hogy a szerotonin lokális termelése funkcionális jelentőséggel bír a mirigyhám állapotának szabályozásában^{87,89}. *TPH1*-hiányos vagy 5-HT-szintézist módosító modellekben megváltozik az epitheliális 'barrier' funkció, a 'tight junction' dinamika és a laktációs adaptáció. Ez arra utal, hogy az emlőhám által termelt 5-HT aktív szöveti szabályozó mechanizmus része.



1. ábra: Az emlősejtek szerotonin homeosztázisának sematikus áttekintése. A jelátvitelt befolyásoló elemek mellett az egyes farmakológiai beavatkozási lehetőségek is jelöltek piros kiemelő színnel. (Transzglutamináz 2 – TG2, diacyl-glycerol – DAG, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate – PIP2, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, Cyclic adenosine monophosphate – cAMP, reaktív oxigéngyökök – ROS, calcineurin – CaCN, phosphoinositide 3-kinase – PI3K, 7 transzmembrán receptor – 7TM receptor)

A 5-HT sejten belüli és sejten kívüli eloszlását több, egymással összekapcsolt mechanizmus szabályozza (1. ábra). A legismertebb komponens a szerotonin transzporter (SERT), amelyet az *SLC6A4* gén kódol. A SERT nagy affinitású, nátrium- és kloridfüggő transzporter, amely elsősorban az extracelluláris térből veszi vissza a 5-HT-t a sejtekbe. Neuronális környezetben ez a szinaptikus jel lezárásának fő mechanizmusa, de perifériás sejtekben is hasonló logika szerint szabályozza a lokális 5-HT elérhetőségét⁹⁰. A SERT gátlása szelektív szerotonin-visszavétel gátlókkal (SSRI) megnöveli az extracellulárisan elérhető 5-HT mennyiségét, miközben csökkentheti a sejtekbe jutó és ott lebomló szerotonin mennyiségét.

Fontos ugyanakkor, hogy a 5-HT sejtekbe történő bejutása nem kizárólag SERT-függő folyamat. A klasszikus monoamin transzporterek közé tartozik a SERT mellett a dopamine

transzporter (DAT), amelyet az *SLC6A3* gén kódol, valamint a norepinephrine transzporter (NET), amelyet az *SLC6A2* gén kódol. Ezek elsődleges szubsztrátja eltérő, de a monoamin transzporterek között részleges szubsztrát-átfedés lehetséges, így bizonyos sejttípusokban a DAT és a NET is hozzájárulhat 5-HT transzportához⁹⁰. Ezen kívül léteznek úgynevezett 'uptake-2' típusú, alacsonyabb affinitású, de nagyobb kapacitású transzportmechanizmusok is. Ide tartoznak a szerves kation transzporter család tagjai, különösen az *OCT1*, *OCT2* és *OCT3*, valamint a 'plasma membrane monoamine' transzporter (PMAT), amelyet az *SLC29A4* gén kódol. Ezek a transzporterek nem szelektívek egyetlen monoaminra, hanem több biogén amin, köztük a 5-HT, dopamin és noradrenalin sejtfelvételét is közvetíthetik⁹⁰⁻⁹².

A sejten belülrre jutó 5-HT többféle sorsot követhet (1. ábra). Egy része vezikuláris kompartmentekbe kerülhet, ahol a vesicular monoamine transporter család tagjai, különösen a 'vesicular monoamine transporter-2' (*VMAT2*), szerepet játszhatnak a monoaminok szekvesztrációjában. Másik része monoamin-oxidáz enzimek, elsősorban *MAOA* által metabolizálódhat. A 5-HT oxidatív dezaminálása során 5-hydroxyindoleacetaldehyde keletkezik, amelyből aldehide dehydrogenase közreműködésével 5-hydroxyindoleacetic acid képződik. A monoamin-oxidáz által közvetített metabolizmus során reaktív oxigéngyökök is keletkezhetnek, ami összeköti az intracelluláris 5-HT felvételt az oxidatív stresszel és a DNS-károsodással^{86,90}. Ebből következően ugyanaz a molekula eltérő biológiai választ válthat ki attól függően, hogy extracellulárisan receptorokat aktivál, vagy intracelluláris metabolikus útvonalakba kerül.

A 5-HT intracelluláris hatásaihoz a szerotoniláció folyamata is hozzátartozik (1. ábra). A szerotoniláció egy transzglutamináz-2 enzim által katalizált kovalens módosítás, amelynek során a 5-HT glutamin oldalláncokon keresztül kötődik különböző célfehérjékhez. Ez a folyamat kalciumfüggő és a sejten belül rendelkezésre álló 5-HT-t használja fel⁹³. A szerotoniláció gyakran az érintett fehérjék tartós aktivációjához vezet a klasszikus receptor mediált jelátviteltől független módon. A szakirodalomban leírt szerotonilált fehérjék között azonosítottak GTP-ázokat, például a *RHOA* és a *RAB* fehérjecsalád tagjai, amelyek befolyásolják a sejtek motilitását és a membrán komponensek forgalmát⁹⁴. Ezen túlmenően a szerotoniláció epigenetikai szinten is képes hatást kifejteni, mivel a hisztonfehérjék, például a H3 hiszton is célpontja lehet ennek a poszttranszlációs módosításnak⁹⁵. A szerotoniláció emlősejt fiziológiájában betöltött szerepe jelenleg kevésbé feltárt terület, és nem képezi a jelen

doktori munka közvetlen tárgyát. Ugyanakkor ezen mechanizmus figyelembevétele fontos lehet a 5-HT intracelluláris hatásainak teljesebb értelmezéséhez, és potenciálisan új kutatási irányt jelölhet ki jövőbeni vizsgálatok számára.

A 5-HT extracelluláris hatásait több receptorcsalád közvetíti (1. ábra). Emlősökben 14 fő 5-HT receptor altípus ismert. Ezek közül a *5-HT₃* receptor ligandkapuzott ioncsatorna, míg a többi 5-HT receptor G-fehérje-kapcsolt receptor. A *5-HT₁* receptorcsalád tagjai döntően G_i-fehérjéhez kapcsolódnak, és általában csökkentik az adenylate cyclase aktivitását, ezáltal mérséklék a cAMP-szintet. A *5-HT₂* receptorcsalád tagjai G_q-kapcsoltak, így a phospholipase C aktivációján keresztül inositol trisphosphate és diacylglycerol képződést, intracelluláris Ca²⁺ mobilizációt és protein kinase C aktivációt válthatnak ki. A *5-HT₄*, *5-HT₆* és *5-HT₇* receptorok G_s-kapcsoltak, ezért az adenylate cyclase aktiválásán keresztül cAMP-szint emelkedést és protein kinase A aktivációt indukálnak. A *5-HT_{5A}* receptor jelátviteli kapcsoltsága kevésbé egyértelmű, de több rendszerben G_i-asszociált gátló jelátvitellel hozzák összefüggésbe^{70,96,97}.

A 5-HT receptorok farmakológiai széles körben célozhatóak. A *5-HT_{1B/1D}* receptor agonisták, például a triptánok, migrén kezelésében alkalmazott gyógyszerek. A *5-HT₃* receptor antagonisták, például az ondansetron, granisetron és palonosetron, az onkológiai gyakorlatban is jelentősek, mivel kemoterápia-indukált hányinger és hányás megelőzésére használják őket⁹⁸. A *5-HT₄* receptor agonisták és antagonisták elsősorban gastrointestinalis motilitási zavarok kezelésében merültek fel⁹⁹. A *5-HT_{2A}* receptor antagonisták több atípusos antipszichotikum és antidepresszáns hatásprofiljában szerepet játszanak¹⁰⁰. A *5-HT_{2C}* receptor modulációja az étvágy, testsúly és hangulati szabályozás területén bír jelentőséggel¹⁰¹. A *5-HT₇* receptor farmakológiai célzása elsősorban központi idegrendszeri, cirkadián, fájdalom- és hangulatszabályozási összefüggésekben merült fel, de perifériás epithelialis szerepe sokkal kevésbé feltárt^{70,96}.

A 5-HT rendszer farmakológiai modulációja tehát több szinten történhet (1. ábra). A szintézis gátolható *TPHI*-inhibitorokkal, ami csökkenti az endogén perifériás 5-HT képződését. A transzport befolyásolható SSRI-kkel, serotonin-norepinephrine reuptake inhibitorokkal (SNRI), triciklikus antidepresszánsokkal. A receptorok agonistákkal vagy antagonistákkal célzottan aktiválhatók, vagy blokkolhatók. Az intracelluláris lebontás monoamin-oxidáz gátlókkal módosítható. A 5-HT rendszer ilyen többszintű farmakológiai befolyásolhatósága magyarázza, hogy a klinikumban már régóta alkalmazott gyógyszer csoportok, különösen az

SSRI-k, SNRI-k, triptánok, 5-HT₃ antagonisták, antipszichotikumok és egyes gastrointestinalis hatású szerek potenciálisan nemcsak neurológiai vagy pszichiátriai indikációkban, hanem perifériás szöveti jelátviteli kontextusban is biológiai hatással bírhatnak^{70,96}. Az emlőszövetben a szerotonin homeosztázis különösen összetett, mert a 5-HT egyszerre szabályozhatja a hámsejtek barrier funkcióját, szekréciós aktivitását, proliferációját, differenciációját és involúciós választ. Laktáció során a tejtermelés és az alveoláris feszülés visszacsatolt módon kapcsolódik a helyi 5-HT képződéshez¹⁰². A lokálisan termelt 5-HT képes a tight junction-ök megnyitására, a transepithelialis grádiensek megváltoztatására és a tejfehérje-termelés szabályozására. Ezzel a 5-HT egy olyan autokrin-parakrin negatív visszacsatolási rendszert alkot, amely a tejtermelés mennyiségét és az emlőhám funkcionális állapotát a lokális igényekhez igazítja^{103,104}. A 5-HT ezen túl a 'parathyroid hormone-related peptide' indukcióján keresztül a laktációs kalcium-homeosztázis szabályozásában is részt vehet. Ezek a folyamatok eltérő receptorokhoz kapcsolódhatnak, például a tight junction szabályozásban a 5-HT₇, míg a kalcium-homeosztázisban a 5-HT₂ receptorok szerepe merül fel⁸⁷.

A szerotonin homeosztázis zavarai ezért elméletileg a normál emlőhám fiziológiás működését és a korai transzformációra való érzékenységet is befolyásolhatják. A lokális 5-HT termelés, a transzporteraktivitás és a receptor expressziós mintázat együttesen határozza meg, hogy a sejten belül proliferációt, differenciációt, stresszválaszt vagy barrier funkciót módosító hatás dominál. Ebből a szempontból a SERT-gátlás kettős biológiai jelentőséggel bírhat. Egyrészt növelheti az extracelluláris 5-HT elérhetőségét, amely fokozhatja a sejtfelszíni receptorokon keresztül zajló jelátvitelt. Másrészt csökkentheti az intracelluláris 5-HT felvételt és lebontást, ezáltal mérsékelheti a monoamin-metabolizmusból eredő oxidatív stresszt. Ez a kettősség magyarázhatja, hogy az SSRI-k emlődaganat-kockázattal való kapcsolatát vizsgáló retrospektív klinikai tanulmányok miért mutatnak részben ellentmondásos eredményeket. A klinikai hatás valószínűleg nem egyetlen tényezőtől függ, hanem a használt SSRI típusától, SERT-affinitásától, egyéb receptorokra gyakorolt off-target hatásaitól, a beteg hormonális állapotától, az emlőszövet receptorprofiljától, valamint a daganat vagy premalignus szövet molekuláris altípusától is.

Összességében a 5-HT jelátvitel emlőszöveti szerepe olyan többszintű szabályozó hálózatként értelmezhető, amelyben a *TPHI*-függő lokális szintézis, a SERT és alternatív monoamin transzporterek által szabályozott sejtfelvétel, a MAO-függő intracelluláris lebontás, valamint a

G_s-, G_i- és G_q-kapcsolt receptorok által közvetített jelátvitel együttesen határozza meg a sejtes választ. Ez a rendszer több ponton is farmakológiailag célozható, ráadásul számos komponenséhez már klinikailag alkalmazott gyógyszer csoportok kapcsolódnak. Emiatt a szerotonin homeosztázis és receptor-mediált jelátvitel vizsgálata nemcsak az emlőmirigy fiziológiájának megértése szempontjából fontos, hanem új hormonreceptor-független kemopreventív stratégiák megalapozásához is hozzájárulhat.

A szerotonin jelátvitel a doktori kutatás GPCR-központú irányvonalát alapozta meg. A kutatás másik, ettől nem közvetlenül levezethető, de a hormonfüggetlen kemoprevenció szempontjából ugyancsak lényeges irányát az emlőszövet mikrokörnyezetének és extracelluláris mátrixának vizsgálata képezte.

1.7 Az extracelluláris mátrix kompozíciójának szerepe és potenciálja a kemoprevencióban

Korábbi vizsgálatok során már kiderült, hogy a bexarotene és carvedilol kombinációjának hatására epigenetikai szabályozás alapján fokozódik az epitheliális fenotípus fenntartásáért szükséges gének kifejeződése, valamint inaktiváció irányába tolódik el a TGF- β -hoz kapcsolt jelátvitel, mely a mezenchymális fenotípus kialakításáért felelős legjelentősebb útvonal⁶⁴. A daganatok kialakulása során az EMT-vel szoros párhuzamban gyakran megfigyelhető az extracelluláris mátrix komponenseinek újrendeződése (2. Ábra), mely egy tumor működést támogató hálózat kialakítását eredményezi^{105–108}.

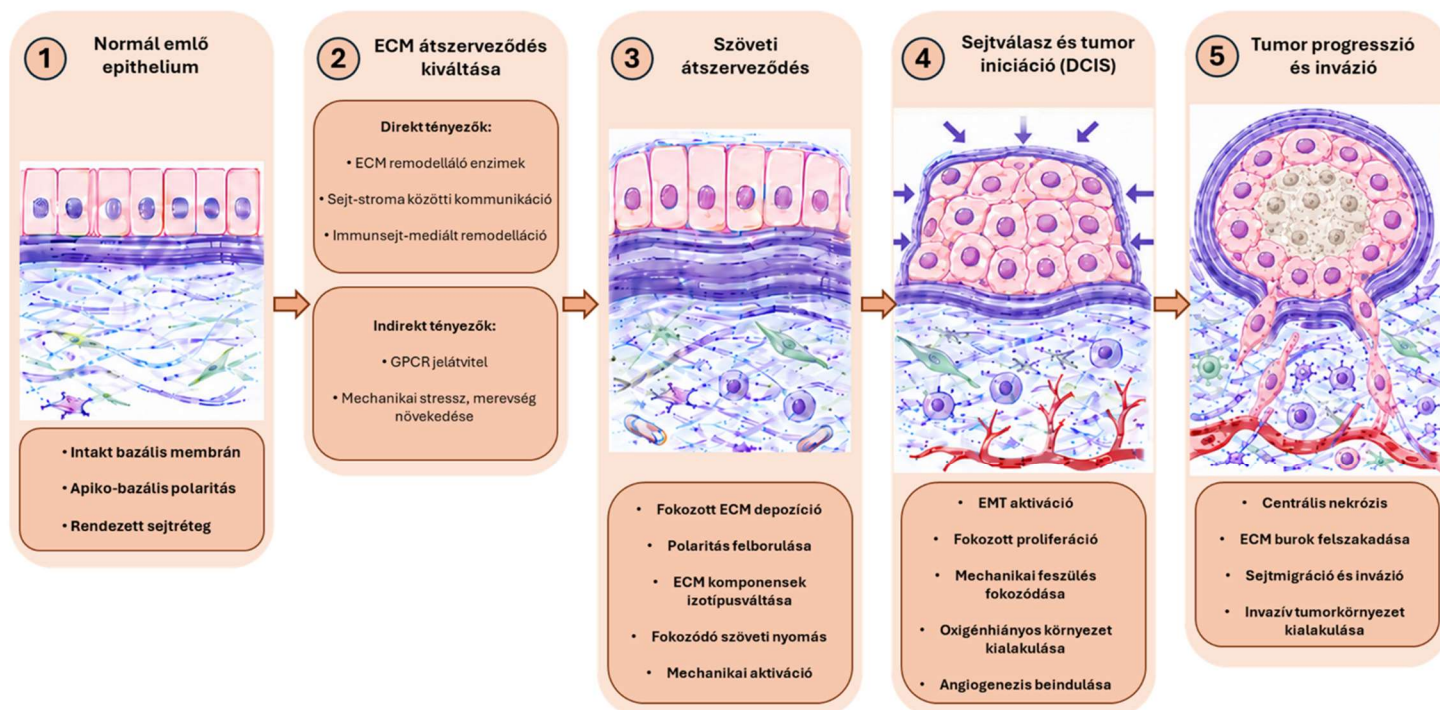
Az emlőszövet extracelluláris mátrixa (ECM) rendkívül összetett, dinamikusan változó hálózat, amely nem csak passzív szerkezeti vázként szolgál, hanem aktív szabályozója a normál emlő hámsejtek proliferációjának, differenciációjának és túlélésének is, elsősorban a mechanoszenzoros és integrin adhézis receptorok jelátviteléből következően¹⁰⁹. Az emlőmirigyben található bazális membrán fő komponensei a IV-es típusú kollagén, a laminin, a nidogen/entaktin és heparán-szulfát proteoglikánok, míg a stromában túlsúlyban vannak az I-es és III-as típusú kollagének, a fibronectinek, tenascin-ek, elasztikus rostok, hialuronán és különböző proteoglikánok. Az ECM összetétele és térbeli szerveződése a fejlődés, a ciklusfüggő hormonális hatások és a terhesség–laktáció–involúció során folyamatosan változik, meghatározva az emlő hámsejteinek lumen-képző kapacitását és a szövet mechanikai tulajdonságait¹¹⁰.

A sejtek az ECM-ből érkező kémiai és mechanikai ingereket több komplementer receptor családon keresztül érzékelik. Központi szerepük van az integrineknek, amelyek heterodimer transzmembrán receptorokként specifikus ECM-ligandokhoz (kollagének, laminin, fibronectin, vitronectin) kötődve fokális adhéziókat hoznak létre, és a fokális adhéziós kináz (*FAK*), Src, *PI3K*–*AKT* és *MAPK* útvonalak aktiválásán keresztül közvetítik a proliferációt, túlélést és migrációt szabályozó jeleket¹¹¹. A discoidin domain receptorok (*DDR1/2*) a fibrilláris kollagénekhez kötődve lassú, de tartós tirozin-kináz aktivációt váltanak ki, míg a szindekánok és más proteoglikánok ko-receptorként segítik a növekedési faktor- és integrin jelátvitel integrációját^{112,113}. A sejtek mechanoszenzitivitásában a citoszkeletonhoz kapcsolt szenzorok, a RhoA–ROCK útvonal, valamint a YAP/TAZ transzkripciósz regulátorok kiemelt jelentőségűek. Merevebb mátrixban fokozódik a stresszrost képződés, nő a YAP/TAZ nukleáris akkumuláció, ami visszacsatolt módon fokozza a kollagén- és LOX-expressziót, tovább erősítve a mátrix merevségét¹¹⁴.

A normál emlőszövettel ellentétben, a tumor-asszociált mátrixra jellemző a kollagén I halmozása, a rostok fokozott keresztkötés-képződése (*LOX* és *LOXL* enzimek), a rostok párhuzamos orientációja a tumor–stroma határon, valamint a bazális membrán fragmentációja és a laminin, valamint a IV-es típusú kollagén eloszlásának megváltozása^{115–117}. Ezek az elváltozások globálisan fokozott szöveti merevséghez vezetnek, amelyet mammográfiás denzitás növekedés, illetve mikroszkópos analízisek is igazoltak humán emlőszövetben¹¹⁸. Az ECM átalakításában központi szerepe van a tumor-asszociált fibroblasztoknak amelyek myofibroblaszt irányú differenciáción mennek keresztül tumorok strómális környezetében. Ezek a sejtek fokozott mértékben termelik a kollagéneket, fibronectint, tenascin-eket, illetve számos proteázt¹¹⁹. Ezen túl az emlő epithel sejtek is aktív résztvevői a mátrix remodelálásának. Az epithel sejtekben már a premalignus elváltozás során fokozottan kifejeződnek azok a gének, amelyek szekretált fehérjéket, glikoproteineket vagy proteázokat kódolnak^{120,121}. A transzformáció és tumor progresszió során átalakított ECM merevebb és lineárisan rendezett kollagénrostjai fokozzák az integrin-függő *FAK*–Src és *RhoA*–*ROCK* jelátvitelt, elősegítve a proliferációt, a sejtciklus előrehaladását és az apoptózis elkerülését^{113,114}. A mátrix-degradáció során keletkező fragmentumok (matrikinek) önálló ligandként képesek migrációt, kemotaxist és angiogenezist serkenteni, például hialuronán, laminin és kollagén IV fragmentumokon keresztül^{122,123}. A remodelált, merev stroma fizikai

gátat képez a kemoterápiás hatóanyagok diffúziója számára, továbbá integrin–növekedési faktor receptor keresztaktiváció révén több célzott terápia és kemoterápia rezisztenciáját is támogatja^{124,125}. Az ECM-merevség és a rossz prognózis közötti kapcsolatot több emlőrák altípus esetén is igazolták^{116,126}.

2. Ábra



2. Ábra: Az extracelluláris mátrix (ECM) átalakulása és hozzájárulása a 'ductal carcinoma in situ' (DCIS) és invazív emlőtumork kialakulásához.

Az ECM-ben bekövetkező változások időben megelőzhetik daganatképződést, ami kiemeli a mátrixot, mint potenciális kemoprevenciós célpontot (2. Ábra). A daganatspecifikus ECM-remodelláció már premalignus léziókban, illetve obesitással társult emlőszövetben is kimutatható, ahol az emelkedett LOX-expresszió, a fokozott kollagén-depozíció és -keresztkötés, valamint a mátrix-szervező fehérjék termelése tumor-promotáló mikrokörnyezetet teremt^{127–129}. Ezt felismerve az utóbbi években több terápiás és preventív megközelítés irányult az ECM közvetlen vagy közvetett célzására. Preklinikai modellekben a LOX-gátlás csökkentette a kollagén keresztkötését, mérsékelte a stromális merevséget, és ezzel az emlőrák invázióját és metasztázis képző képességét is visszaszorította^{130,131}. A mátrix metalloproteinázok (MMP) az emlődaganatban zajló ECM-remodelláció központi enzimeik, amelyek az invázió, az intravazáció és az angiogenesis számos lépésében kulcsszereppel

bírnak¹³². Mivel az *MMP-2* és *MMP-9* túltermelődése rosszabb prognózissal társul, a korai vizsgálatokban felmerült gátlásuk terápiás vagy akár preventív célból¹³³. Bár a preklinikai modellekben a széles spektrumú *MMP*-gátlók hatásosnak tűntek, a klinikai vizsgálatok nem társítottak az alkalmazásukhoz érdemi túlélési előnyt, továbbá musculoskeletalis toxicitás jelentkezett a kezelések során mellékhatásként. A kudarcok hátterében a vizsgált szerek széles specificitása, és a nem megfelelő betegség stádium megválasztása állt, ugyanis az *MMP*-k szerepe kontextusfüggő¹³⁴. A tumor mikrokörnyezet újraszerveződésének jelentőségét emeli ki, hogy annak egyedi struktúráját és a tumorsejtek által termelt számos ECM remodeláló enzim magas környezeti jelenlétét használják ki az újabb, innovatív hatóanyag-leadó rendszerek is. Az újabb koncepciók alapja, hogy olyan inaktív hatóanyag formulát juttatnak a szervezetbe, mely a tumor mikrokörnyezet hatására szabadítja fel az aktív hatóanyagot például *MMP*-k katalizálta enzimatis reakciókat követően^{135,136}. Továbbá pancreas- és emlődaganatokban felmerült annak a jelentősége is, hogy a merev ECM mátrix enzimatisan megnyitható-e annak érdekében, hogy javítsák a kemoterápiás szerek tumorba jutását^{137,138}. Bár az ezzel kapcsolatos eredmények ellentmondásosak, maga a farmakológiai koncepció további kísérleteket igényelne a végleges konklúziók levonása érdekében. Ahogy az a szakirodalmat áttekintve is jól látható, az ECM-et célzó kezelések jelentős többsége az átalakításért felelős effektor fehérjéket jelöli ki célpontként, ugyanakkor a remodelálást kiváltó kulcs faktorok eddig ismeretlenek.

A retinoidok és rexinoidok a bőr- és egyéb szövetekben is bizonyítottan képesek befolyásolni az extracelluláris mátrix összetételét és dinamikáját. Ezek a folyamatok tetten érhetőek például A-vitamin hiány esetén is, amikor is számos ECM fehérje termelése csökkenést mutat, ezzel számos klinikai elváltozást manifesztálva (xerophthalmia, tranzicionális és mirigyhám laphamos metapláziája) és több szerv normál szöveti struktúrájának fejlődését gátolva. A retinsav számos mátrixfehérje, például kollagének, fibronectin, thrombospondin vagy lamininek termelését szabályozza¹³⁹. Ezek az alapmechanizmusok a klinikai és kozmetológiai gyakorlatban is kiemelt jelentőséggel bírnak a felhasználás szempontjából¹⁴⁰. Ide tartozik például bőrgyógyászatban alkalmazott tretinoin által kiváltott kollagén-újrarendeződés, vagy a keloid- és hipertrofiás hegképződésben tapasztalt retinoid-érzékenység^{141–143}. Más szövetekben, például máj- és hasnyálmirigy fibrózisos modelljeiben a retinoidok csökkentik a kollagén-depozíciót és a stromális sejtek kontraktilis fenotípusát^{144–146}. A rexinoidok

emlőtumor sejtekben csökkentik több ECM-asszociált faktor (*MMP*, Tenascin-C, Periostin) expresszióját, ami arra utal, hogy képesek lehetnek mérsékelni azokat a stromális változásokat, amelyek a rigiditás fokozásán keresztül hozzájárulnak az invazív fenotípust támogató matriczóma kialakulásához^{147,148}. Bár ezek az összefüggések nem egyetlen, direkt hatásra vezethetők vissza, mégis jól jelzik, hogy a retinoid- és rexinoid-jelátvitel több ponton is képes beavatkozni az ECM-remodelláció szabályozásába, ezáltal releváns szereplője lehet a stromális mikrokörnyezet kemopreventív célú modulálásának.

A sejtek mechanoszenzoros tulajdonságai lehetővé teszik, hogy folyamatosan érzékeljék és értelmezzék az extracelluláris mátrix mechanikai jellemzőit, például annak merevségét, rugalmasságát vagy topográfiáját. Ezen mechanoszenzoros útvonalakat tekintve megfigyelhető, hogy számos GPCR közvetlenül vagy közvetve szabályozza az integrin-aktivációt, a fokális adhéziónak kialakulását, a RhoA–ROCK útvonalat, valamint a FAK és MAPK jelátvitel elemeit. Az 5-HT_{2B} receptorok aktivációja fibroblasztokban TGF- β -függő kollagén- és kötőszöveti növekedési faktor (*CTGF*) termelést indítja be¹⁴⁹. A β -adrenerg receptor agonisták hatására invazívabb tumor fenotípus alakul ki, mely magában foglalja az emlőtumor sejtek fokozott migrációját, invadopodia képzését és az emelkedett metasztázisképzést *in vivo*^{150,151}. A β -adrenerg receptor agonisták hatására petefészek daganatban is megfigyelhető a metalloproteázok (*MMP-2*, *MMP-9*) termelésének emelkedése, ugyanakkor ezeknek a metalloproteázoknak a gátlása képes visszaszorítani a tumorsejtek invazív potenciálját¹⁵². Ezzel szemben, β -adrenerg receptor antagonisták alkalmazásával csökkenthető az emlőtumor sejtek migrációs és inváziós képessége¹⁵³. A monoamin GPCR-ek mechanoszenzoros szabályozásban betöltött jelentőségét emeli ki, hogy egy frissebb tanulmány alapján, a β -adrenerg receptor jelátvitel képes stimulálni a *RhoA-ROCK-NMII* jelátviteli kaskád aktivitását. Ez utóbbi eredmény direkt bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a stressznek jelentős szerepe van metasztázisképzés és invázió kialakításában¹⁵⁴. Mivel a jelenlegi ismeretek túlnyomó része tumorsejtes és fibroblaszt-alapú modellekből származik, jelentős igény támasztható a monoamin GPCR-ek ECM-szabályozó szerepének normál emlő hámra és fiziológiás stromára vonatkozó vizsgálatára.

Az elmúlt évek eredményei egyértelműen rámutattak, hogy az emlőszövet mikrokörnyezetének átalakulása alapvetően meghatározza a korai tumorigenezis dinamikáját. Bár a retinoid- és

GPCR-mediált jelátvitel több ponton képes befolyásolni az ECM szerveződését és a stromális válaszokat, a rendelkezésre álló ismeretek túlnyomó része nem fiziológias, vagy premalignus emlőszöveti komponensek vizsgálatából származik, így e mechanizmusok normál emlő hámsejtekben betöltött szerepe továbbra is jórészt feltáratlan. E hiányzó tudás különösen jelentős, mivel a premalignus állapotban zajló mikrokörnyezet átalakulás potenciálisan olyan korai, reverzibilis pontokat kínálhat, amelyek gyógyszeresen célzottan modulálhatók.

Az ECM-remodelláció tumorigenezisben betöltött jelentősége felveti azt a kérdést, hogy mely felsőbb szabályozási pontok képesek egyszerre befolyásolni a mátrix szerveződését, a sejtmozgást és a proliferációt. A doktori kutatás során ezért különös figyelmet fordítottunk azokra a szekretált faktorokra, amelyek nem csupán strukturális ECM-komponensként, hanem a tumorpromotáló szöveti állapot aktív alakítóiként értelmezhetők.

1.8 A Zymogene Granule Protein 16B szekretált faktor, mint mátriszóma újrászerveződést támogató új célpont

A malignus transzformáció során a sejtek és a mikrokörnyezet között kölcsönös, dinamikus kommunikáció alakul ki, amelyben a szekretált fehérjék, növekedési faktorok, kemokinek és mátrix-asszociált regulátorok különösen fontos szerepet töltenek be. Ezek a faktorok képesek egyszerre befolyásolni a sejtosztódást, a túlélést, a migrációt, az adhéziót, az immunsejtek toborzását és az extracelluláris mátrix szerveződését. Emiatt az ECM újrászerveződésének megértéséhez nem elegendő kizárólag a mátrix szerkezeti komponenseit vagy lebontó enzimeit vizsgálni. Legalább ilyen fontos azoknak a felsőbb szabályozási pontoknak az azonosítása, amelyek képesek a mátrix-remodellációt, a sejtmozgást és a proliferációt összehangolt módon befolyásolni. Ebbe a koncepcionális keretbe illeszkedik a 'Zymogen Granule Protein 16B' (*ZG16B*), más néven pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF), amelyet több daganattípusban is tumorpromotáló, szekretált regulátorként írtak le^{155–157}.

A *ZG16B* gén által kódolt ZG16B fehérje a zymogen granule protein 16 család tagja. A fehérje szekretált, lektinszerű tulajdonságokkal rendelkező molekula, amely szerkezeti vizsgálatok alapján 'Jacalin-related β -prism fold' szerkezeti motívummal rendelkezik¹⁵⁸. Korábbi vizsgálatok alapján a PAUF nem egyszerűen egy expressziós markernek bizonyult, hanem részt vett a hasnyálmirigy daganatsejtek viselkedésének szabályozásában. A PAUF expresszió fokozódása összefüggést mutatott a tumorsejtek növekedésével, migrációjával és invazív

tulajdonságaival, míg funkcionális gátlása vagy csendesítése több kísérleti rendszerben mérsékelte a daganatsejtek agresszivitását^{155,157,159}

A *ZG16B* egyik legfontosabb sajátossága, hogy szekretált fehérjeként autokrin és parakrin módon is hathat. Ez azt jelenti, hogy nem csak az azt termelő tumorsejtek viselkedését módosíthatja, hanem a környező daganatsejteket, stromális sejteket, endothel sejteket és immunsejteket is befolyásolhatja. Hasnyálmirigy daganatokban kimutatták, hogy a PAUF fokozza a *CXCR4* expresszióját, és ezen keresztül elősegítheti a migrációt és metasztázisképzést¹⁵⁷. Egy másik vizsgálat alapján a PAUF a *TLR/CXCR4* útvonal szabályozásán keresztül támogatta a metasztatikus viselkedést¹⁵⁶. További adatok szerint a PAUF a focal adhesion kinase (*FAK*) jelátvitel modulálásán keresztül fokozza a daganatsejtek adhézis tulajdonságait, ami közvetlen kapcsolatot teremt a sejtfelszíni kapcsolódási mechanizmusok, a migráció és az extracelluláris környezet érzékelése között¹⁵⁹. A *ZG16B* daganatprogressziót támogató hatásai több, egymással összekapcsolódó jelátviteli mechanizmushoz köthetők. Hasnyálmirigy daganatokban a PAUF serkenti a β -catenin expresszióját, ami fokozott proliferációval társulhat¹⁶⁰. Más vizsgálatok a *TLR4/MyD88/NF- κ B* útvonal szerepét emelték ki a PAUF által kiváltott migrációban¹⁶¹. Ezek mellett a *CXCR4*, *FAK*, Akt és *MAPK* útvonalak érintettsége is arra utal, hogy a *ZG16B* egy olyan extracelluláris szabályozó faktor, amely több klasszikus tumorpromotáló jelátviteli tengelyt képes aktiválni vagy modulálni. Ezen útvonalak közös jellemzője, hogy nem kizárólag a proliferációt befolyásolják, hanem a sejtek polaritását, adhézióját, citoskeletális átrendeződését, motilitását és invazivitását is szabályozzák. Emiatt a *ZG16B* biológiai hatása nem szűkíthető le egyetlen jelátviteli mechanizmusra. Inkább olyan szekretált szabályozási csomópontként értelmezhető, amely több, daganatprogresszióban központi jelentőségű sejtfunkciót kapcsol össze^{156,157,159–161}. A *ZG16B* jelentőségét tovább erősíti, hogy hatása nem korlátozódik a tumorsejtekre. Hasnyálmirigy daganatokban a PAUF endothel aktivátorként is működhet, fokozva az angiogenezist és a vascularis permeabilitást¹⁶². Ez arra utal, hogy a *ZG16B* a tumor mikrokörnyezet vascularis komponenseit is átprogramozhatja. Emellett kimutatták, hogy a PAUF elősegíti myeloid eredetű immunosuppresszív sejtek felhalmozódását, valamint monocyták M2-szerű, immunosuppresszív makrofág irányú átalakulását is támogathatja^{163,164}. Ezek az eredmények a *ZG16B*-t a tumor mikrokörnyezet szélesebb szabályozójaként helyezik

el, amely nem csak a sejtmotilitást és proliferációt, hanem az angiogenezist és az immunmikrokörnyezetet is befolyásolhatja.

A *ZG16B* funkcióit más daganattípusokban is vizsgálták. Colorectalis daganatban a PAUF/*ZG16B* progressziót támogató szerepét írták le, amelyet a mitotikus funkciók és a Wnt/ β -catenin útvonal módosulásával kapcsoltak össze¹⁶⁵. A Wnt/ β -catenin tengely a proliferáció, sejtorszabályozás és epithelialis plaszticitás egyik alapvető regulátora. A colorectalis daganatos eredmények továbbá megerősítik, hogy a *ZG16B* nem kizárólag hasnyálmirigy-specifikus faktor, hanem szélesebb daganatbiológiai jelentőséggel bíró szabályozó molekula lehet. A *ZG16B* terápiás célpontként való értelmezését alátámasztja, hogy PAUF-ellenes monoklonális antitest fejlesztése is elindult. A PBP1510, illetve ulenistamab egy anti-PAUF humanizált *IgG1* monoklonális antitest, amelyet előrehaladott vagy metasztatikus hasnyálmirigy daganatok kezelésére vizsgálnak. A PAUF-I vizsgálat (NCT05141149) elsőként humánban végzett, nyílt elrendezésű, fázis 1/2a klinikai vizsgálat, amelyben a PBP1510-et önmagában és gemcitabinnal kombinálva is értékeli előrehaladott vagy metasztatikus hasnyálmirigy daganatban^{166,167}. Ez a transzlációs fejlesztési irány nem bizonyítja önmagában a *ZG16B* terápiás értékét emlődaganatban, de azt jelzi, hogy a fehérje kellően tumorspecifikusnak és biológiailag relevánsnak bizonyult ahhoz, hogy célzott antitestterápia fejlesztésének alapját képezze.

A *ZG16B* emlődaganatban betöltött szerepe a hasnyálmirigy daganatokhoz képest kevésbé feltárt, de több adat alapján releváns lehet. Bioinformatikai elemzések alapján a *ZG16B* expressziója emlődaganatokban emelkedett lehet, és kapcsolatot mutathat klinikai, illetve molekuláris jellemzőkkel¹⁶⁸. Fontos megjegyezni, hogy ezek az adatbázis-alapú vizsgálatok elsősorban korrelatív jellegűek. Ezért önmagukban nem bizonyítják, hogy a *ZG16B* funkcionálisan is hozzájárul az emlődaganat progressziójához. Ugyanakkor a hasnyálmirigy- és colorectalis daganatokban leírt hatások alapján megalapozottan vetik fel, hogy a *ZG16B* emlőszövetben is képes lehet a proliferáció, motilitás és mikrokörnyezeti átalakulás szabályozására.

Az emlődaganat szempontjából különösen fontos, hogy a *ZG16B* ismert funkciói több ponton kapcsolódnak azokhoz a folyamatokhoz, amelyek az emlőszövet tumorpromotáló átprogramozódását jellemzik. A magas mammográfiás denzitás, az ECM fokozott kollagén- és fibronectin-tartalma, a stromális merevség emelkedése és a mechanoszenzitív jelátvitel

aktivációja mind olyan változások, amelyek elősegíthetik a malignus transzformációt és a tumorprogressziót. Ha egy szekretált faktor egyszerre képes proliferációt, migrációt, adhézis átrendeződést és ECM-asszociált génprogramokat befolyásolni, akkor potenciálisan olyan korai szabályozási pontot képviselhet, amely összekapcsolja az epithel sejtek viselkedését a stromális környezet átalakulásával. Ez a szempont különösen fontos kemoprevenziós megközelítésben, ahol nem csak a már kialakult daganatsejtek elpusztítása, hanem a tumorképződést támogató mikrokörnyezeti állapot kialakulásának megelőzése is cél lehet.

A *ZG16B* ilyen értelemben nem csupán egy újabb daganat-asszociált markernek tekinthető, hanem olyan potenciális központi effektornak, amely a sejtosztódás, motilitás és ECM újrászerveződés közös szabályozásában vehet részt. Ez indokolja, hogy a rexinoid és monoamin jelátvitel közötti szinergia vizsgálata során a *ZG16B* kiemelt célgénként kerüljön előtérbe. Amennyiben a rexinoid alapú kombinációs kezelések képesek csökkenteni egy olyan szekretált tumorpromotáló faktor expresszióját, amely több szinten is támogatja a daganatprogressziót, akkor a *ZG16B* szuppressziója nem pusztán egy downstream expressziós változásként értelmezhető. Inkább olyan funkcionális következményként, amely hozzájárulhat a proliferációs, migrációs és mátrix-remodellációs folyamatok együttes fékezéséhez.

2. Célkitűzések

Az emlőrák megelőzésének egyik alapvető kihívása, hogy a jelenleg klinikailag alkalmazott farmakológiai kemopreventív stratégiák döntően hormonreceptor-függő mechanizmusokra épülnek. Ez különösen korlátozó azokban az esetekben, amikor a daganat kialakulása vagy progressziója nem az ösztrogén jelátvitel dominanciájához kötődik. A hormonfüggetlen emlőtumorkok, különösen a tripla negatív és HER2+ altípusok esetén ezért olyan alternatív preventív célpontok azonosítására van szükség, amelyek a normál vagy premalignus emlőszövetben még fiziológiásabb szabályozási környezetben befolyásolhatók.

Jelen doktori kutatás központi kérdése az volt, hogy a perifériás monoamin jelátviteli útvonalak és a rexinoid jelátvitel kombinált farmakológiai modulációja alkalmas lehet-e hormonreceptor-státusztól független kemoprevenziós mechanizmusok feltárására. A munka alapfeltevése szerint a normál emlő epithel sejtekben jelen lévő monoaminerg jelátviteli hálózatok képesek a proliferációt, a motilitást és a mikrokörnyezeti átrendeződést is befolyásolni. Ennek megfelelően a kutatás célja nem egyetlen hatóanyag hatásának leírása volt, hanem olyan

jelátviteli mechanizmusok és molekuláris célpontok karakterizálása, amely hosszabb távon biztonságosabb, alacsonyabb dózisú és szélesebb betegpopulációban alkalmazható preventív stratégiák alapját képezheti.

A célkitűzéseket az alábbi, egymásra épülő tudományos kérdések és hipotézisek mentén fogalmaztam meg:

1. A szerotonin jelátvitel farmakológiai modulálható normál emlő epithel sejtekben?

A kiinduló hipotézis szerint a normál emlő epithel sejtekben jelen vannak a 5-HT szintéziséhez, transzportjához és receptor-mediált jelátviteléhez szükséges fő komponensek. Ennek vizsgálata során célom volt meghatározni, hogy a sejtek képesek-e 5-HT előállítására, kifejezik-e a szerotonin jelátvitel alapvető elemeit, valamint, hogy a 5-HT transzporter farmakológiai modulációja emlősejtekben milyen biológiai válaszokhoz vezethet.

2. A szerotonin intra-/extracelluláris eloszlásának milyen jelentősége van a proliferáció szabályozása szempontjából?

A második hipotézis szerint a 5-HT hatása kettős biológiai rendszerként értelmezhető. Az extracelluláris 5-HT sejt felszíni receptorokon keresztül indíthat jelátviteli folyamatokat, míg az intracelluláris felvétel a monoamin lebontásával összefüggő mechanizmusokhoz kapcsolódhat. Ezért célom volt a SERT gátlás, a külső 5-HT stimuláció, valamint a receptor szelektív farmakológiai modulációjának összevetése annak érdekében, hogy elkülöníthető legyen a receptor-mediált proliferációszabályozás és az intracelluláris monoamin hatások szerepe. Ezzel párhuzamosan célként jelent meg azoknak a jelátviteli elemeknek az azonosítása is, amelyek a szerotonin rendszert potenciális kemoprevenziós célpontként kiemelhetik.

3. A receptor izoforma vagy a hozzá kapcsolt jelátvitel modulációja lehet meghatározó a proliferáció szabályozásában?

A harmadik hipotézis szerint a monoamin receptorok proliferációra gyakorolt hatását nem kizárólag az határozza meg, hogy melyik receptorcsalád aktiválódik. Legalább ilyen fontos lehet, hogy az adott receptor milyen G-fehérje-kapcsoltságú jelátviteli útvonalba csatornázza a külső jelet. Ennek megfelelően célom volt megvizsgálni, hogy a G_s -, G_i - és G_q -kapcsolt receptorútvonalak eltérő módon befolyásolják-e a normál emlő epithel sejtek növekedési

válaszát. A szerotonin receptorokon túlmenően a vizsgálat célja az volt, hogy más monoamin receptorcsaládok farmakológiai modulációjával is tesztelhető legyen ez a jelátviteli elv, és ezzel szélesebb körben azonosíthatók legyenek lehetséges preventív célpontok.

4. Képes-e a szerotonin jelátvitel célzott modulációja potenciálni az ismerten kemopreventív hatású rexinoid bexarotene proliferációt gátló hatását normál emlő epithel sejtekben?

A negyedik hipotézis szerint a monoaminerg útvonalak és az RXR-agonista bexarotene hatásai funkcionálisan összekapcsolódhatnak normál emlő epithel sejtekben. Korábbi carvedilol és bexarotene kombinációs eredmények és az általunk azonosított monoaminerg stimuláció alapú antiproliferatív mechanizmus felvetette, hogy a carvedilol-on kívül más hatóanyagok is potenciálhatják a rexinoid bexarotene hatását. Ezek alapján célom volt annak vizsgálata, hogy a szerotonin jelátvitel modulációja képes-e szinergikusan erősíteni a bexarotene növekedést gátló hatását.

5. Milyen közös molekuláris mechanizmusok és kombinációspecifikus célgének állhatnak a monoamin és rexinoid alapú szinergiák hátterében?

Az ötödik hipotézis szerint a monoamin jelátviteli modulátorok és rexinoidok közötti szinergia kombinációspecifikusan szabályozott molekuláris célpontokhoz kapcsolódhat. Ennek vizsgálatára célom volt olyan génexpressziós és kromatin szintű változások azonosítása, amelyek több szinergikus kombináció hatásával is összefügghetnek. Kiemelt kérdés volt, hogy a bexarotene alapú kombinációk képesek-e epigenetikai szabályozáson keresztül – például az *ARID1A* és SWI/SNF complex működésének befolyásolása révén - olyan célgének expresszióját módosítani, amelyek a tumorképződést vagy tumor progressziót elősegítő folyamatok (proliferáció, a sejtmotilitás és a mikrokörnyezeti átprogramozódás) szabályozásában vehetnek részt.

6. Milyen biológiai folyamatok szabályozásában tölt be kulcsszerepet a ZG16B gén rexinoid-monoaminerg szinergikus kombinációk általi szuppressziója?

A hatodik hipotézis szerint a Zymogene Granule Protein 16B a rexinoid alapú kombinációs kezelések egyik *ARID1A* és SWI/SNF complex által szabályozott célgénje. Korábbi szakirodalmi adatok alapján a *ZG16B* egy olyan szekretált regulátor, amely funkcionálisan is hozzájárulhat a tumorképződést és progressziót támogató szöveti

átrendeződéshez^{157,159,161,165,167}. Ennek megfelelően célom volt megvizsgálni, hogy a *ZG16B* expressziójának vagy extracelluláris jelenlétének megváltozása befolyásolja-e a normál emlő epithel sejtek és emlőtumor sejtek proliferációját, migrációját, adhézis viselkedését, valamint az extracelluláris mátrixhoz és epithelialis plaszticitáshoz kapcsolódó génprogramokat. Ez a célkitűzés a *ZG16B*-t a kombinációs kezelések lehetséges funkcionális mediátoraként és új preventív célpontként helyezte vizsgálataink középpontjába.

Összefoglalva, a doktori kutatás célja egy olyan, hormonreceptor-státusztól független kemoprevenziós koncepció kísérletes megalapozása volt, amely a perifériás monoamin jelátvitel, a rexinoid alapú szinergikus kombinációk és az extracelluláris mátrixot szabályozó szekretált faktorok kapcsolatára épül. A fenti kérdések vizsgálata lehetővé tette annak tesztelését, hogy a normál emlő epithel sejtekben jelen lévő GPCR-mediált jelátviteli útvonalak hogyan kapcsolhatók össze rexinoid alapú kombinációs kezelésekkal, és hogy e kombinációk milyen molekuláris célpontokon keresztül befolyásolhatják a tumorképződést támogató mikrokörnyezeti folyamatokat.

3. Anyagok és Módszerek

3.1 Sejtvonalak és sejtenyésztés

A vizsgálatok során humán emlőtumor sejtvonalakat (MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC1143), immortalizált primer humán emlő hámsejteket (HME-hTert) és humán embrionális vesesejteket (HEK293) alkalmaztunk. A sejtvonalak főbb daganatbiológiai karakterisztikáit az 1. táblázat tartalmazza. Az MCF7, T47D és HEK293 sejtek Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), míg az MDA-MB-231, MDA-MB-468 és HCC1143 sejtek RPMI-1640 tápfolyadékokban kerültek tenyésztésre. A tumorsejtek tenyésztéséhez használt tápfolyadékokat 10% (v/v) hőinaktivált főtális borjú szérummal, valamint 1% (v/v) penicillin–streptomycin–L-glutamin hozzáadásával egészítettük ki. A HME-hTert sejtek Mammary Epithelial Basal Medium (MEBM) tápfolyadékban voltak fenntartva és kezelve, melyet Mammary Epithelial Cell Growth Media (MEGM) növekedési faktor keverékkel egészítettünk ki.

A sejtvonalak hitelesítése újgenerációs genom szekvenálás segítségével történt, a mikoplazma-mentességet Promokine PCR-alapú teszttel rendszeresen ellenőriztük. A kísérleteinkben a

sejtek kizárólag 15. passzázs előtti állapotban kerültek felhasználásra. Minden sejttípus 37 °C-on, 5% szén-dioxidot tartalmazó párasított atmoszférában volt tenyésztve.

Sejtvonal	Sejttípus	Molekuláris altípus	Receptorstátusz
MCF7	Humán emlőtumor sejtvonal	Luminalis A	ER+, PR+, HER2-
T47D	Humán emlőtumor sejtvonal	Luminalis A	ER+, PR+, HER2-
MDA-MB-231	Humán emlőtumor sejtvonal	Basal-like / tripla negatív	ER-, PR-, HER2-
MDA-MB-468	Humán emlőtumor sejtvonal	Basal-like / tripla negatív	ER-, PR-, HER2-
HCC1143	Humán emlőtumor sejtvonal	Basal-like / tripla negatív	ER-, PR-, HER2-
HME-hTert	Immortalizált primer humán emlő hámsejt	Normál emlő epithel modell	-
HEK293	Humán embrionális vesesejt	-	-

1. táblázat: A kutatás során használt sejtvonalak összehasonlítása sejttípus, molekuláris altípus és receptorstátusz alapján. (Ösztrogén receptor – ER, progeszteron receptor – PR, humán-epidermális növekedési faktor receptor 2 – HER2)

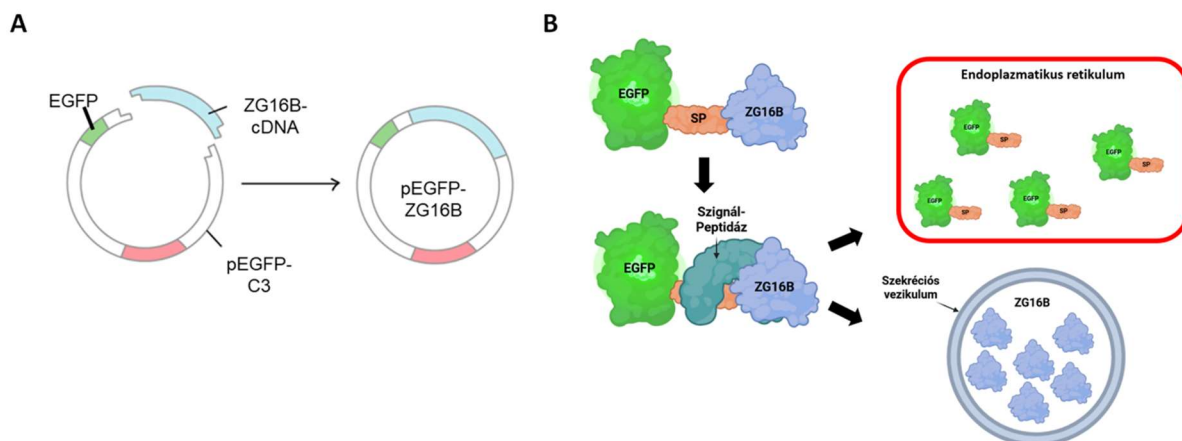
3.2 ZG16B klónozása expressziós vektorba

A ZG16B szekretált faktor előállítása céljából egy egyedi expressziós rendszert alakítottunk ki, melynek alapját egy pEGFP-Empty emlős expressziós vektor képezte. RT-PCR segítségével HME-hTert RNS mintákból átírtuk a ZG16B cDNS-ét reverz transzkriptázzal, melyet ezután amplifikáltunk. A PCR során az amplifikált cDNS mindkét végére restriktációs enzim hasítási helyeket illesztettünk (EcoRI, SalI). A restriktációs hasítási helyeket kihasználva emésztést követően a cDNS-ünket pEGFP-C3 vektorba ligáltuk T4 DNS ligázt használva (3A ábra). A konstrukt tervezése során figyelembe vettük azt, hogy a ZG16B-t kódoló cDNS első szakasza egy szignálpeptidet kódol, így ezt a régiót is belevettük a primerek (forward primer: 5'-CATAGAATTCAGATGGGGGCCAGGGGGGCCAG-3'; reverse primer: 5'-CATAGTCGACTTAGCGACCCACGGGTGAGTTTGCTGAGTA-3') által közrefogott, amplifikált szekvenciába. Így az általunk felépített vektorban, a kódolt fúziós fehérje a következőképp épült fel: N-terminális vég - EGFP - szignál peptid – ZG16B – C-terminális vég. Ennek a tervezésnek köszönhetően a fehérje transzlációja során az endoplazmatikus retikulumhoz irányul, és a szignálpeptidáz enzim a szignál peptiddel együtt lehasítja az EGFP molekulát a szekrécióra kerülő ZG16B-ről (3B ábra).

Ezáltal a transzfekció során lehetőségünk nyílt a hatékonyság monitorozására, mely a kísérletek során meghaladta a 80%-ot. A sejtek által az extracelluláris térbe szekretált ZG16B fehérje EGFP nélkül került kiválasztásra, melyre a szekretált fehérje méretéből (16 kDa)

következtettünk. Az elkészült vektor szekvenciáját szekvenálás, PCR és restrikciós emésztés segítségével igazoltuk. A validált vektort HEK293 sejtek transzfektálására használtuk polyethylenimin (PEI) segítségével, negatív kontrollként az eredeti pEGFP-Empty vektort alkalmaztuk.

3. Ábra



3. Ábra: *ZG16B* expressziós rendszer karakterizálása. A, A *ZG16B* cDNS-ének pEGFP-C3 vektorba történő klónozásának sematikus ábrája. B, A rekombináns *ZG16B* transzlációjának sematikus ábrázolása.

3.3 Farmakológiai és biológiai kezelések, hatóanyag-könyvtár

5-HT-, muszkarinos acetyl-cholin-, hisztamin- és dopamin receptor-családok vizsgálatához szelektív agonistákat és antagonistákat tartalmazó hatóanyag-könyvtárat állítottunk össze. A hatóanyag-könyvtárban szereplő vegyületeket a Tocris - Bio-Techne R&D Systems Kft.-től, illetve a MedChemExpress - Bio-Kasztel Ltd.-től szereztük be. A hatóanyagokat a forgalmazók ajánlásainak megfelelően tároltuk, és a következő lehetséges oldószerekben oldottuk be, gyártói ajánlások alapján: dimethyl sulfoxide – ethanol (DMSO-EtOH) (1:1), PBS, 1M NaOH, 1M HCl. Kísérleteinkben, ahol farmakológiai kezelést alkalmaztunk, minden esetben a kérdéses hatóanyag beoldásához használt oldószert/hordozóanyagot a kezeléssel azonos módon hígítva használtuk fel negatív kontrollként. A hatóanyag-könyvtárunkban szereplő vegyületek szerkezeti képleteit a 11. és 15. ábra foglalja össze, a hatóanyagokkal kapcsolatos további információinkat az 2. és 3. táblázat tartalmazza.

A 5-HT receptor modulátorokat 0,1-10 μM közötti koncentrációban alkalmaztuk dózis-hatás görbék felvételéhez. A proliferációs vizsgálat alapú hatóanyag szűrésünk során, az IC_{50}

értékeket az adott vegyület koncentrációjaként határoztuk meg, amely a proliferációt 50%-kal csökkentette, nonlinearis regresszióval illesztett dózis-hatás görbék alapján. Az egyéb monoamin receptor-család modulátorokat egységesen 1 μ M koncentrációban alkalmaztuk. A bexarotene és carvedilol kezeléseket külön-külön, valamint kombinált formában (Bex + Carv) végeztük 1 μ M koncentrációban.

Hatóanyag név	CAS No.	Molekuláris tömeg	Célpont	Ki/EC50 érték	Hatás	G-fehérje kapcsoltság	
BIMU 8	134296-40-5	378.9	5-HT ₄	69 nM	Agonista	G _s	
WAY 181187 oxalate	1883548-85-3	470.91	5-HT ₆	2.2 nM			
LP-211	10521147-86-0	466.62	5-HT ₇	0.58 nM			
GR 113808	144625-51-4	393.5	5-HT ₄	8.8 nM	Antagonista		
PRX 07034	903580-39-2	490.44	5-HT ₆	4-8 nM			
SB 269970 hydrochloride	261901-57-9	388.95	5-HT ₇	8.9 nM			
Ipsapirone	95847-70-4	401.48	5-HT _{1A}	10 nM	Agonista	G _i	
PNU 142633	187665-65-2	422.53	5-HT _{1D}	6 nM			
BRL54443	7477-39-1	230.31	5-HT _{1E/F}	1.1-0.7 nM			
LY 344864 hydrochloride	1217756-94-9	387.88	5-HT _{1F}	3 nM			
UCSF 648	637090-55-0	326.84	5-HT _{5A}	42 nM			
NAD 299 hydrochloride	184674-99-5	354.85	5-HT _{1A}	0.6 nM	Antagonista		
SB 216641 hydrochloride	193611-67-5	523.03	5HT _{1B}	1 nM			
LY 310762 hydrochloride	192927-92-7	430.94	5-HT _{1D}	31 nM			
SB 699551	864741-95-7	584.66	5-HT _{5A}	8.3 nM			
BW723C86	160521-72-2	322.85	5-HT _{2B}	1-5 nM	Agonista	G _q	
CP 809101 hydrochloride	1215721-40-6	341.24	5-HT _{2C}	9.96 nM	Antagonista		
R-96544 hydrochloride	167144-80-1	391.94	5-HT _{2A}	1.6 nM			
LY 266097 hydrochloride	172895-39-5	407.33	5-HT _{2B}	9.3 nM			
SB 204741	152239-46-8	286.35	5-HT _{2B}	7.1 nM			
RS 102221 hydrochloride	187397-18-8	649.08	5-HT _{2C}	8.7 nM			

2. Táblázat: A vizsgálatokban használt 5-HT receptor modulátorok kémiai és farmakológiai jellemzői.

Hatóanyag név	Molekuláris tömeg (g/mol)	Célpont	Ki/EC50 érték	Hatás	G-fehérje kapcsoltság
Dihydropyridine hydrochloride	303.79	DRD1	72 nM	Agonista	G _s
LE 300	290.41	DRD1	1.9 nM	Antagonista	
Sumanitrole maleate	319.31	DRD2	17-75 nM	Agonista	G _i
Pramipexole dihydrochloride	284.25	DRD3	0.5 nM		
L-741,626	340.85	DRD2	2.4 nM	Antagonista	
NGB 2904	530.92	DRD3	1.4 nM		
PD 168568 dihydrochloride	422.39	DRD4	8.8 nM		
Imetit dihydrobromide	332.06	HRH3/4	0.3-2.7 nM	Agonista	G _i
4-Methylhistamine dihydrochloride	198.09	HRH4	7 nM		
Iodophenpropit dihydrobromide	576.13	HRH3/4	0.3 nM	Antagonista	
A 943931 dihydrochloride	368.31	HRH4	5 nM		
2-Pyridylethylamine dihydrochloride	195.09	HRH1	3.7 nM	Agonista	G _q
Clemastine fumarate	459.97	HRH1	0.26 nM	Antagonista	
PD 102807	392.45	CHRM4	91 nM	Antagonista	G _i
AQ-RA 741	463.62	CHRM2	8.3 nM		
McN-A 343	317.21	CHRM1	5.46 nM	Agonista	G _q
Pirenzepine dihydrochloride	424.33	CHRM1	58 nM	Antagonista	
J 104129 fumarate	500.63	CHRM3	4.2 nM		

3. Táblázat: *A muszkarinos, dopamin és hisztamin receptor modulátorok kémiai és farmakológiai jellemzői.*

A *ZG16B* fehérje hatásának vizsgálatához HEK293 sejteket transzfektáltunk pEGFP-*ZG16B* és pEGFP-Empty vektorokkal PEI segítségével. A HEK293 sejtek alkalmas 'host'-nak bizonyultak, mivel eredetileg ezek a sejtek nem fejezik ki a *ZG16B*-t, így a pEGFP-Empty vektorral történő transzfekció megfelelő negatív kontrollként szolgált kísérleteinkben. A transzfekciót követően 4 órával a sejtek médiumát (DMEM) szérummentes médiumra cseréltük, és 48 órát követően a sejtek által kondicionált felülszót centrifugálással megtisztítottuk a sejtektől, sejtörmeléktől és méretkizárásos szűréssel, 10 kDa és 30 kDa pórusméretű Millipore szűrőket használva koncentráltuk centrifugálással. Az így nyert kondicionált felülszót alkalmaztuk 1:10 hígításban a normál és emlőtumor sejtek kezelésére.

A SERT és *ARID1A* csendesítését siRNS segítségével végeztük, melyet DharmaFECT transzfekciós reagens segítségével juttattunk a sejtekbe. A SERT specifikus siRNS-eket a Merck előre tervezett oligói közül választottuk ki, 3 különböző (SASI_HS01_00217013, SASI_HS01_00217014, SASI_HS01_00217016) típus keverékét azonos mennyiségben (5 µM) alkalmaztuk a sejteken. Az *ARID1A* csendesítésére TriFECTa® RNAi Kit-et használtunk, mely szintén 3 *ARID1A* mRNS-t targetáló siRNS keverékéből állt. Az siRNS-ekkel történő transzfekciók során kontrollként luciferázt targetáló siRNS-t alkalmaztunk.

3.4 Proliferációs assay

A sejtproliferációt mikroszkópos és képanalízisen alapuló 2D sejtenyésztési rendszerben vizsgáltuk. A HME-hTert sejteket 96-lyukú optikai plate-ekre (Greiner µClear) osztottuk ki alacsony sejtszámban, majd a kezelés 3. napján médiumcserével együtt újra kezeltük a sejteket. A kezelést követően 4%-os formaldehiddel fixáltuk a sejteket, majd PBS-es mosást követően 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) festéssel jelöltük a sejtmagokat. A mintákról automatizált tárgyasztallal felszerelt, Leica DMi8 inverz fluoreszcens mikroszkóppal készítettünk felvételeket. A képelemzés és a sejtek számolása ImageJ szoftverrel történt automatizáltan, mérésre optimalizált makró segítségével, amely kontrasztjavítást, küszöbérték megadásával történő szegmentálást és méret szerinti szűrést tartalmazott.

A 2D proliferációs assay-eket alacsony kiindulási sejtszámról indítottuk, majd több napos kezelési periódust követően határoztuk meg a sejtek számát. Ez a kísérleti elrendezés a kontroll sejtekhez viszonyított növekedési kapacitás mérésére szolgált, ezért elsődlegesen a kezelések proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálatára volt alkalmas. A kísérletek során a sejtkultúrákat rendszeresen mikroszkóposan ellenőriztük annak érdekében, hogy kizárjuk a kiterjedt sejtpusztulásra vagy akut citotoxicitásra utaló morfológiai eltéréseket. A legerősebb sejtszámcsökkenést kiváltó kezelések esetén is detektálható, megtapadt sejtek maradtak a tenyészetekben, ezért a végponti sejtszám csökkenését ebben a rendszerben elsősorban a proliferációs kapacitás mérséklődéseként értelmeztük.

A normál emlő epithel sejtek 3D szferoid-kultúra vizsgálatához HME-hTert sejteket 1:1 arányban Matrigellel kevert sejtszuspenzióban osztottunk ki 96 lyukú optikai plate-ekre. A kezeléseket a szferoid-formálás hatodik napján indítottuk és további hét napon át folytattuk. Ezt követően a sejteket 4%-os formaldehiddel fixáltuk, majd immunfestettük Ki-67 proliferációs markerre, és DAPI-val festettük a sejtmagokat. A szferoidokról fáziskontraszt mikroszkóppal és immunfestés után Leica DMi8 inverz fluoreszcens mikroszkóp segítségével készítettünk felvételeket. A HME-hTert szferoidok méretét fáziskontraszt mikroszkópos felvételek alapján, ImageJ szoftver segítségével határoztuk meg. A kétdimenziós vetületi képeken mért területből ekvivalens átmérőt számítottunk, majd a közel gömbszerű szferoid morfológia alapján a térfogatot gömb alakot feltételezve becsültük meg a $V = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3$ képlettel. Az így számított térfogatértékek nem közvetlen 3D rekonstrukcióból származtak, hanem a kezelések közötti

relatív szferoidméret-változások összehasonlítására szolgáló becsült térfogatként értelmezendők

3.5 Kolóniaformáló assay

A tumorsejtek 3D szferoid növekedési képességét alacsony olvadáspontú agarózt felhasználva, kolóniaformáló assay segítségével értékeltük. Az MCF7, T47D és MDA-MB-231 sejtek DMEM médiumban oldott, sterilizált, 0,3%-os agaróz rétegben kerültek szuszpendálásra. A sejteket agaróz gélbe történő keverése előtt 48 órán át előkezeltük, ezt követően három hétig tenyésztettük őket, ami alatt a felülúszóban juttattuk be a kezeléseinket. A kolóniák mikroszkópizálása során Z-stack felvételeket rögzítettünk és ezeket projektáltuk 2D-s képpé, és az így készült képeken automatizáltan számoltuk a kolóniákat ImageJ szoftver segítségével. MCF7 sejtek esetén az assay végeztével a sejteket tartalmazó agaróz réteget folyékony nitrogénben fagyasztottuk, majd hűtött mozsárban TRIzol (UD-GENOMED Kft.) alkalmazása mellett aprítottuk a sejteket tartalmazó gél, melyből végül RNS-t izoláltunk reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) mérés céljára. A TRIzol-al történő RNS izolálás során, a minták aprítását követően a továbbiakban a standard gyártói ajánlás alapján jártunk el.

3.6 Sejt-migráció, adhézió és morfológia vizsgálata

A sebgyógyulási assay-k esetén a sejteket 48 órán át előkezeltük, majd Ibidi inzerterekbe osztottuk ki. Huszonnégy óra elteltével az inzertert eltávolítottuk, majd a felülúszók hozzáadásakor további kezeléseket végeztünk a sejteken. A kezelések hozzáadása után a kezdeti és záró időpontokban mikroszkópos képeket készítettünk a sejtek közötti területről, hogy mérhessük az üres területre bevándorló sejttömeg által elfoglalt terület nagyságát. Záró időpontként azt az időintervallumot határoztuk meg, mely a kontroll vagy kezelt minták esetén teljes mértékben a sejtmentes terület elfoglalásához volt szükséges. A készített mikroszkópos képeket ImageJ szoftverrel elemeztük, mely során a sejtektől mentes terület mértékének csökkenéséből számítottuk ki a sejtek által benőtt terület nagyságát az adott időintervallum alatt.

Az adhéziós vizsgálatok során a sejteket 24-lyukú plate-re osztottuk ki, majd 48 órás előkezelést követően HOECHST festéssel jelöltük a sejtmagokat. A jelölést követően a sejteket Trypsin-EDTA-val kezeltük 37°C-on, és meghatározott időpontokként cseréltük rajtuk az oldatot,

miközben mikroszkópia segítségével követtük a még kitapadt sejtek arányát az idő függvényében.

A sejtek morfológiáját öt napos *ZG16B*-t tartalmazó kondicionált felülszóval vagy TGF- β -val végzett kezelések után rögzítettük mikroszkópia segítségével. A TGF- β kezelést a vizsgálataink során 10 ng/ml koncentrációban alkalmaztunk pozitív kontrollként EMT indukálására. A mintákat 4% formaldehiddel fixáltuk, majd DAPI, CellMask Red és Phalloidin-A488 festést alkalmaztunk. A sejtek alakját, körszerűségét és hosszanti tengelyeinek arányait CellProfiler programmal elemeztük sejtenként. Az elemzés során a tenyésztő felület teljes részén megtalálható összes sejtet kiértékeltek.

3.7 Immunfestés, immunhisztokémia és fluoreszcens mikroszkópia

Az intracelluláris 5-HT szintjének szemi-kvantitatív meghatározásához nyúl eredetű anti-5-HT antiszérumot használtunk, a festési intenzitást a DAPI-val festett sejtmagok számára normalizáltuk. A reaktív oxigéngyökök kvantitálását 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA) festéssel végeztük el, 10 μ M koncentrációban alkalmazva azt élő sejteken. A DCFDA jelölés intenzitásának kvantitálása során, a mért értékeket HOECHST festéssel azonosított sejtek számára normalizáltuk. A kettős szálú DNS-töréseket γ H2AX ellenes indirekt immunfestés segítségével analizáltuk, és a pozitív sejtmagok arányát az összes sejtmaghoz viszonyítva adtuk meg. Hasonló módon, a pozitív-negatív sejtszám arányát határoztuk meg Ki-67 proliferációs markerre specifikus immunfestés esetén is. Hasonlóképpen a triptofán-hidroxiláz (*TPH1*), SERT, *ZG16B*, *FNI*, *CDH2* fehérjék mennyiségét is indirekt immunfestéssel vizsgáltuk, ezeknél a méréseknél a mért intenzitás értékeket a sejtek számára normalizáltuk. A mintákról Leica DMi8 inverz fluoreszcens mikroszkóppal rögzítettük felvételeket, a képelemzést ImageJ és CellProfiler szoftverekkel végeztük.

Az állatkísérletekből származó 4% formalinnal fixált és paraffinba ágyazott normál emlő- és xenograft tumorszövet mintákból 5 μ m vastag metszeteket vágunk mikrotóm segítségével. Ezt követően xylene alkalmazásával oldottuk ki a paraffint a metszetekből, majd csökkenő koncentrációjú etanol-sorozattal távolítottuk el a xylene-t és egyúttal rehidratáltuk a szövetmintát. Az antigénfeltárást citrate pufferben, kuktában történő 15 perces hőkezeléssel végeztük. A primer antitestekkel történő jelölést követően, Vectastain R.T.U. kit felhasználásával indirekt módon, peroxidase enzimmel konjugált másodlagos antitesttel jelöltük a metszeteket. A másodlagos jelölést követően 3,3'-diaminobenzidine (DAB)

kromogént és hematoxylin háttérfestést alkalmaztunk a szövetmintákon. A metszeteket szintelen körömlakkal és fedőlemezrel zártuk le. A készített tárgylemezeket bright-field színes (RGB) módban digitalizáltuk. A felvételeken *ZG16B*-pozitív területeket ImageJ programmal kvantitáltuk, és a hematoxylin adta háttérfestés területére normalizáltuk.

3.8 Western blot analízis

A sejtekből fehérje kivonatokat készítettünk RIPA pufferrel, amelyet proteázgátló koktéllal és foszfatázgátlókkal (Na_3VO_4) egészítettünk ki. A fehérje koncentrációt bicinchoninic acid (BCA) módszerrel határoztuk meg. A denaturált mintákat 10%-os sodium dodecyl sulfate (SDS) -polyacrylamide gélen futtattuk, majd polyvinylidene-fluoride (PVDF) membránra transzferáltuk félszáraz vagy nedves blottoló technikát alkalmazva. Az elsődleges antitestek 5%-os BSA-TBST oldatban kerültek a membránra. Indirekt jelölés során az alkalmazott másodlagos antitestek DyLight-680 és -800 fluorofórokkal voltak konjugálva. A jeleket LI-COR Odyssey rendszerrel detektáltuk, és a denzitometriai kiértékelést ImageJ szoftverrel végeztük. Az Akt phosphoryláció vizsgálata során a *PI3K* gátlására használt LY294002 hatóanyagot Dr. Balajthy Zoltántól kaptuk.

A *ZG16B* expressziós rendszer karakterizálása során a sejtekről származó felülúszót ugyanolyan eljárással készítettük elő, mint amikor azt kezelésként alkalmaztuk a sejteken. A felülúszók és lizátumok fehérjetartalmát BCA kittel kvantitáltuk, majd hígítást és denaturálást követően Western blottal igazoltuk a *ZG16B* fehérje jelenlétét. Normalizáláshoz ugyanazon sejtekből származó lizátumokat használtunk β -tubulin kvantitáláshoz.

3.9 Másodlagos hírvivők (IP₃, cAMP) kvantitálása

A cAMP-szinteket a cAMP-Screen Direct ELISA kittel (Thermo Fisher, Waltham, MA) határoztuk meg. 5 perces farmakológiai kezelést követően a sejteket lizáltuk, majd a sejt-lizátumokat 96 lyukú mikrotiter plate-en inkubáltuk cAMP-AP konjugátummal és anti-cAMP antitesttel. A lumineszcenciát Synergy LX mikroplate-olvasóval (BioTek, Winooski, VA) detektáltuk, és a koncentrációkat standard görbék alapján interpoláltuk.

Az IP₃ szintek változását az inositol-monophosphate (IP₁) szintjének mérésével vizsgáltuk a farmakológiai kezeléseink hatására. Az IP₁ az IP₃ stabil metabolitja, így akkumulációjának mérése alkalmas a PLC β G_q-kapcsolt receptorok által történő aktivációjának detektálására. Az IP₁ szintek meghatározását HTRF IP-One G_q kittel (Revvity Inc., Waltham, MA) végeztük

EnVision 2105 mikroplate-olvasó (PerkinElmer, Waltham, MA) segítségével. A HTRF, vagyis Homogeneous Time-Resolved Fluorescence technológia időfelbontásos fluoreszcencia-rezonancia energiatranszferen alapul, amelyben egy donor és egy akceptor fluorofór közelsége esetén specifikus fluoreszcens jel keletkezik. A kezeléseket 50 mM LiCl₂-t tartalmazó stimulációs pufferben hajtottuk végre. A kompetitív assay során az IP1-D2 és cryptate-al konjugált anti-IP1 reagenseket a sejtlizátumokhoz kevertük, majd a fluoreszcens jelet 665 nm és 615 nm hullámhosszon mértük, amelyek alapján a HTRF arányokat kiszámítottuk. Az IP1 koncentrációk interpolálásához standard görbét használtunk.

3.10 Transzkriptomika, RNS szekvenálás és RT-qPCR

A teljes transzkriptom szekvenálásra szánt mintáink HME-hTert sejtekből származtak. A hatóanyagok beoldási módszerének megfelelő hordozóanyagok (negatív kontroll), paroxetine (1 µM) (Par) vagy bexarotene és carvedilol (100 nM + 300 nM) kezeléseket 24 órán át végeztük. A hordozóanyagokat minden esetben azonos módon hígítottuk, mint a legkönnyebb kezelést, annak érdekében, hogy a rendszerben a bevitt hatóanyagok mellett lévő hordozóanyag mennyiség azonos legyen a negatív kontroll esetén is. Rekombináns *ZG16B* faktorral való kezelés esetén 6 órán át kezeltük a sejteket. A kezelt sejtekből Macherey-Nagel RNS izoláló kittel készítettünk mintákat, melyek minőségét Agilent Bioanalyzer segítségével ellenőriztük. A minták szekvenálása Illumina és DNBSEQ-G400 rendszereken történt az UD-Genomed Kft. segítségével. A nyers szekvenálási fájlokat a National Center for Biotechnology Information (NCBI) adatbázisába töltöttük fel. A *ZG16B* és hozzá tartozó kontrolljával kezelt mintákhoz tartozó adatok a PRJNA965937 azonosító alatt elérhetők. A bexarotene és carvedilol kombinált kezelés és kontrolljához tartozó nyers adatok a PRJNA965935 azonosító alatt, míg a paroxetine és kontrolljához tartozó adatok a PRJNA1210992 azonosító alatt elérhetők az adatbázisban.

A szekvenálásból nyert adatok minőségellenőrzése és feldolgozása Galaxy platformon (<https://usegalaxy.eu/>) zajlott trimmelési- (Trimmomatic), referencia genomhoz (Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) történő illesztés- (HISAT2), kvantitálás- (FeatureCounts) és normalizálás (DESeq2) lépéseken keresztül. A differenciáltan expresszált gének változásainál a statisztikai különbség szignifikancia szintjét $p < 0,01$ értékben határoztuk meg. Főkomponensi-elemzés (PC) alapján bex+carv hatás kontrollal való összevetésekor PC1:14% PC2:81% értékeket kaptunk. *ZG16B* kezelés kontrollal való összehasonlításakor PC1:1%

PC2:98% értékeket kaptunk. Paroxetine kontrollal való összevetésekor PC1:37% PC2:52% értékeket kaptunk.

A különböző transzkriptomikai adatsorok bioinformatikai előfeldolgozása azonos logika szerint történt a minőségellenőrzés, illesztés, kvantifikálás és DESeq2-alapú normalizálás, illetve differenciális expresszió-elemzés szintjéig. Az ezt követő funkcionális elemzési stratégia az adott kísérleti kérdésfeltevéshez igazodott. A paroxetine-kezelés esetén a teljes rangsorolt génlista útvonal-szintű értelmezésére gene set enrichment analysis (GSEA) elemzést alkalmaztunk Reactome génkészletekkel. A Bex+Carv és *ZG16B* adatsorok összevetésekor ezzel szemben a cél az azonos vagy ellentétes irányban szabályozott géncsoportok azonosítása volt, ezért a differenciáltan expresszált génlisták hierarchikus klaszterezését, majd az így kapott géncsoportok ShinyGO-alapú génontológiai elemzését végeztük el.

A *ZG16B* és Bex + Carv által szabályozott differenciálisan expresszált gének listáinak összevetésekor hierarchikus klaszterezést végeztünk Cluster 3.0 és TreeView szoftverek segítségével, majd kiemeltük az azonos vagy ellentétes irányba szabályozott géneket további gén ontológiai elemzés (ShinyGO verziószám: 0.76) céljára. Az analízis során 0,05 false discovery rate (FDR) küszöbértéket alkalmaztunk. A találatok közül a $p < 0.05$ statisztikai szignifikancia szinttel rendelkező útvonalakat emeltük ki.

Paroxetine kezelés esetén génkészlet-elemzést végeztünk (GSEA). GSEA elemzésünk során (verziószám: v4.3.3 [build: 16]) a Molecular Signatures Database (MSigDB) c2.cp.reactome-v2024.1.Hs.symbols.gmt adatbázisát használtuk, 1000 génkészlet-permutációval a statisztikai szignifikancia meghatározásához. A vizsgált expressziós adathalmaz 25 702 gént tartalmazott, melyeket a Human NCBI gene ID MSigDB v2024.1 chip platform alapján annotáltunk. A fenotípusos címkék két csoportot definiáltak, a gének rangsorolása a Signal2Noise érték alapján történt csökkenő sorrendben. A kontrollal vagy paroxetine-el kezelt sejtek összehasonlításából azonosított Reactome útvonalak a 3–4. ábrákon kerülnek bemutatásra, azokat az útvonalakat emeltük ki, melyeknél az adj. p -érték < 0.05 volt.

3.11 Kromatin-immunprecipitáció, szekvenálás és qPCR

A kromatin-immunprecipitációs (ChIP) kísérlethez ChIP-szekvenáláshoz (ChIP-seq) vagy ChIP-qPCR-hez 20 millió, illetve 5 millió HME-hTert sejtet használtunk. A sejteket kezelést (Bex + Carv (100 nM + 300 nM) és kontroll) követően 1% metanoltól mentes formaldehiddel

fixáltuk szobahőmérsékleten 10 percen át, majd a formaldehid semlegesítésére 1 mol/L glicint adtunk a sejtekhez. A sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS-sel, majd proteázgátló koktéllal kiegészített ChIP lízis pufferben lizáltuk őket. A sejtmagok pelletjét 4°C-on, $12\,000 \times g$ -n 1 percig tartó centrifugálással gyűjtöttük össze, majd háromszor mostuk ChIP lízis pufferrel. A kromatin fragmentálását Bioruptor Plus szonikátorral végeztük (3 × 5 perces ciklus, 30 másodperc bekapcsolt és 30 másodperc kikapcsolt üzemmódban, 4°C). Az input mintát minden esetben a kromatin 10%-ának félretételével állítottuk be.

Az immunprecipitációhoz mágneses gyöngyöket használtunk, amelyeket protein-A és protein-G gyöngyök 1:1 arányú elegyéből készítettünk. A gyöngyöket 0,5% BSA-t tartalmazó PBS-ben blokkoltuk egy éjszakán át. A kromatint 1:9 arányban hígítottuk ChIP lízis pufferben. A nem specifikus kölcsönhatásokból eredő háttér csökkentése érdekében a hígított kromatin mintát egy éjszakán át 4°C-on nem specifikus IgG antitesttel bevont gyöngyökkel inkubáltuk. A blokkolt protein-A és -G gyöngyöket a célfehérje elleni antitesttel inkubáltuk — *ARID1A*, acetylált hiszton *H3*, vagy nem specifikus IgG antitest — szintén egy éjszakán át, 4°C-on. Az előzetesen megtisztított kromatint a bevont gyöngyökkel egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk. Az antitest-fehérje-DNS komplexeket négyszer mostuk ChIP mosó pufferekkel. A fehérje-DNS komplexek eluálásához a gyöngyöket elúciós pufferrel kezeltük 15 percen át, keverés mellett szobahőmérsékleten.

A fehérje-DNS keresztkötések bontásához a mintákat 0,2 mol/L NaCl-lal egy éjszakán át 65°C-on inkubáltuk. Ezt követően a DNS-t megtisztítottuk RNáz A, proteináz K, Tris-HCl és EDTA hozzáadásával, majd 45°C-on 2 órán át, keverés mellett inkubáltuk termomixerben. A végső tisztítási lépéshez a ChIP-szekvenáláshoz használt mintákat MinElute PCR Purification kittel, a ChIP-qPCR mintákat pedig a High Pure PCR Template Preparation kittel (Roche) tisztítottuk. A DNS koncentrációját Qubit dsDNA HS assay segítségével mértük. A könyvtárkészítést és a ChIP minták szekvenálását az UD-Genomed genomikai szolgáltató laboratórium végezte.

A nyers szekvenálási adatokat a Burrows-Wheeler Aligner (BWA) segítségével illesztettük az emberi hg19 referenciagenomhoz. A csúcsokat HMCAn szoftverrel azonosítottuk, majd ENCODE hg19 blacklist (artifaktum csúcsok) (<https://shorturl.at/SmFpT>) eltávolítását végeztük el. Az átfedő régiókat a Bedtools csomag intersectBed parancsával határoztuk meg. A leolvasások normalizálását a szekvenálási mélységhez a bamCoverage funkcióval végeztük,

majd a kötődési események vizualizálásához bigwig fájlokat hoztunk létre, amelyeket az Integrative Genomics Viewer (IGV) (<https://igv.org/>) programmal jelenítettünk meg.

A ChIP-szekvenálással azonosított *ARID1A*-kötődési helyet és H3K27ac jelölést ChIP-qPCR módszerrel validáltuk az azonosított *ZG16B* enhancer régión. A DNS-tisztítást követően az immunprecipitációs (IP) és input mintákat háromszoros hígításban nukleázmentes vízzel készítettük elő a qPCR reakcióhoz. Az input minták kontrollként szolgáltak, és minden egyes IP mintából származó DNS mennyiségét a hozzá tartozó input mintához viszonyítva normalizáltuk. A qPCR reakciókban mintánként 1 mikroliter DNS-t használtunk fel, a fluoreszcens detektálást pedig SYBR Green I Master (Roche Diagnostics GmbH) reagenssel végeztük.

3.12 Valós idejű kvantitatív PCR

Az mRNS-transzkriptumok mennyiségi meghatározását valós idejű reverz transzkripciósz kvantitatív PCR-rel (RT-qPCR) végeztük. A vizsgálathoz génspecifikus, FAM–BHQ kettős jelölésű TaqMan próbákat és hozzájuk illeszkedő forward- és reverz primereket terveztünk, amelyek lehetővé tették a célzott mRNS-szakaszok nagy érzékenységgű és specifikus detektálását. A *CDH1* gén kvantifikálása során SYBR green festék alapú detekciót alkalmaztunk. Az RT-qPCR és ChIP-qPCR során alkalmazott primerek szekvenciáit a 4. táblázat tartalmazza. Az egyes mRNS-ek kópiaszámát egyszálú DNS amplikonokból előállított, ismert koncentrációjú standard hígítási sorozathoz viszonyítva határoztuk meg, így az egyes reakciókban mért ciklus küszöb (Ct) értékek alapján abszolút mennyiségi becslés vált lehetővé. A génexpressziós szinteket a β -aktin (*ACTB*) háztartási génhez normalizáltuk a minták közötti technikai eltérések és bemeneti mRNS mennyiség különbségeinek kiegyenlítése érdekében, majd az eredményeket relatív expressziós értékeként adtuk meg.

Detekció	Célgén	Forward primer szekvencia	Reverse primer szekvencia	Próba szekvencia
TaqMan próba alapú assay-k	<i>ZG16B</i>	5'-GGTGGGAATACCCAGGAAGTC-3'	5'-GCTTGAAGGCGACAAAGAC-3'	5'-CCCTGCAGCCAGGCGAATACATCA-3'
	<i>HTR1D</i>	5'-CGGGCAGCGGATCTTCT-3'	5'-GACCAGGCAAAACAAACAGATCA-3'	5'-TGTCCCTGCTCTGTGAGCCCA-3'
	<i>HTR2B</i>	5'-ACAGCAGCAAGCAAGTCTAGTGA-3'	5'-TGTAGAGTCGTGTTTGAAGTGA-3'	5'-CATGCTCAGCAAAATAACAACGAAACAGA-3'
	<i>HTR7</i>	5'-CCTGTGCGTGATCAGCATTG-3'	5'-TCATCTTCGCCATGCATTTC-3'	5'-TTGGGATCACAAAGGCCCTCACA-3'
	<i>ARID1A</i>	5'-GCCAGTCGGACAGCATCAT-3'	5'-CTCTGCATATAACCTCGATCTTGG-3'	5'-CCTTCCATGAACCAATCAAGCATTTGCC-3'
	<i>ACTB</i>	5'-CCCTGGCACCCAGCAC-3'	5'-GCCGATCCACACGGAGTAC-3'	5'-ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGC-3'
	<i>FN1</i>	5'-AGAGAGTCAGCCTCTGGTTCAGAC-3'	5'-TGGAATCGACATCCACATCAGT-3'	5'-ATGCCAGTCCTTAGGGCGATCAATGTT-3'
Detekció	Célgén	Forward primer szekvencia	Reverse primer szekvencia	
SYBR-Green alapú assay-k	<i>CDH1</i>	5'-AACGATGGCATTTTGAAAACAG-3'	5'-ACCACATTCTGCTACTGTACGT-3'	
	<i>ZG16B</i> enhancer régió	5'-ATTCCAACCGCAATCCACACA-3'	5'-AAGAACCTCCCCGACAATG-3'	

4. Táblázat: Az RT-qPCR és ChIP-qPCR során használt PCR assay-k primer és próba szekvenciái

3.13 Állatkísérletes vizsgálatok

A *ZG16B* emlőmirigyben való termelésének vizsgálatához korábban az MD Anderson Cancer Center-ben elvégzett állatkísérletekből származó tumormentes mintákat használtunk fel. A felhasznált minták keletkezését tekintve: MMTV-*ERBB2* egereket alkalmaztunk, amelyeket négy hónapos korban vivőanyaggal vagy Bex + Carv kombinációjával (20 mg/kg, heti öt alkalommal, *per os*) kezeltünk. A hat hónapos korban feláldozott állatok emlőmirigyei 4%-os formalinnal voltak fixálva és paraffinba ágyazva. Ezen állatkísérletes minták korábbi kísérletből származtak, az állatokkal történő munka végzése nem képezte jelen doktori kutatás feladatait.

A tripla negatív emlőtumorkok *ZG16B* kifejeződésének meghatározására humán eredetű MDA-MB-231 sejtekből hoztunk létre xenograftokat severe combined immunodeficiency (SCID) egerekben. Ehhez nyolc nőstény CB17 (IcrHan Hsd-Prkdc) egeret oltottunk be 5 millió sejt és Matrigel (1:1) keverékével az emlőmirigy régiójába. A kezeléseket akkor kezdtük, amikor a tumor mérete elérte a 100 mm³-t, és a 1000 mm³-es méretig folytattuk. A daganatok méretét tolómérővel kétnaponta mértük, a metabolikus aktivitást ¹⁸F-FDG PET/NMR vizsgálattal értékeltük. Az állatkísérleteket az uniós és hazai etikai előírásoknak megfelelően végeztük (engedélyszám: 16/2020/DEMÁB).

3.14 Genomikai adatbázisból származó adatok feldolgozása

A *ZG16B* expresszió több daganattípus közötti összehasonlításához a "The Cancer Genome Atlas" (TCGA Pan-Cancer) adatbázist választottuk, amely összesen 12 839 mintát tartalmazott, és az elemzést az UCSC Xena böngészőben (<https://xena.ucsc.edu/>) végeztük. Többféle daganattípus összehasonlítása mellett az emlődaganatok és normál szövetek *ZG16B*

expresszióbeli összehasonlítás céljára a TCGA Breast Cancer (BRCA) adatszettet használtuk fel.

3.15 Statisztikai elemzés és ábrakészítés

Minden kísérlet legalább három független biológiai ismétlést tartalmazott. Az eredményeket átlag $\pm$ standard hiba (SEM) formában adtuk meg. Két csoport összehasonlításához párosítatlan t-próbát, többszörös összehasonlítás esetén egyszempontos variancia-analízist (ANOVA), majd Tukey- vagy Mann–Whitney-féle tesztet alkalmaztunk. Az adatok kiértékelése során a mért különbségeket $p < 0.05$ érték mellett tekintettük statisztikailag szignifikánsnak. Az IC_{50} értékeket nonlinearis regressziós illesztéssel határoztuk meg a dózis–hatás görbék alapján. A kombinációs kezelések hatásának értékeléséhez a szinergia meghatározására a Loewe-modellt alkalmaztuk Combenefit szoftver használata során. A számítás alapját a proliferációs assay normalizált eredményei adták, amelyek a kontrollhoz viszonyított sejtszám százalékos változását fejezik ki. Ábráinkat GraphPad Prism 8, Microsoft Excel és PowerPoint szoftverekkel és Biorender.com használatával készítettük.

4. Eredmények

4.1 A SERT gátlása és 5-HT stimuláció antiproliferatív hatást fejt ki HME-hTert sejtekben

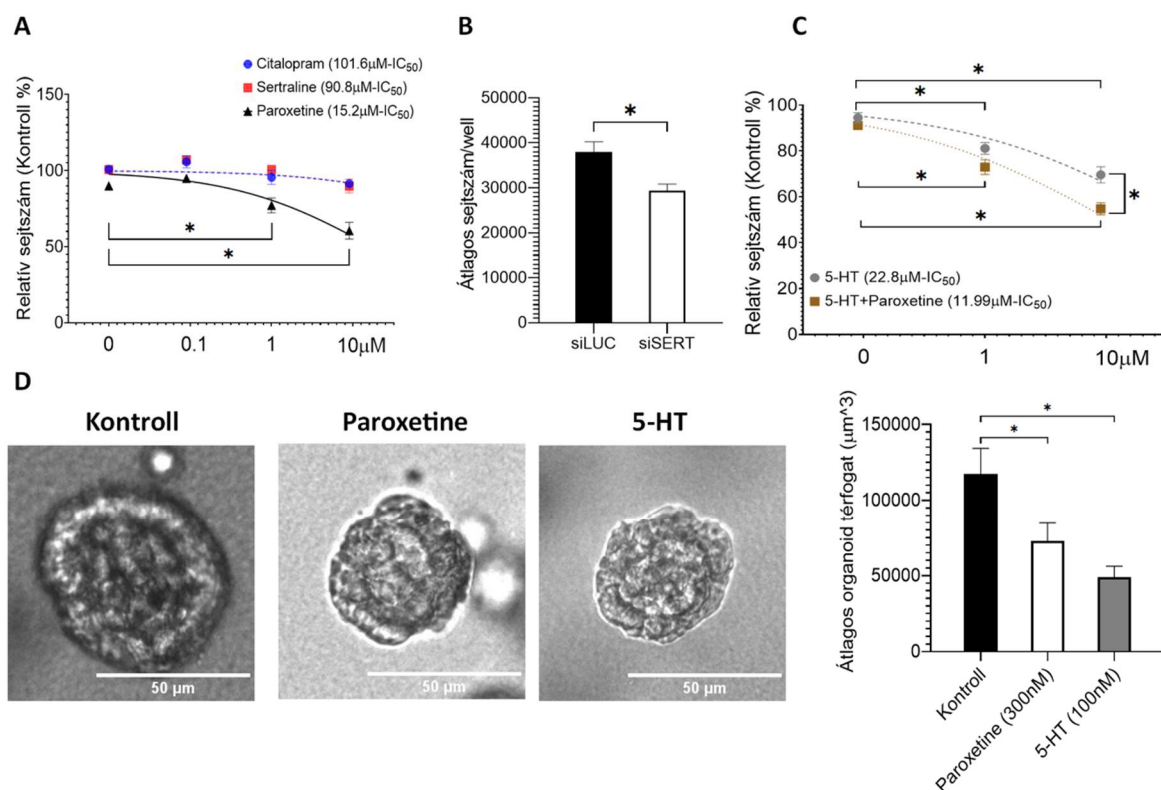
Elsőként annak vizsgálatát tűztük ki célul, hogy a szelektív 5-HT-visszavétel gátlók milyen mértékben képesek befolyásolni HME-hTert sejtek proliferációját. Ennek tesztelésére három, a klinikumban is széles körben alkalmazott SSRI-t vizsgáltunk proliferációs assay-ben: a sertraline-t, a citalopram-ot és a paroxetine-t.

Az SSRI-kkel végzett dózis–hatás vizsgálatok során 0.1; 1 és 10 μ M koncentrációjú hatóanyaggal kezeltük a sejteket DMSO-EtOH hordozóanyag-kontroll mellett. Az eredmények alapján a sertraline és a citalopram nem okozott szignifikáns változást a sejtszámban, míg a paroxetine már 1 μ M koncentráció felett szignifikáns sejtszám csökkenést idézett elő a kontrollhoz képest. A hatás dózisfüggőnek bizonyult, és a legmagasabb, 10 μ M koncentrációnál a sejtszám mintegy 40%-kal esett vissza a kontrollhoz képest (4A ábra). Ez a kísérlet egyértelműen jelezte, hogy a három vizsgált SSRI közül a paroxetine rendelkezik a legerősebb antiproliferatív hatással ezen a sejtvonalon.

A paroxetine kiemelkedő hatásának hátterében feltételezhetően a SERT gátlása állt központi szerepben, mivel a három vizsgált SSRI közül a paroxetine rendelkezik a legnagyobb affinitással a transzporterhez.^{169,170} Ennek kísérletes validálásához a SERT-et siRNS-mediált géncsendesítéssel szuppresszáltuk normál emlő epithel sejtekben. Negatív kontrollként luciferáz-specifikus siRNS-t (siLUC) használtunk. Az SERT ellenes siRNS alkalmazása szignifikáns sejtszám csökkenést eredményezett a kontrollhoz képest, ami közvetlen bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a SERT gátlása visszaszorítja a sejtek proliferációját (4B ábra).

A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy a sejtek hogyan reagálnak a külső 5-HT szint emelésére 5-HT hozzáadásával, illetve, hogy a paroxetine képes-e a 5-HT által kiváltott proliferációs választ befolyásolni. A sejtekhez 1 és 10 μ M koncentrációban adtunk 5-HT-t, önmagában vagy előzetesen hozzáadott 1 μ M paroxetine-el kombinálva. Már az alacsonyabb, 1 μ M 5-HT kezelés is szignifikáns sejtszám csökkenést okozott, amelyhez hasonló mértékű csökkenést váltott ki a 5-HT és paroxetine kombinációja is. Ugyanakkor 10 μ M 5-HT esetében a paroxetine-el való kombináció szignifikánsan erősítette annak antiproliferatív hatását (4C ábra).

4. Ábra



4. Ábra: A SERT gátlása és 5-HT stimuláció antiproliferatív hatást fejt ki HME-hTert sejtekben. A, HME-hTert 2D proliferációs assay eredmények citalopram, sertaline, paroxetine dózis-hatás vizsgálatok alapján. (* $p < 0.05$ ANOVA, T-test) B, Proliferációs assay vizsgálat a SERT siRNS-el történő csendesítése után HME-hTert sejtekben. (* $p < 0.05$ T-test) C, 5-HT antiproliferatív hatásának vizsgálata kontroll vagy paroxetine (1 μ M) előkezelés mellett. (* $p < 0.05$ ANOVA, T-test) D, A bal oldali panelen reprezentatív mikroszkópos fázis-kontraszt képek láthatóak HME-hTert sferoidokról kontroll, paroxetine és 5-HT kezelést követően, jobb oldalon teljes adatsor kiértékeléséből származó számszerűsített szferoid térfogat értékek láthatóak. (* $p < 0.05$ ANOVA, T-test)

Végül a 2D sejtenyészetben kapott eredmények megerősítése céljából 3D szferoid modellben is vizsgáltuk a kezelések hatását. A Matrigelben tenyésztett HME-hTert szferoidokon 300 nM paroxetine és 100 nM 5-HT-kezeléseket hajtottunk végre. A szferoidokról készült mikroszkópos felvételek kvantitatív elemzése alapján mind a paroxetine, mind a 5-HT szignifikánsan csökkentette a szferoidok átlagos térfogatát a kontrollhoz képest (4D ábra).

Összességében eredményeink igazolták, hogy a paroxetine a vizsgált SSRI-k közül jelentősen képes csökkenteni HME-hTert sejtek sejtszámát. Hasonlóképp, a SERT funkcionális gátlása mellett is sejtszámcsökkenést tapasztaltunk. A külsőleg hozzáadott 5-HT önmagában is jelentős

antiproliferatív hatást fejt ki normál sejteken, amelyet a paroxetine tovább erősített, továbbá mind a transzporter gátlása, mind a külső 5-HT koncentráció emelése növekedést gátló hatású 3D sejt kultúrák körülmények között is.

4.2 Normál emlő epithel sejtek kifejezik a 5-HT termeléséhez és jelátviteléhez szükséges fehérjéket

Az előző kísérletekben bemutatott antiproliferatív hatások szempontjából fontos lépés volt annak az igazolása, hogy a normál emlő epithel sejtek rendelkeznek a 5-HT előállításához, transzportjához és jelátviteléhez szükséges komponensekkel.

Ehhez elsőként immunfluoreszcens festést végeztünk 5-HT-ellenes antiszérummal annak igazolására, hogy a sejtek képesek saját maguk is 5-HT-t előállítani és tárolni. A kontrollal kezelt sejtekben kimutatható volt az intracelluláris 5-HT halmozódása, továbbá paroxetine (300 nM) kezelés után a sejtek 5-HT tartalma szignifikánsan csökkent (5A ábra).

A 5-HT előállításának kulcsenzime a *TPHI* enzim. Immunfluoreszcens jelölés alapján paroxetine és 5-HT hatására nem volt szignifikáns expresszióbeli eltérés a *TPHI* expressziójában a kontrollhoz képest, ugyanakkor a paroxetine és 5-HT együttes alkalmazása mellett egy fokozott kifejeződésre utaló tendencia mutatkozott (5B ábra).

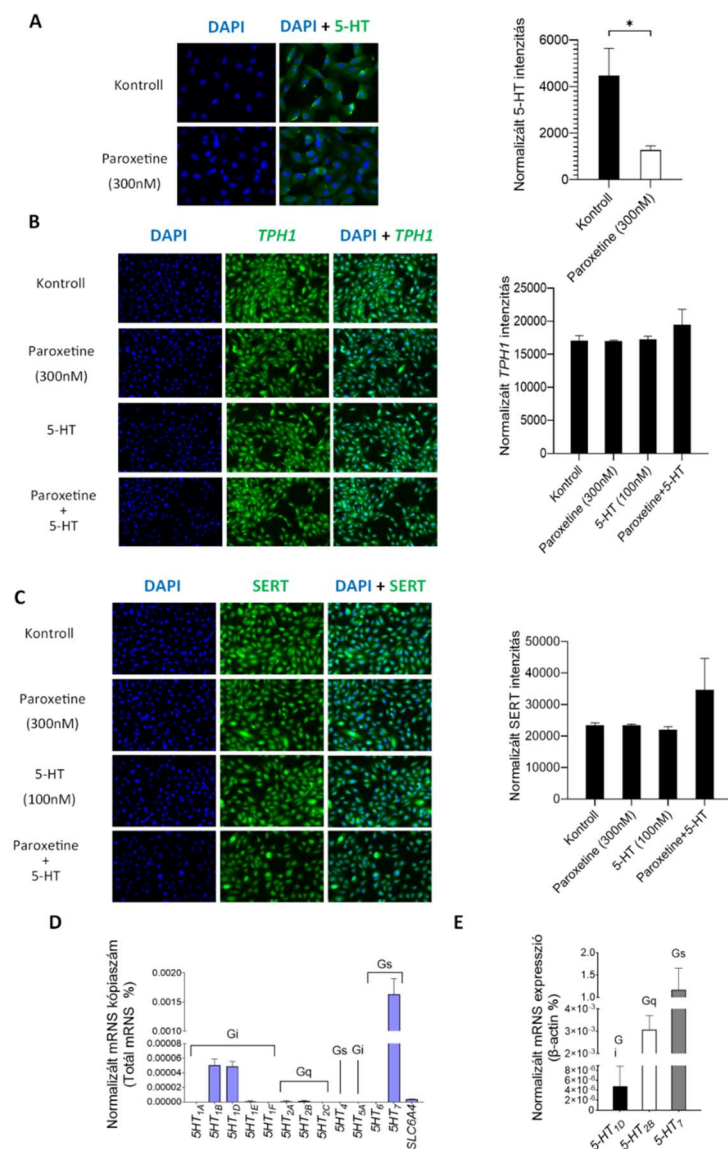
Ezután a 5-HT-transzporter fehérjeszintű kifejeződését vizsgáltuk meg immunfestéssel, amely megerősítette, hogy a SERT a sejteken kifejeződik. Az alkalmazott kezelések (5-HT, paroxetine) hatására szignifikáns különbség itt sem volt detektálható (5C ábra).

A következő lépésben a 5-HT receptorok expresszióját vizsgáltuk meg. RNS-szekvenálási adatok alapján a G_i -kapcsolt receptorok közül az *5-HT_{1B}* és az *5-HT_{1D}* erőteljesebb expressziót mutattak, kisebb mértékben az *5-HT_{1E}* is jelen volt. A G_q -kapcsolt receptorok közül az *5-HT_{2A}* és az *5-HT_{2B}* mérsékelt kifejeződést mutattak. A legmagasabb expresszióval az *5-HT₇* receptor rendelkezett, amely messze meghaladta a többi vizsgált receptorét. Emellett a SERT is kimutatható volt, bár alacsonyabb expressziós szinttel (5D ábra).

Az RNS-szekvenálási adatok validálására RT-qPCR vizsgálatot végeztünk három kiválasztott receptor izoformát vizsgálva: *5-HT_{1D}*, *5-HT_{2B}* és *5-HT₇*. A mérések alapján az *5-HT₇* receptor kifejeződése volt a legmagasabb, amit az *5-HT_{2B}* követett, majd az *5-HT_{1D}*. Ez részben eltért a

szekvenálási eredményektől, amelyek az 5-HT_{1D} esetén magasabb expressziót mutattak (5E ábra).

5. Ábra



5. Ábra: A HME-hTert sejtek kifejezik a 5-HT termeléshez és jelátvitelhez szükséges fehérjéket. A, HME-hTert 5-HT ellenes szérummal való immunfestésének reprezentatív mikroszkópos képei. A jobb oldali grafikonon a sejtmagok számára normalizált fluoreszcens intenzitást ábrázoltuk. (* $p < 0.05$ T-test) B, HME-hTert sejtek TPH1 immunfestéséből származó reprezentatív képek, és a sejtmagok számára normalizált fluoreszcens intenzitás értékek. C, HME-hTert sejtek SERT immunfestéséből származó reprezentatív képek, és a sejtmagok számára normalizált fluoreszcens intenzitás értékek. D, RNS-szekvenálási adatok HME-hTert sejtekből, prezentálva a szerotonin receptor izoformák kifejeződését. E, RT-qPCR adatok HME-hTert sejtekből a D, részben prezentált RNS szekvenálási adatok validálásához.

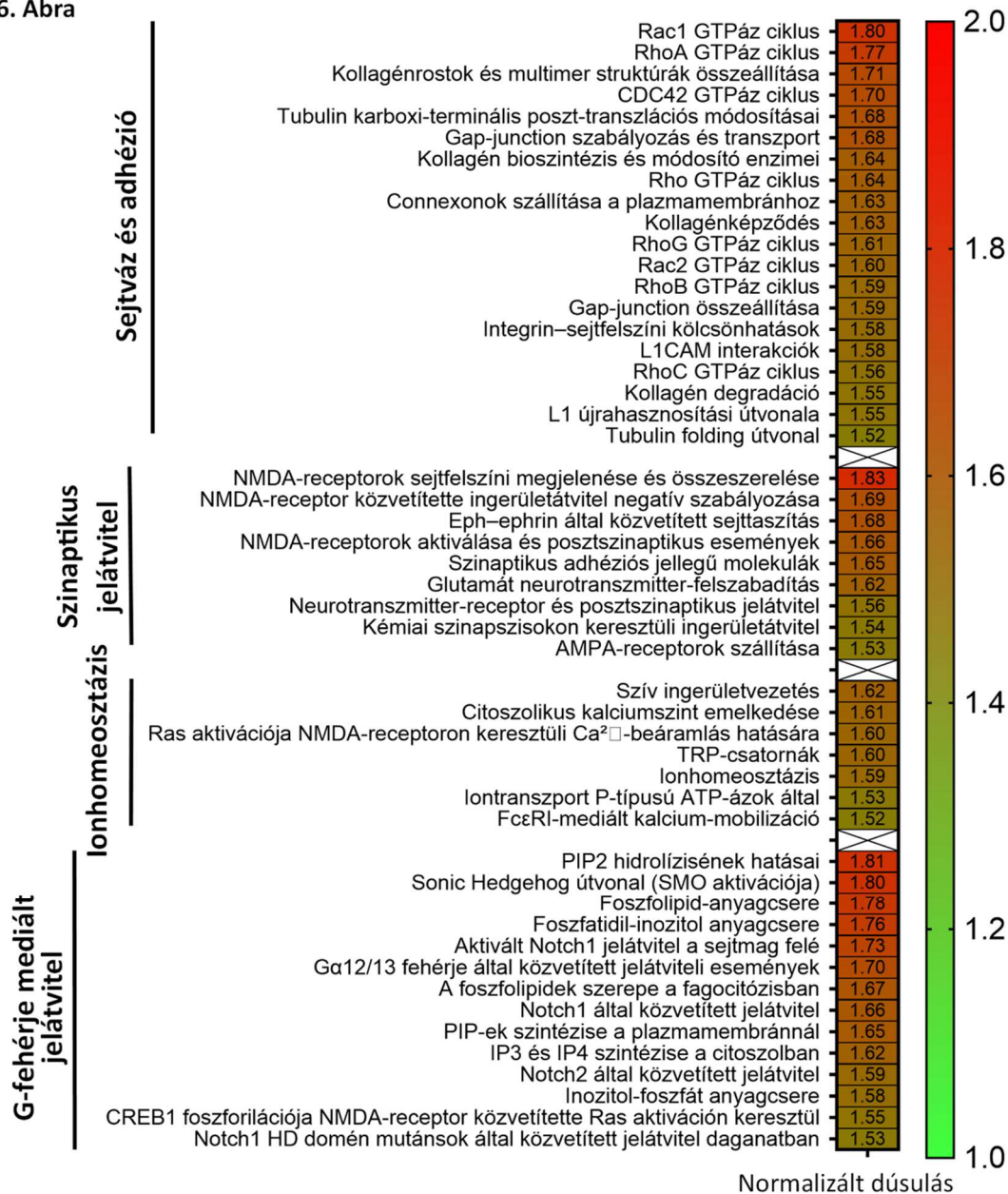
Összességében a kísérletek igazolták, hogy a HME-hTert sejtek képesek 5-HT-t előállítani, rendelkeznek annak transzportjához szükséges fehérjével, és számos, jelátvitel szempontjából releváns receptort expresszálnak. Ez a molekuláris háttér igazolta, hogy a HME-hTert sejtvonal alkalmas modell a 5-HT jelátvitel vizsgálatára.

4.3 Paroxetine hatására megváltozik az emlő epithel sejtek transzkriptomikai profilja

A paroxetine emlő epithel sejtekre gyakorolt hatásának felderítéséhez transzkriptomikai vizsgálatokat végeztünk, amelyek célja a kezelés által kiváltott génexpressziós változások feltérképezése volt. A sejteket 24 órán keresztül kezeltük paroxetine-el (1 μ M) vagy DMSO-ETOH hordozóanyag-kontrollal, majd az RNS-szekvenálásból nyert adatokat a génexpressziós mintázatok funkcionális értelmezéséhez génhalmaz-dúsulási analízist (GSEA) alkalmaztunk, amely lehetővé tette, hogy az azonosított géneket biológiai útvonalakhoz rendeljük.

Az elemzés több, a sejtek szerkezetével és kapcsolataival összefüggő útvonalat azonosított, mint paroxetine által indukált útvonalak (6. ábra). Jelentős mértékben érintettek voltak a kis GTP-kötő fehérjékhez kapcsolódó folyamatok, például a *RAC1*, *RAC2*, *RHOA*, *RHOB*, *RHOC*, *CDC42* és *RHOG* ciklusai, amelyek a citoskeletális dinamika, a sejtmigráció és a sejt–sejt kölcsönhatások szabályozásában játszanak központi szerepet. A mikrotubulusokhoz kapcsolódó útvonalak, mint a tubulin karboxi-terminális poszttranszlációs módosításai vagy a tubulin folding folyamata, szintén dúsulást mutattak, ami arra utal, hogy a paroxetine befolyásolja a sejtváz szerveződését és stabilitását. A sejt–sejt kapcsolatok és a sejtek közötti kommunikáció szabályozásával összefüggésben a GSEA olyan útvonalakat emelt ki, amelyek a gap junction összeállításához és szabályozásához, valamint a konnexonok plazmamembránhoz történő szállításához kapcsolódnak. Ezen kívül a kollagénrostok képződésével, bioszintézisével, módosításával és lebontásával összefüggő folyamatok is megjelentek, ami az extracelluláris mátrix szerkezetének és dinamikájának átformálódására utal.

6. Ábra



6. Ábra: A transzkriptomikai változások alapján paroxetine hatására indukált géncsoportok. Az útvonalakat a normalizált dúsulási pontszámok alapján raktuk csökkenő sorrendbe a főbb csoportokon belül. Az útvonalakat a főbb kategóriákba (G-fehérje mediált jelátvitel, ionhomeosztázis, szinaptikus jelátvitel, sejtváz és adhézió) manuálisan soroltuk be.

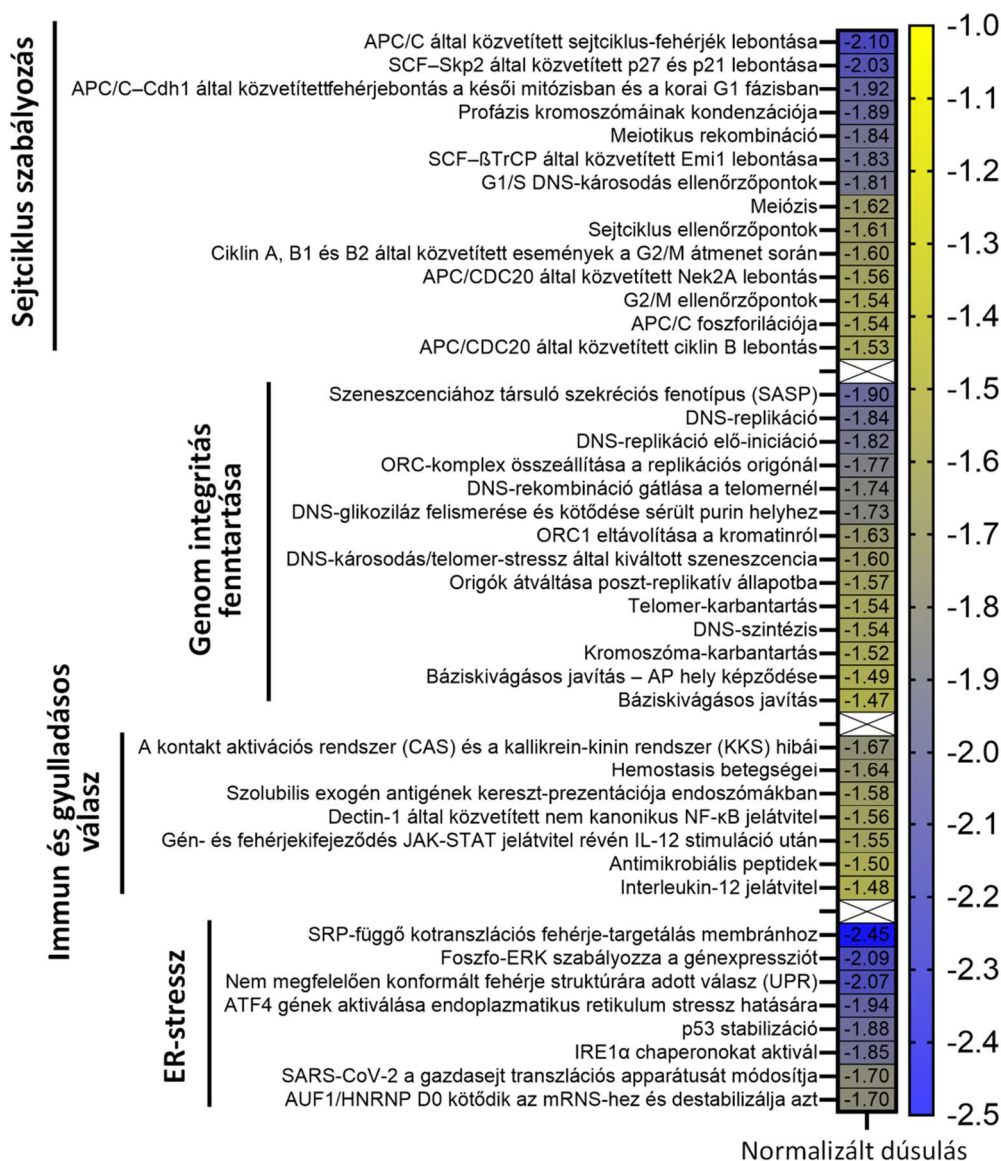
A vizsgálatok eredményei arra is rámutattak, hogy a paroxetine hatása nem korlátozódik a sejt szerkezeti komponensekre, hanem a jelátviteli útvonalak széles körére terjed ki. Számos neurotranszmisszióhoz és kalcium jelátvitelhez kapcsolódó folyamat mutatott dúsulást, ideértve az NMDA- és AMPA-receptorokhoz kapcsolható jelátviteli folyamatokat, a glutamát neurotranszmitter felszabadítását és a citoszolikus kalciumszint emelkedését. A kalcium homeosztázissal kapcsolatos mechanizmusok közül többek között a TRP-csatornák, a P-típusú ATP-ázok által közvetített iontranszport és az FcεRI-mediált kalcium-mobilizáció is az érintett útvonalak között szerepelt.

A proliferáció és differenciáció szabályozásában központi szerepet játszó jelátviteli utak közül a *NOTCH1* és *NOTCH2* által közvetített folyamatok, valamint a Sonic Hedgehog jelátviteli komponensei is megjelentek. A phospholipid - és inositol-phosphate anyagcsere több lépése is érintett volt, ami arra utal, hogy a paroxetine hatása a membrán lipidek metabolizmusa szintjén is érvényesül, végül kiemelkedett még a *CREB1* phosphorylációjához vezető jelátviteli útvonal is.

A paroxetine kezelés hatására nem csak bizonyos gének kifejeződése fokozódott, hanem számos gén expressziója mutatott szignifikáns csökkenést (7. ábra). A legjelentősebb csoportot a sejt ciklussal kapcsolatos folyamatok adták. Több kulcsfontosságú sejt ciklus-szabályozási pont génjeinek expressziója mérséklődött, ideértve az APC/C és SCF komplexek által közvetített degradációs folyamatokat, amelyek a ciklinek és más szabályozó fehérjék lebontásán keresztül irányítják a sejt ciklus előrehaladását. Kiemelkedtek a G1/S és G2/M ellenőrzőpontokhoz kapcsolódó útvonalak, a profázis kromoszómáinak kondenzációja, valamint a ciklin A, B1 és B2 által szabályozott események. A mitotikus szabályozás mellett a meiotikus rekombinációhoz köthető gének expressziója is csökkent.

A DNS-metabolizmushoz és -javításhoz kapcsolódó útvonalak is a szupprimált kategóriában jelentek meg. Az elemzés kiemelte többek között a DNS-replikáció, a replikáció elő-iniciációs komplex összeállítása, a telomer-karbantartás, valamint a DNS-javító mechanizmusok, például a báziskivágásos javítás egyes lépéseinek csökkent génexpresszióját. Ezen túlmenően a telomer-stresszhez, DNS-károsodáshoz kapcsolódó és szenescencia folyamatához köthető gének kifejeződése is mérséklődött.

7. Ábra



7. Ábra: A transzkriptomikai változások alapján paroxetine hatására szuppresszált jelátviteli útvonalak listája. Az útvonalakat a normalizált dúsulási pontszámok alapján raktuk csökkenő sorrendbe a főbb csoportokon belül. Az útvonalakat a főbb kategóriákba manuálisan soroltuk be.

Az adatok a sejtciklus és DNS-metabolizmus mellett a sejtválaszok egyéb területein is változásokat jeleztek. A fehérje minőségellenőrzéshez és stresszválaszhoz kapcsolódó gének közül a nem megfelelően konformált fehérjékre adott válasz és az endoplazmatikus retikulum stressz során aktiválódó folyamatok szintén csökkent kifejeződést mutattak. Végül a p53 stabilizációjához és a stresszválasz további elemeihez köthető gének is az alulszabályozott expressziót mutató csoportba tartoztak.

4.4 Az emlő epithel sejtekbe bejutó 5-HT hatására fokozódik a szabadgyök (ROS) termelés és DNS-károsodás indukálódik

A transzkriptomikai analízis alapján megvizsgáltuk, hogy a SERT gátlása és a csökkenő kifejeződést mutató DNS-hibajavítással kapcsolatos folyamatok milyen összefüggésben állhatnak egymással. Ennek funkcionális vizsgálatához célszerűnek tartottuk megvizsgálni, mi történik a sejtekben a sejtbe bejutó 5-HT lebontása során. Hipotézisünk szerint, a sejtekben a monoamin-oxidáz által a 5-HT lebontása során keletkező szabadgyökök mennyisége korrelációt mutathat a DNS károsodás mértékével.

Az intracelluláris ROS-szint változásait DCFDA festéssel követtük nyomon. A sejteken paroxetine (1 μ M) vagy DMSO-ETOH hordozóanyag-kontroll előkezelést végeztünk, majd emelkedő dózisban 5-HT-val (100, 300 és 1000 nM) kezeltük őket. A kapott eredményeink alapján a kontrollal előkezelt sejtekben 300 nM 5-HT koncentrációtól kezdődően a sejtekben szignifikánsan megnőtt a ROS mennyisége.

Ugyanakkor megfigyeltük, hogy ha a sejtek paroxetine előkezelést kaptak, a 5-HT nem tudott ROS képződést indukálni. A ROS szintje a 300 és 1000 nM koncentrációjú 5-HT-nal kezelt sejtekben szignifikánsan eltért a paroxetine-el is kezelt sejtek ROS szintjétől (8A ábra).

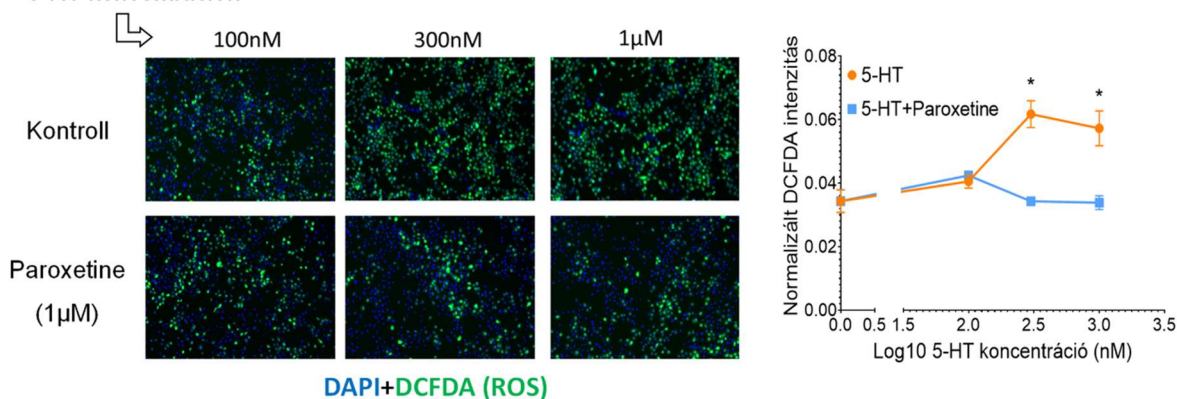
A 5-HT által kiváltott oxidatív stressz következményeinek felmérése során a DNS-károsodás szintjét γ H2AX immunfestéssel határoztuk meg. A kontroll sejtekhez képest a 10 μ M 5-HT-val kezelt sejtekben a γ H2AX-pozitív sejtek aránya szignifikánsan megemelkedett, ami a DNS-károsodás fokozódását jelezte. Amikor a sejtek paroxetine kezelést is kaptak (1 μ M), ez a hatás szignifikánsan mérséklődött, a γ H2AX-pozitív sejtek aránya jelentősen csökkent (8B ábra).

Összességében a kapott eredményeink rámutatnak, hogy a HME-hTert sejtekben a külsőleg hozzáadott 5-HT oxidatív stresszt vált ki, amely DNS-károsodáshoz vezet. Ez a hatás nem a klasszikus 5-HT jelátvitelhez köthető, mégis fontos szempont, mivel normál sejtvonalban is kimutatható, fiziológiásan is bekövetkező jelenség a 5-HT lebontása során. A paroxetine ugyanakkor képes mérsékelni ezeket a hatásokat, ami összhangban áll a korábbi kísérletekben igazolt transzporter-gátló hatással, és a paroxetine által szuppresszált transzkriptomikai útvonalakkal is.

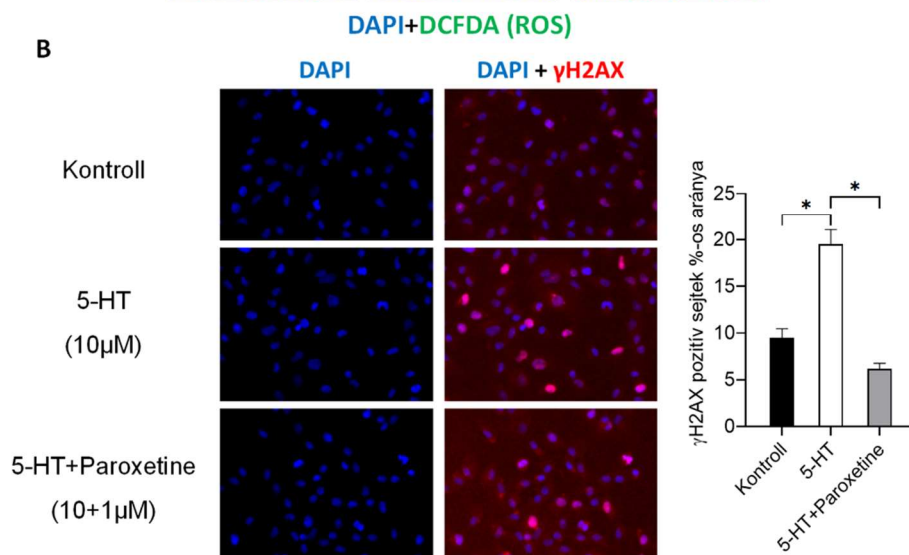
8. Ábra

A

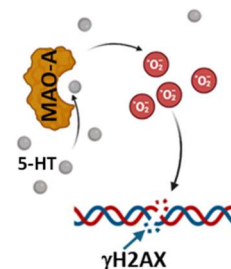
5-HT koncentrációk



B



C



8. Ábra: A sejtekbe bejutó 5-HT hatására fokozódik a ROS termelés és a γ H2AX marker kifejeződése. A, HME-hTert sejteken DCFDA jelölés segítségével kimutatott ROS tartalomról készült mikroszkópos felvételek, illetve annak sejtmagok számára normalizált fluoreszcens intenzitás értékei. B, γ H2AX kifejeződése HME-hTert sejteken immunfestés alapján, továbbá a markerre nézve pozitív kifejeződést mutató sejtek totál sejt számra vonatkoztatott arányai. (* $p < 0.05$ ANOVA, Tukey's multiple comparison test) C, Az intracelluláris 5-HT lebontásából származó ROS DNS károsításának sematikus ábrázolása.

4.5 A normál emlő epithel sejteken kifejeződő 5-HT receptorok funkcionálisan aktívak és képesek az Erk 1/2 aktivitását befolyásolni

A 5-HT intracelluláris szerepének vizsgálata után áttértünk a receptorai célzott funkcionális vizsgálatára. Ehhez a receptorok jelátviteli mechanizmusához kapcsolható másodlagos hírvivő (cAMP, IP3) szintek változását vizsgáltuk farmakológiai moduláció mellett. A kísérletek középpontjában három kiválasztott, reprezentatív receptor izoforma állt: az 5-HT_{1D} , 5-HT_7

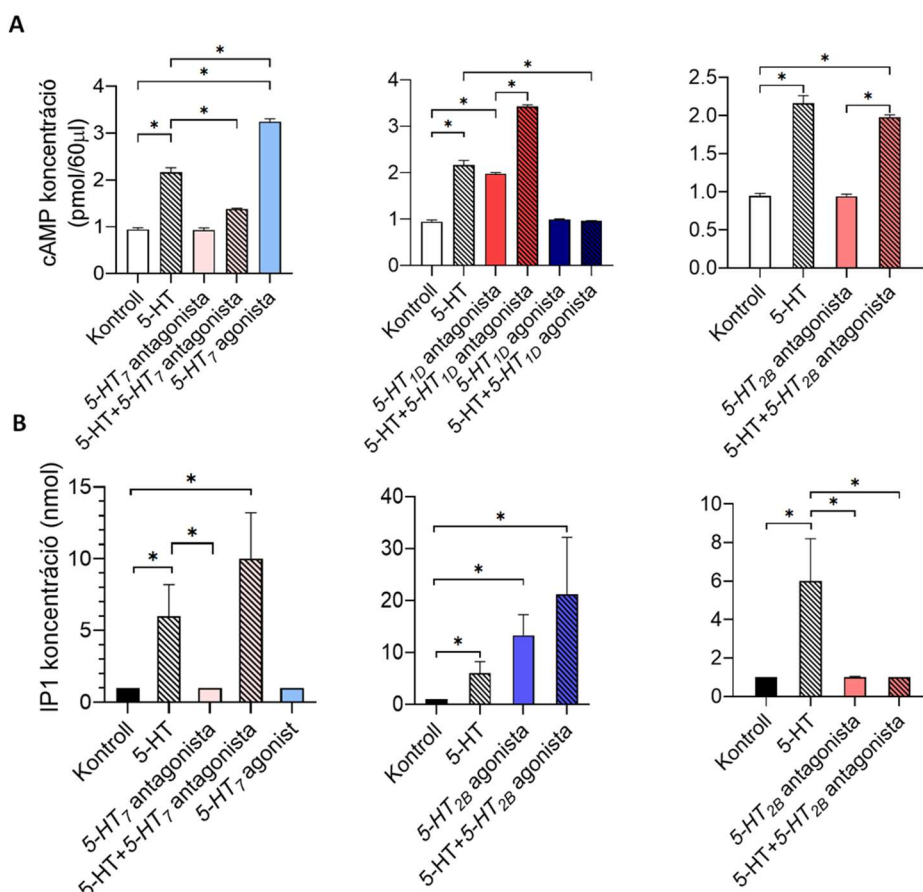
izoformák, amelyek a cAMP termelés szabályozásában játszanak szerepet, valamint az *5-HT_{2B}*, amely a phosphoinositide-jelátviteli útvonalhoz kapcsolódva az IP3 szintet befolyásolja. A cél az volt, hogy bizonyítsuk, ezek a receptorok nem csak expresszálódnak a sejtvonalban, hanem farmakológiailag modulálhatók, és aktivációjuknak vagy gátlásuknak mérhető funkcionális következménye van.

Elsőként a cAMP-szint változásait vizsgáltuk meg (9A ábra). A vizsgálataink során három receptor izoformát (*5-HT₇*, *5-HT_{1D}*, *5-HT_{2B}*) választottunk ki további vizsgálatainkhoz. Választásunkat egyrészt a hatóanyag szűrővizsgálatok indokolták, melyek rámutattak, hogy az *5-HT₇* receptor agonistája, az *5-HT_{1D}* és *5-HT_{2B}* antagonistái gátolták a sejtosztódást. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a kontrollal kezelt sejtekhez képest a 5-HT önmagában szignifikánsan növelte a cAMP mennyiségét, azonban ez *5-HT₇* antagonistája jelenlétében szignifikánsan mérséklődött. Az antagonistája önmagában nem változtatta meg a cAMP-szintet, viszont az *5-HT₇* agonista alkalmazása a 5-HT-hoz képest is szignifikánsan magasabb cAMP-szintet eredményezett. Az *5-HT_{1D}* antagonistája önmagában is szignifikánsan emelte a cAMP-szintet, és amikor 5-HT-val együtt alkalmaztuk, mindkét szer önálló alkalmazásánál magasabb cAMP-szintet mértünk. Az *5-HT_{1D}* agonista ezzel szemben önmagában nem változtatta meg a cAMP-szintet, ugyanakkor képes volt szignifikánsan visszaszorítani a 5-HT által kiváltott másodlagos hírvivő szintjének emelkedését. Az *5-HT_{2B}* antagonistája sem önmagában, sem 5-HT-val kombinálva nem változtatta meg a cAMP-szinteket. Ezek az eredmények egyúttal megerősítették a farmakológiai szerek specificitását a célzott receptor izoformák felé.

Következő lépésként az IP3 szintet követtük nyomon, amely az IP1 származék mennyiségével arányosan mérhető (9B ábra). Elsőként az *5-HT₇* receptor szerepét vizsgáltuk, ugyanazokkal a kezelésekkel, mint a cAMP-re vonatkozó vizsgálatnál. A 5-HT ebben az esetben is szignifikánsan növelte az IP3 szintet, viszont az *5-HT₇* antagonistája sem önmagában, sem 5-HT-val kombinálva nem befolyásolta a mért értékeket. Az *5-HT₇* agonista hatására nem változott az IP3 mennyisége, ami arra utalt, hogy az *5-HT₇* receptor modulációja kizárólag a cAMP-szintet érinti. Következő lépésben az *5-HT_{2B}* receptor szerepét vizsgáltuk az IP3 szint modulációjában. A 5-HT, az *5-HT_{2B}* agonista, valamint a kettő kombinációja egyaránt szignifikánsan emelte az IP3 szintet, a hatás nagyságbeli sorrendje a kontrollhoz képest növekvő volt: 5-HT < *5-HT_{2B}* agonista < 5-HT + *5-HT_{2B}* agonista. Végül az *5-HT_{2B}* antagonistája

hatását vizsgáltuk. Az *5-HT_{2B}* antagonistá önmagában nem befolyásolta az IP₃ szintet, azonban szignifikánsan visszaszorította a 5-HT által kiváltott IP₃ szint emelkedést.

9. Ábra



9. Ábra: Az *5-HT_{1D}*, *5-HT₇* és *5-HT_{2B}* receptorok farmakológiai modulációja másodlagos hírvivő szinteket szabályoz HME-hTert sejtekben. *5-HT_{1D}* agonista - PNU142633, *5-HT₇* agonista – LP211, *5-HT_{2B}* agonista – BW723C86, *5-HT_{1D}* antagonistá – LY310762, *5-HT₇* antagonistá – SB269970, *5-HT_{2B}* agonista – LY266097. Minden receptor modulátor egységesen 10µM koncentrációban volt alkalmazva. A, cAMP másodlagos hírvivő kompetitív enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) alapú kvantitálásának eredményei többféle 5-HT receptor modulátor, 5-HT kezelések mellett. (**p*<0.05 ANOVA, Tukey's multiple comparison test) B, HTRF alapú IP₁ szint mérés HME-hTert sejtekben 5-HT és 5-HT receptor modulátorokkal történő kezelést követően. (**p*<0.05 ANOVA, Tukey's multiple comparison test)

Ezek a vizsgálatok együttesen igazolták, hogy a HME-hTert sejtekben a kiválasztott 5-HT receptor izoformák nem csak jelen vannak, hanem funkcionálisan aktívak, és a farmakológiai

modulációjuk másodlagos hírvivők termelődésének szintjén is mérhető következményekkel jár. Az eredmények megerősítették a vizsgálatban használt hatóanyagok specificitását is, mivel az *5-HT_{1D}* és *5-HT₇* modulációja kizárólag a cAMP termelésre volt hatással, míg az *5-HT_{2B}* receptor kizárólag az IP3 szintet befolyásolta.

A 5-HT HME-hTert sejtekben tapasztalt antiproliferatív hatásának lehetséges mechanizmusainak feltárására a másodlagos hírvivők mellett a mitogén jelátviteli kaszkádok főbb elemeinek (Src, Akt, extracellular signal-regulated kinase - Erk 1/2) aktivitását vizsgáltuk. Fontos megjegyezni, hogy a vizsgált phosphorylációs helyek funkcionális szempontból eltérő hatásúak: az Akt (T308) és az Erk 1/2 (T202/Y204) phosphorylációja aktiváló hatású, míg a Src (Y527) phosphorylációja inaktíváló módon szabályozza a fehérje aktivitását.

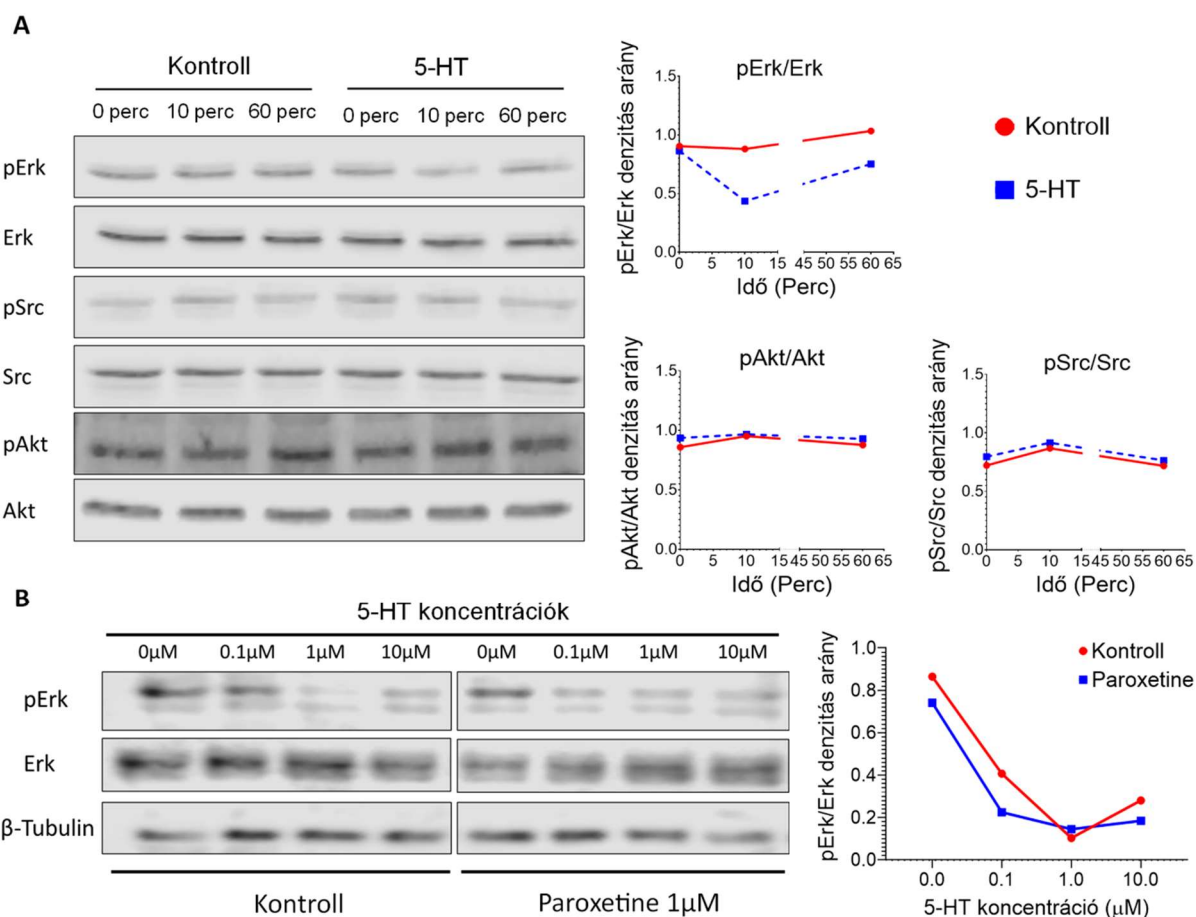
Elsőként azt vizsgáltuk, hogy a 5-HT kezelés hogyan változtatja meg a jelátviteli fehérjék phosphorylációs mintázatát (10A ábra). A HME-hTert sejteket 1 μ M 5-HT kezelésnek vetettük alá, különböző időtartamokban: 0, 10 és 60 percig. A Western blot analízis során a három vizsgált fehérje közül az Erk 1/2 esetében a phosphorylációs szint 10 perc 5-HT kezelés után jelentősen csökkent a kontrollhoz és a kiindulási állapothoz képest, majd 60 perc elteltével visszatért a kiindulási szinthez közeli értékre. Mivel a Src és az Akt esetében érdemi változás nem volt megfigyelhető, a további kísérletekben az Erk phosphorylációjának részletesebb vizsgálatára összpontosítottunk.

A következő kísérletben azt vizsgáltuk, hogy a 5-HT Erk-phosphorylációt befolyásoló hatása hogyan változik paroxetine előkezelés mellett (10B ábra). A sejteket először 1 órán keresztül kontroll vagy 1 μ M paroxetine előkezeléssel láttuk el, majd ezt követően 10 perces 5-HT kezelést alkalmaztunk különböző dózisokban (0; 1; 1 és 10 μ M). Az eredmények szerint a 5-HT minden vizsgált koncentrációban dózisfüggő módon csökkentette az Erk 1/2 phosphorylációját, ami a fehérjék inaktivációját jelzi. Megfigyeltük továbbá, hogy paroxetine előkezelés mellett a kiindulási phosphorylációs szint is alacsonyabbnak mutatkozott, és a 5-HT kezelés hatása is markánsabban mutatkozott. Ez arra utalt, hogy a paroxetine mintegy előérzékenyítette a sejteket a 5-HT-ra, így a transzporter gátlása fokozhatta a sejtfelszíni receptorok által közvetített válasz hatékonyságát.

Ezek az eredmények összességében azt mutatták, hogy a 5-HT antiproliferatív hatása legalább részben a mitogén jelátvitel egyik központi szabályozó fehérjén, az Erk-en keresztül valósul

meg. A hatás dóziszfüggőnek bizonyult, és paroxetine jelenlétében erősebben érvényesült, ami alátámasztja azt a feltevést, hogy a vizsgált jelátviteli változások elsősorban a sejt felszíni receptorok stimulációjából erednek, nem pedig intracelluláris hatások közvetítik őket.

10. Ábra



10. Ábra: A 5-HT idő- és dóziszfüggő módon csökkenti az Erk phosphorylációját, amit a paroxetine előkezelés tovább potencál. A, Erk 1/2 (T202/Y204), Src (Y527), Akt (T308) phosphorylációjának western blot vizsgálata 10 μM 5-HT kezelés mellett. Bal oldalon reprezentatív blot képeket ábrázoltunk, jobb oldalon pedig ezeknek a densitometriás eredményei láthatóak. B, Erk 1/2 (T202/Y204) phosphoryláció és β-tubulin expresszió kvantitálása Western blottal HME-hTert sejtekből, melyek előkezelésként kontrollt vagy paroxetine-t (1 μM), majd 5-HT kezelést (0-10 μM) kaptak.

4.6 Szelektív 5-HT receptor modulátorok szűrővizsgálata potenciálisan antiproliferatív hatású hatóanyagokat azonosított HME-hTert sejtekben

A 5-HT receptor izoformák szelektív vizsgálatának megtervezéséhez és kivitelezéséhez elengedhetetlen volt egy szelektív farmakológiai modulátor könyvtár (11. ábra és 2. táblázat)

összeállítása, amely lehetővé tette az egyes 5-HT receptorok aktivitásának célzott vizsgálatát. Következő kísérleteink során ezen hatóanyagok szűrését végeztük el HME-hTert sejtekben antiproliferatív hatás alapján, annak érdekében, hogy azonosíthassuk azokat a receptor izoformákat, melyek felelősek lehetnek a szerotoninerg stimuláció által kiváltott antiproliferatív hatásért. A hatóanyagokat többféle dózisban alkalmaztuk, 0,1–1–10 μM koncentrációkban, és az egyes kezelések során tapasztalt változásokat a vizsgált hatóanyagnak megfelelő hordozóanyag kontrolljához viszonyítottunk az adatok feldolgozása során.

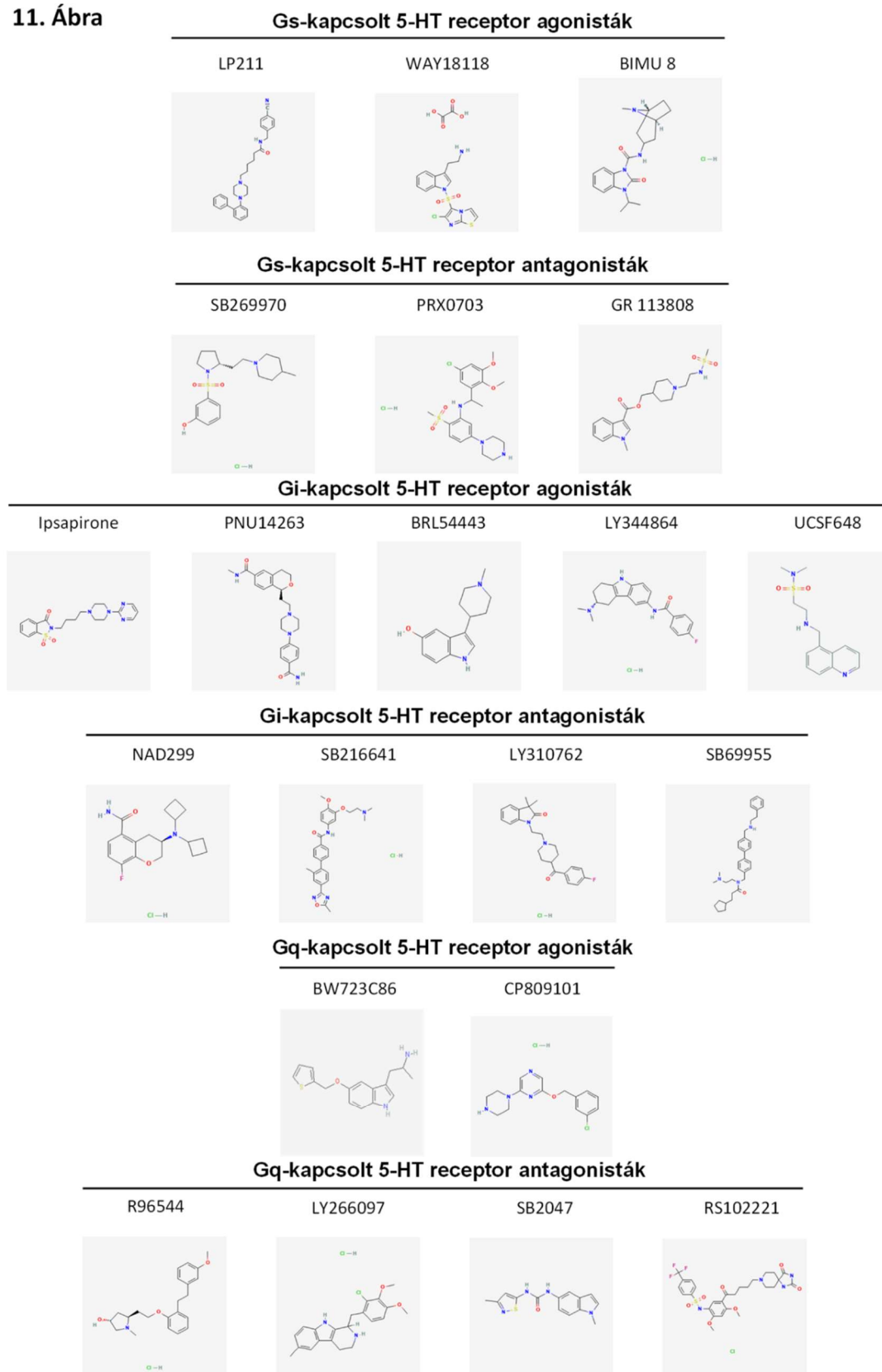
A G_s -kapcsolt receptorok agonistái közül (12A ábra) két vegyület mutatott jelentős proliferációt gátló hatást: az 5-HT_7 agonista (LP211) és az 5-HT_6 agonista (WAY181187). Mindkét hatóanyag több mint 50%-os sejtszám csökkenést eredményezett a vizsgált dózistartományban. Ezzel szemben a G_s -kapcsolt receptorok antagonistái (12B ábra) nem idéztek elő 50%-ot meghaladó proliferáció gátlást egyik vizsgált koncentrációban sem.

A G_i -kapcsolt receptorok agonistái közül (12C ábra) egyedül az LY344864, a 5-HT_{1F} receptor szelektív agonistája okozott sejtszám csökkenést. Érdeemes kiemelni, hogy az $5\text{-HT}_{1E/F}$ kettős agonista (BRL54443) nem váltott ki hasonló hatást. A G_i -kapcsolt receptorok antagonistái közül (12D ábra) három vegyület bizonyult antiproliferatív hatásúnak. Az 5-HT_{1B} receptor antagonistája (SB216641), az 5-HT_{1D} receptor antagonistája (LY310762), valamint az 5-HT_{5A} receptor antagonistája (SB699551) hatóanyagok mindegyike 50%-nál nagyobb proliferáció gátlást idézett elő.

A G_q -kapcsolt receptor agonisták vizsgálata során (12E ábra) az 5-HT_{2C} agonista (CP809101) alkalmazása eredményezett sejtszám csökkenést. A G_q -kapcsolt receptor antagonisták közül (12F ábra) két vegyület emelkedett ki: az 5-HT_{2A} receptor antagonistája (R96544) és az 5-HT_{2B} receptor antagonistája (LY266097), melyek 50%-nál nagyobb antiproliferatív hatást mutattak.

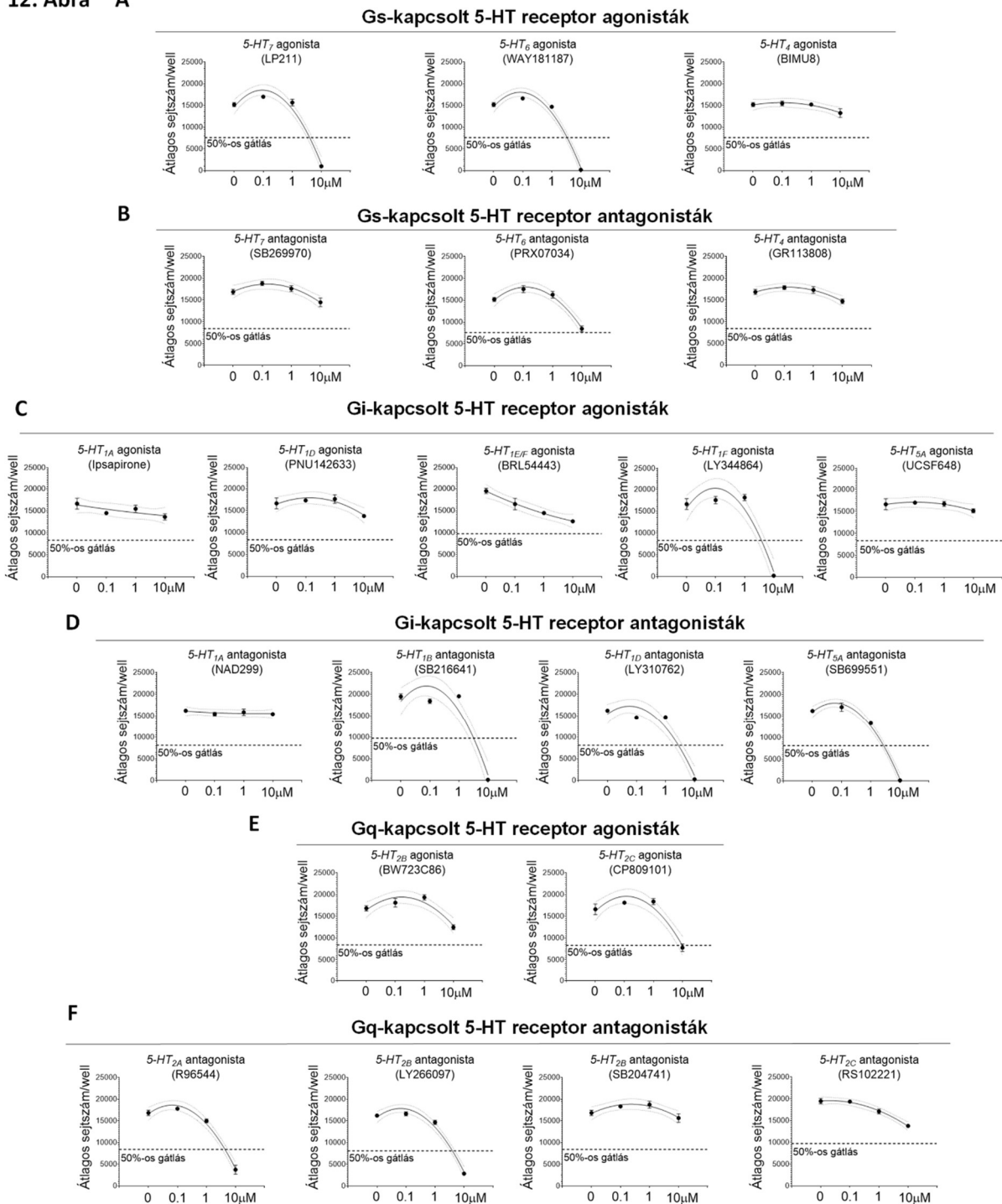
A dózis-hatás vizsgálatok eredményeinek további elemzését az IC_{50} értékek számítása tette lehetővé. Ennek alapján rangsoroltuk a vizsgált hatóanyagokat (13. ábra), és meghatároztuk, mely vegyületek rendelkeznek a legerősebb antiproliferatív hatással a HME-hTert sejteken. A vizsgálatokhoz egy 4 μM -os küszöbértéket állapítottunk meg, mely alapján több hatóanyag is kiemelkedett antiproliferatív hatás alapján a vizsgált molekulakönyvtárból (5. táblázat).

11. Ábra



11. Ábra: A vizsgálatokhoz használt 5-HT receptor modulátorok szerkezeti képletei.

12. Ábra A



12. Ábra: Szelektív 5-HT modulátorok dózis-hatás alapú szűrése HME-hTert sejtekben potenciálisan antiproliferatív hatású hatóanyagokat azonosított. A, G_s-kapcsolt 5-HT receptor agonisták- B, G_s-kapcsolt 5-HT receptor antagonisták- C, G_i-kapcsolt 5-HT receptor agonisták- D, G_i-kapcsolt 5-HT receptor antagonisták- E, G_q-kapcsolt 5-HT receptor agonisták- F, G_q-kapcsolt 5-HT receptor antagonisták dózis-hatás vizsgálatának eredményei.

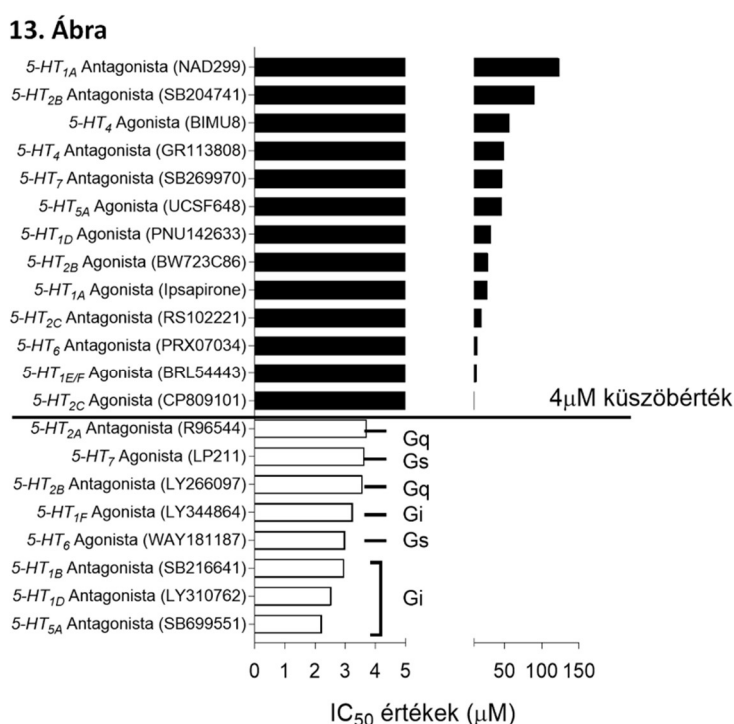
Hatóanyagnév	Hatás	G-fehérje kapcsoltság	Cél receptor	Relatív sejtszám 10µM koncentrációnál (Kontroll %)	p-érték (10µM)	IC ₅₀ érték (µM)	95% konfidencia intervallum (µM)
BIMU8	Agonista	G _s	5HT ₄	87,3	0.13	56.26	30.09 - 182.0
WAY181187			5HT ₆	1,2	<0.001	2.99	1.40 - 6.47
LP211			5HT ₇	6,6	<0.001	3.63	1.60 - 8.38
GR113808	Antagonista		5HT ₄	87,3	0.04	49.16	30.33 - 101.4
PRX07034			5HT ₆	55,7	<0.001	13.45	6.99 - 29.2
SB269970			5HT ₇	85,8	0.088	46.91	24.59 - 152.1
IPSAPIRONE	Agonista	G _i	5HT _{1A}	81,8	0.077	26.71	11.13 - 131.0
PNU142633			5HT _{1D}	92,6	0.066	31.78	21 - 54.23
BRL54443			5HT _{1E/F}	64,6	<0.001	12.81	4.31 - 45.55
LY344864			5HT _{1F}	1,3	0.011	3.25	1.38 - 7.71
UCSF648	5HT _{5A}		91	0.3	46.19	27.78 - 99.84	
NAD299	Antagonista		5HT _{1A}	95,2	0.148	123.4	48.43 - ND
SB216641			5HT _{1B}	0,8	<0.001	2.97	1.32 - 6.69
LY310762			5HT _{1D}	1,7	<0.001	2.54	1.25 - 5.16
SB699551			5HT _{5A}	0,9	<0.001	2.23	1.17 - 4.25
BW723C86	Agonista	G _q	5HT _{2B}	74,1	0.002	27.64	14.34 - 75.05
CP809101			5HT _{2C}	46,7	0.001	9.014	5.58 - 14.88
R96544	Antagonista		5HT _{2A}	22,3	0.037	3.71	2.43 - 5.66
LY266097			5HT _{2B}	17,6	<0.001	3.58	2.31 - 5.55
SB204741			5HT _{2B}	92,9	0.345	90.02	35.08 - ND
RS102221			5HT _{2C}	70,8	<0.001	19.25	12.59 - 31.56

5. Táblázat: Szelektív 5-HT modulátorok szűrési eredményei HME-hTert sejtekben. (Szürke kiemelés <4µM IC₅₀ érték; Kék kiemelés >4µM IC₅₀ érték)

A vizsgált hatóanyagok közül IC₅₀ érték alapján a legmagasabbtól a legalacsonyabb értékig a következő sorrend volt megállapítható: 5-HT_{2A} antagonist (R96544), 5-HT₇ agonista (LP211), 5-HT_{2B} antagonist (LY266097), 5-HT_{1F} agonista (LY344864), 5-HT₆ agonista (WAY181187), 5-HT_{1B} antagonist (SB216641), 5-HT_{1D} antagonist (LY310762) és 5-HT_{5A} antagonist (SB699551). Ezen vegyületek mindegyike a 4 µM-os határérték alatti IC₅₀ értéket mutatott HME-hTert sejtekben, továbbá G-fehérje-kapcsoltság alapján 2 db G_q-kapcsolt receptor antagonist, 3 db G_i-kapcsolt receptor antagonist, 1 db G_i-kapcsolt receptor agonista és 2 db G_s-kapcsolt agonista került ki, mint legpotensebb antiproliferatív hatóanyag.

Az 5. táblázat a dózis-hatás szűrővizsgálatok kvantitatív adatait foglalja össze, részletesen bemutatva a vizsgált 5-HT receptor modulátorok antiproliferatív hatását. A táblázat tartalmazza a 10 µM-os kezelések során mért normalizált sejtszámokat a kontrollokhoz viszonyítva, a hozzájuk tartozó p-értékeket, valamint az IC₅₀ értékeket és a 95%-os konfidencia intervallumokat.

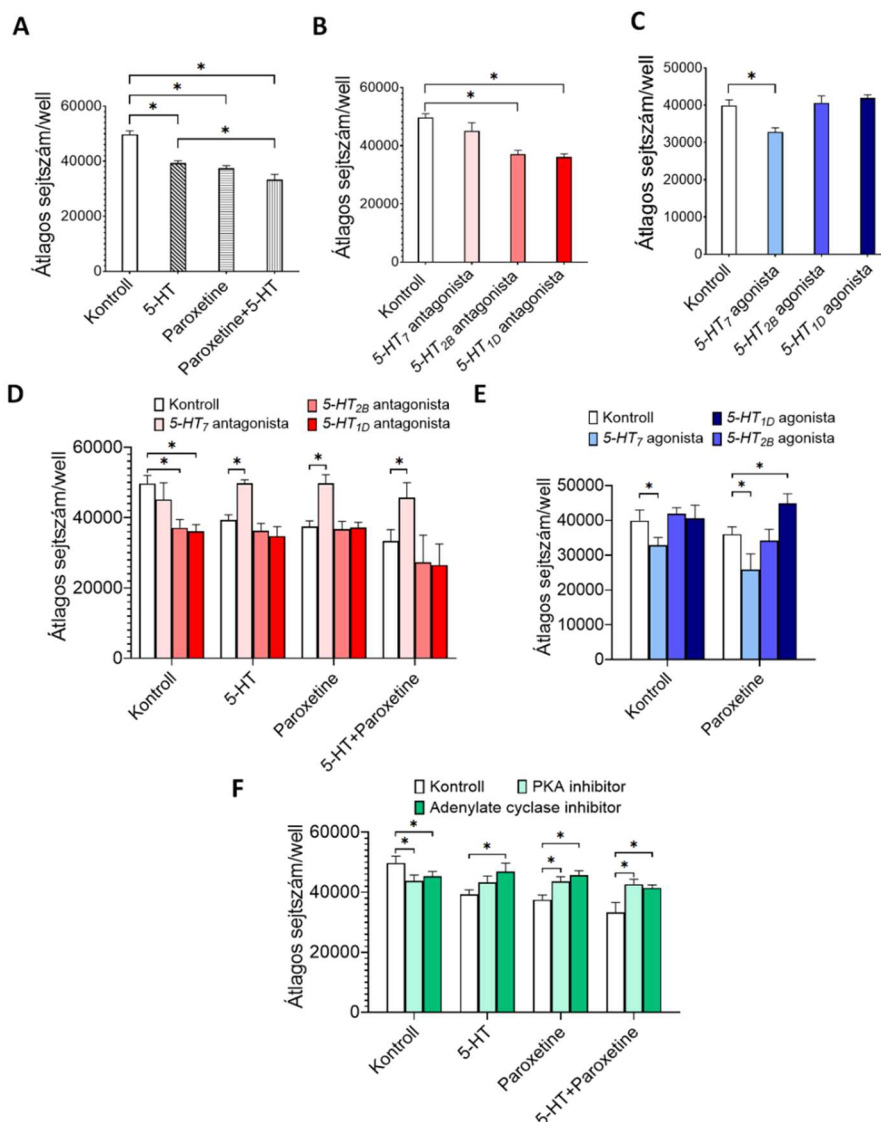
A szelektív 5-HT receptor-modulátorokkal végzett szűrővizsgálatok alapján több olyan receptor-izoforma azonosítható, amelyek aktiválása vagy gátlása antiproliferatív hatást vált ki HME-hTert sejtekben. A továbbiakban a receptor-izoformák funkcionális szerepének pontosítását tűztük ki célul. A vizsgálatok pontos célja az volt, hogy tisztázzuk, mely receptorok játszanak közre a 5-HT és a paroxetine által kiváltott sejtszám csökkenésben, valamint, hogy a G-fehérjéhez kapcsolódó jelátviteli útvonalak gátlásával alátámasszuk a megfigyelt hatások jelátviteli hátterét. Ehhez HME-hTert sejteket előkezeltünk receptor szelektív modulátorokkal, majd ezt követően végeztünk rajtuk szerotoninerget stimulációt (14A-E ábra).



13. Ábra: A szűrővizsgálatban tesztelt 5-HT receptor modulátorok rangsorolása IC₅₀ értékek alapján. A markáns antiproliferatív hatást jelző küszöbértéket 4 µM IC₅₀ értéknél határoztuk meg

Ezek az eredmények összességében rávilágítottak arra, hogy a 5-HT és a paroxetine antiproliferatív hatása elsősorban az 5-HT₇ receptor közvetítésével valósul meg, de az 5-HT_{1D} és az 5-HT_{2B} receptorok gátlása is hozzájárulhat a sejtszám csökkenéséhez. A G_s-fehérjéhez kapcsolt jelátviteli útvonalak gátlásával szerzett adatok alátámasztották, hogy az antiproliferatív hatás mechanizmusa elsősorban az 5-HT₇/adenilát-cikláz/cAMP/PKA tengely aktivációjához köthető (14F ábra).

14. Ábra



14. Ábra: A 5-HT és paroxetine antiproliferatív hatását elsősorban az 5-HT₇ receptor aktiválása közvetíti HME-hTert sejtekben. A, A szerotoninerget stimulációt imitáló 5-HT, paroxetine és a kettő kombinációjának proliferációra kifejtett hatásait bemutató grafikon. B, 5-HT₇, 5-HT_{2B}, 5-HT_{1D} receptor antagonisták önálló alkalmazásának proliferációra kifejtett hatása. C, 5-HT₇, 5-HT_{2B}, 5-HT_{1D} receptor agonisták önálló alkalmazásának proliferációra kifejtett hatása. D, HME-hTert sejteket szerotoninerget hatóanyagokkal (5-HT, paroxetine és kombinációjuk) előkezelt sejteken 5-HT receptor antagonistákkal történő kezelés proliferációra kifejtett hatásai. E, HME-hTert sejteket paroxetine-el előkezelt sejteken 5-HT receptor agonistákkal történő kezelés proliferációra kifejtett hatásai. F, HME-hTert sejteket szerotoninerget hatóanyagokkal (5-HT, paroxetine és kombinációjuk) előkezelt sejteken PKA vagy adenilát-cikláz inhibitorokkal történő kezelés proliferációra kifejtett hatásai. (* $p < 0.05$ ANOVA, Dunnett's multiple comparison test with a single pooled variance)

4.7 A receptorok G-fehérje kapcsoltsága meghatározza a receptor izoforma aktivációja során a proliferációra kifejtett hatását

A 5-HT receptor modulátorok szűrővizsgálata során, az antiproliferatív hatású receptor izoformák mintázata alapján felmerült, hogy az általunk azonosított G_s -fehérje-kapcsoltság alapú hatásmechanizmus nem korlátozódik kizárólag a 5-HT rendszerre. Annak igazolására, hogy ez a mechanizmus más monoamin receptor családok esetén is releváns lehet, kiterjesztettük a vizsgálatainkat egyéb monoamin receptor modulátorok bevonásával. A további kísérleteinkben muszkarinos acetyl-cholin receptorok, dopamin-receptorok és hisztamin-receptorok szelektív modulátorait (15. ábra és 3. táblázat) szűrtük antiproliferatív hatás alapján egységes 1 μ M hatóanyagkoncentráció mellett.

A muszkarinos receptor modulátorok tesztelése során (16A ábra) az AQ-RA741 (*CHRM2* antagonista), PD102807 (*CHRM4* antagonista), McN-A 343 (*CHRM1* agonista), Pirenzepine (*CHRM1* antagonista) és J104129 fumarate (*CHRM3* antagonista) hatását vizsgáltuk. A kontrollhoz viszonyítva két hatóanyag mutatott erősebb antiproliferatív hatást, a *CHRM4*- és a *CHRM3* receptorok antagonistái, amelyek a sejtszámot a kontrollhoz képest 75% alá csökkentették. A többi hatóanyag jelentősen nem befolyásolta a proliferációt, egyedül a *CHRM1* agonista közelítette meg az általunk kijelölt 75%-os küszöbértéket.

A dopamin-receptor modulátorok közül (16B ábra) a dihidrexidine (*DRD1* és *DRD5* agonista), az L-741,626 (*DRD2* antagonista) és az NGB2904 (*DRD3* antagonista) bizonyult hatékonynak. A kontrollhoz képest mindhárom vegyület a 75% alá csökkentette a sejtszámot.

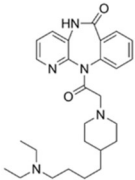
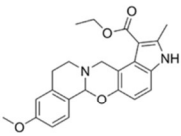
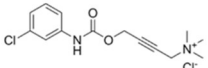
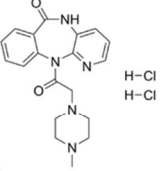
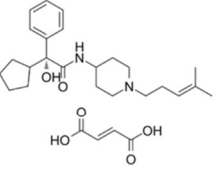
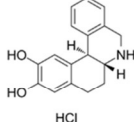
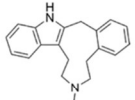
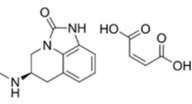
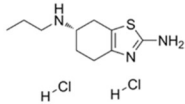
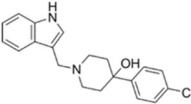
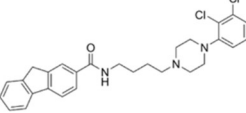
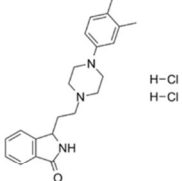
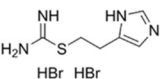
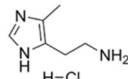
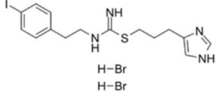
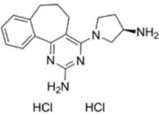
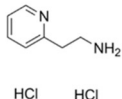
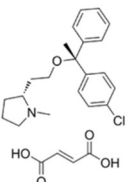
A hisztamin-receptor modulátorok vizsgálata során (16C ábra) két hatóanyag váltott ki jelentős antiproliferatív hatást: a iodofenpropit (*HRH3* antagonista) és a clemastine (*HRH1* antagonista) egyaránt a 75%-os küszöbérték alá csökkentette a sejtszámot.

Összességében vizsgálataink alapján a G_q - (*CHRM3*, *HRH1*) és G_i -kapcsolt receptorok (*CHRM4*, *DRD2*, *DRD3*, *HRH3*) gátlása, illetve a G_s -kapcsolt receptorok stimulálása (*DRD1* és *DRD5*) antiproliferatív hatással jár HME-hTert sejteken (6. táblázat).

Mivel a hatóanyag szűrővizsgálataink során több receptoreszalád (5-HT, dopamin, hisztamin, muszkarinos acetylcholin receptorok) tagjait is teszteltük, lehetőség nyílt arra, hogy az egyedi hatásokat a G-fehérje-kapcsoltság függvényében rendezzük össze.

15. Ábra

Muszkáros acetyl-choline receptor modulátorok

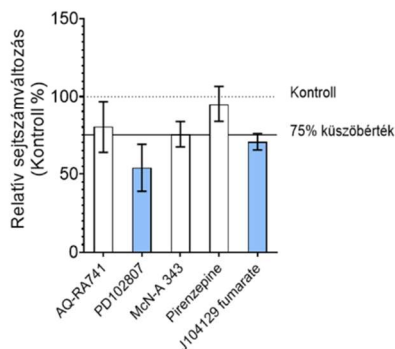
Gi kapszolt receptor antagonisták		Gq kapszolt receptor agonisták		Gq kapszolt receptor antagonisták	
AQRA741	PD102807	McN-A343	Pirenzepine	J104129	
					
Dopamin receptor modulátorok					
Gs kapszolt receptor agonista			Gs kapszolt receptor antagonisták		
Dihydropyridine hydrochloride			LE300		
					
Gi kapszolt receptor agonisták			Gi kapszolt receptor antagonisták		
Sumanitrol	Pramipexole	L-741626	NGB2904	PD168568	
maleate	dihydrochloride			dihydrochloride	
					
Hisztamin receptor modulátorok					
Gi kapszolt receptor agonisták			Gi kapszolt receptor antagonisták		
Imetit	4-methylhistamine	Iodophenpropit	A943931		
	dihydrochloride		dihydrochloride		
					
Gq kapszolt receptor agonista			Gq kapszolt receptor antagonisták		
2-pyridylethylamine			AQRA741		
dihydrochloride					
					

15. Ábra: Muszkáros acetyl-cholin-, dopamin-, hisztamin GPCR modulátorok és jelátviteli inhibitorok szerkezeti képletei.

16. Ábra

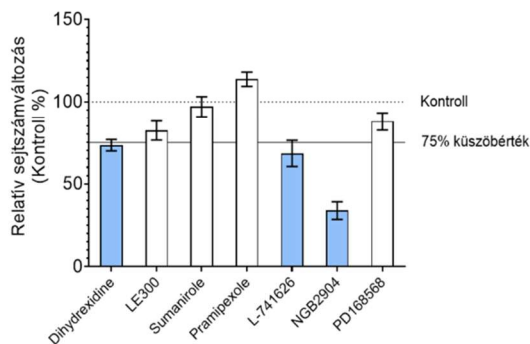
A

Muskarinos acetyl-choline receptor modulátorok



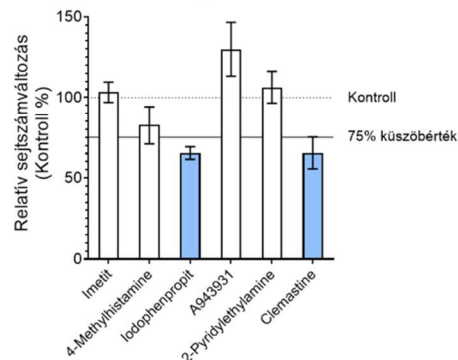
B

Dopamin receptor modulátorok



C

Hisztamin receptor modulátorok



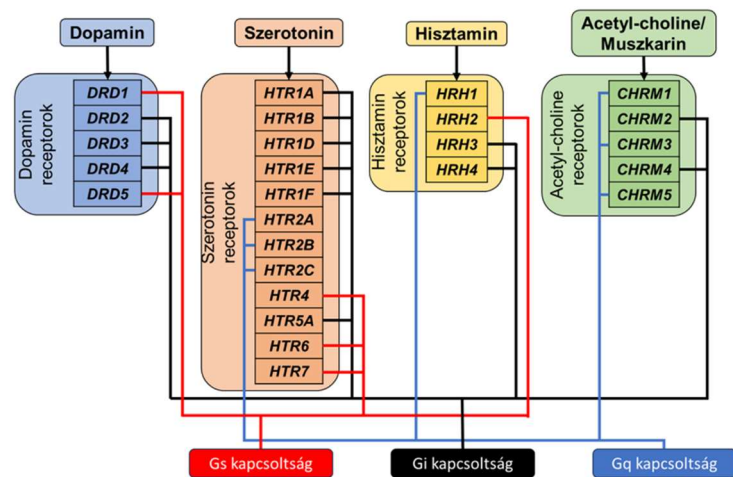
16. Ábra: Monoaminerg receptorok szelektív modulátorainak szűrése újabb antiproliferatív hatóanyagokat azonosított. A, Muskarinos acetyl-cholin receptor modulátorok- B, Dopamin receptor modulátorok- C, Hisztamin receptor modulátorok HME-hTert proliferációra kifejtett hatásai. Kékkel a 75% küszöbérték alatti normalizált sejtszámot eredményező hatóanyagokat emeltük ki. (* $p < 0.05$ ANOVA, Dunnett's multiple comparison test with a single pooled variance)

Hatóanyag név	Receptorcsalád	Cél receptor	G-fehérje kapcsoltság	Hatás	Relatív sejtszám 1 μ M koncentrációnál (Kontroll %)
AQRA741	Acetyl-Choline receptorok	CHRM2	Gi	Antagonista	80.31
PD102807		CHRM4			54.02
McN-A-343		CHRM1	Gq	Agonista	75.45
Pirenzepine dihydrochloride		CHRM1		Antagonista	95.16
J104129 fumarate		CHRM3			70.6
Dihydrxidine hydrochloride	Dopamin receptorok	DRD1, DRD5	Gs	Agonista	73.37
LE300		DRD1		Antagonista	82.31
Sumanitrole maleate		DRD2	Gi	Agonista	97
Pramipexole dihydrochloride		DRD3			113.76
L-741,626		DRD2			68.36
NGB2904		DRD3		Antagonista	33.85
PD168568 dihydrochloride		DRD4			87.89
Imetit dihydrobromide	Hisztamin receptorok	HRH3, HRH4	Gi	Agonista	103.26
4-Methylhistamine dihydrochloride		HRH4			82.58
Iodophenpropit dihydrobromide		HRH3		Antagonista	65.31
A943931 dihydrochloride		HRH4			129.89
2-Pyridylethylamine dihydrochloride		HRH1	Gq	Agonista	106.31
Clemastine fumarate		HRH1		Antagonista	65.4

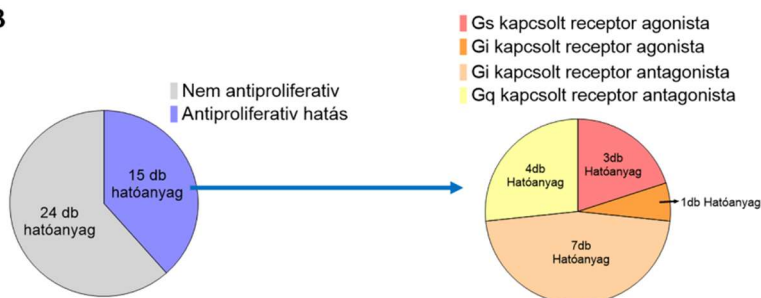
6. Táblázat: A monoamin receptor modulátorok proliferációra gyakorolt hatásainak kvantitatív összefoglalása. Kék színnel azokat a hatóanyagokat emeltük ki, melyek nagyobb mint 25%-os sejtszám csökkenést indukáltak HME-hTert sejtekben 1 μ M dózis mellett.

17. Ábra

A



B



17. Ábra: A proliferációt gátló hatást elsősorban a receptorok G-fehérje kapcsoltsága határozza meg. A, Az általunk vizsgált GPCR családok tagjainak G-fehérje kapcsoltságának összefoglalása. B, A hatóanyag-szűrővizsgálataink eredményeinek összegzése a G-fehérje kapcsoltság és az agonista/antagonista hatás függvényében.

A vizsgált receptorcsaládokon belül mindhárom G-fehérje-kapcsoltságú izoforma megtalálható (17A ábra). Ugyanakkor a vizsgált 39 hatóanyag közül 15 bizonyult hatékonynak a sejtsztódás gátlásában, míg 24 nem váltott ki szignifikáns változást. A szűrővizsgálatok összesített adatai egyértelműen megerősítik azt a szerotonin receptorok kapcsán felállított következtetést, mely szerint a G_q- és G_i-kapcsolt receptorok gátlása, illetve a G_s-kapcsolt receptorok aktiválása jellemzően antiproliferatív válaszhoz vezet HME-hTert sejtekben. Ez a mintázat (17B ábra) tehát függetlennek bizonyult a receptorcsalád típusától, és elsősorban a G-fehérje-kapcsoltság határozta meg a biológiai választ.

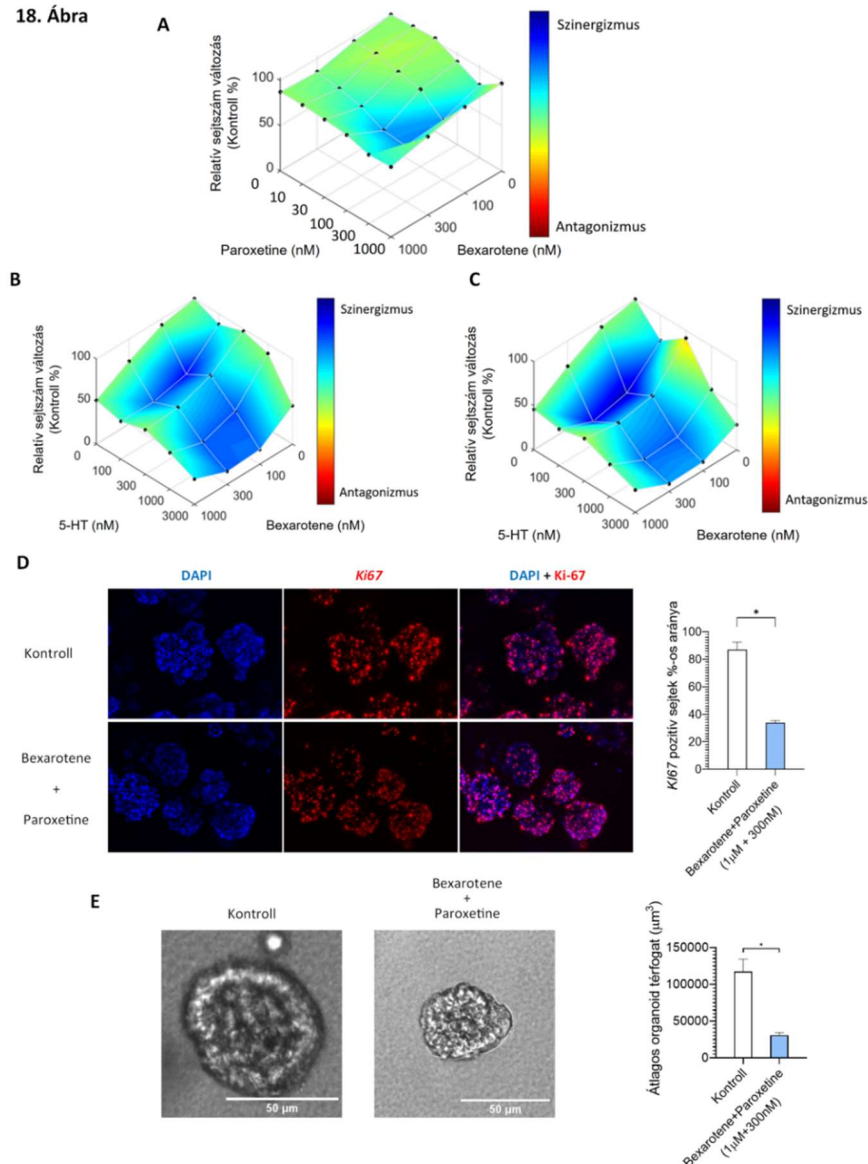
4.8 A 5-HT receptorok sejtfelszíni stimulációja szinergikusan potenciálja a bexarotene antiproliferatív hatását normál emlő epithel sejtekben

Mivel a bizonyítottan kemopreventív hatású rexinoid alapú kezelések klinikai alkalmazását limitálja azok kedvezőtlen mellékhatás profilja, felvetettük, hogy az általunk feltárt monoaminerg stimuláció vajon alkalmas lehet-e additív vagy szinergikus, rexinoid alapú kombináció létrehozására. Az additív vagy szinergista kombinációk használata lehetőséget biztosítana mindkét hatóanyagból alacsonyabb dózis alkalmazására, mely csökkentheti a kialakuló mellékhatásokat is. A kombinált kezelések hatásosságának teszteléséhez egy bizonyítottan kemopreventív hatású rexinoidot, a bexarotene-t kombináltunk szerotoninerg hatóanyagokkal.

A kombinációk dózis-hatás vizsgálata során paroxetine és bexarotene koncentrációinak különböző kombinációit alkalmaztuk HME-hTert tenyészeteken proliferációs assay során (18A ábra). A Loewe szinergia analízis kimutatta, hogy a két hatóanyag között szinergista kölcsönhatás érvényesül 300 nM - 1 μ M koncentráció tartományban. A paroxetine mellett a 5-HT bexarotenenel való kombinálását is dózis-hatás vizsgálatokban teszteltük (18B-C ábra). A bexarotene és 5-HT kombinációja mellett ez esetben a sejtek kontroll vagy paroxetine (1 μ M) kezelést is kaptak. Az eredmények alapján már alacsony koncentrációnál (100 nM) is erős szinergia volt mérhető a bexarotene és 5-HT között, amelyet paroxetine jelenléte tovább fokozott.

3D HME-hTert szferoidokon végzett Ki-67 proliferációs marker mérési eredményei (18D ábra) azt mutatták, hogy a bexarotene és paroxetine kombinációja szignifikánsan csökkentette a Ki-67 pozitív sejtek százalékos arányát. Ugyanezen kombináció hatását szferoid méret alapján is értékeltük, és hasonlóan szignifikáns csökkenést figyeltünk meg kombinált kezelés esetén (18E ábra).

18. Ábra



18. Ábra: A bexarotene és a paroxetine kombinációja szinergikusan gátolja a HME-hTert sejtek proliferációját. A, Loewe szinergia analízis eredményei paroxetine és bexarotene dózis-hatás kombinációs kísérletből. Az eredmények a kontroll (DMSO-ETOH) kezelés sejtszámaihoz viszonyított %-os értékben lettek kifejezve. B-C, Loewe szinergia analízis eredményei 5-HT és bexarotene dózis-hatás kombinációs kísérletből. A sejtek a kombinációk mellett kontrollal (DMSO-EtOH) (B) vagy paroxetine-el (C) voltak előkezelve. Az eredmények a kontroll (DMSO-EtOH) kezelés sejtszámaihoz viszonyított %-os értékben lettek kifejezve. D, 3D HME-hTert spheroidok Ki-67 immunfestésének reprezentatív mikroszkópos képei, valamint az ezek kiértékeléséből származó Ki-67 pozitivitásra vonatkozó sejtek arányai a totál sejtszámra vonatkoztatva. (* $p < 0.05$ T-test) E, HME-hTert spheroidok méreteit reprezentáló fázis-kontraszt képek, és a spheroidok méretének méréséből származó eredmények. (* $p < 0.05$ T-test)

4.9 A bexarotene alapú szinergikus kombinációk célgénje, a *ZG16B* expressziója az *ARID1A*-n keresztül farmakológiailag modulálható

A bexarotene és szerotoninergerg stimuláció közti szinergikusan antiproliferatív hatás azonosítása után, a további kísérletekben bevontunk egy másik ismert rexinoid alapú kombinációt is, a bexarotene és carvedilol kombinációját. Az utóbbi kombináció bevonását a munkacsoport előzetes kísérletes megfigyelései vetették fel, melyek szerint a bexarotene és a carvedilol kombinációja szintén szinergikusan antiproliferatív hatást fejt ki normál emlő epithel sejteken, továbbá korábbi állatkísérletes adatok alapján ez a kombináció MMTV-*ERBB2* transzgenikus állatmodellben hatékonyan bizonyult az emlődaganat kialakulásának megakadályozásában^{64,171,172}.

A doktori kutatásom következő kérdésfelvetése az volt, hogy vajon azonosítható-e olyan célgén, amelynek expressziós szabályozása egyezést mutat mind az általam korábban vizsgált bexarotene + paroxetine és a bexarotene + carvedilol kombináció hatására. Ezen kívül a karakterizálni kívánt célgén további választási kritériumaként határoztuk meg, hogy a célpontnak legyen biológiai relevanciája, azaz feltételezhetően onkogén vagy tumor szuppresszor szerepe emlődaganatokban.

A felsorolt kritériumok alapján a választásunk *ZG16B* génre esett, mely mRNS szinten csökkenő expressziót mutatott mindkét vizsgált kombináció hatására (19A ábra), továbbá bexarotene + carvedilol esetén ez az expresszióbeli csökkenés fehérje szinten is igazolható volt (19B ábra). Emellett emlődaganatokban szignifikánsan magasabb szintű kifejeződést mutat a normál emlőszövethez képest, továbbá a TCGA adatai (19C-D ábra) alapján az emlődaganat szerepel második helyen, mint legmagasabb *ZG16B* expresszióval bíró daganattípus. Mindezen expressziós adatok alapján, továbbá figyelembe véve a hasnyálmirigy daganatokban leírt onkogén funkcióit, a *ZG16B* potenciálisan onkogén szereppel bírhat emlődaganatokban is^{155-157,159,173}.

A *ZG16B* rexinoid alapú szinergikus kombinációk általi szuppressziójának igazolását követően kísérleteket végeztünk a szuppresszió mechanizmusának feltárása érdekében. Kísérleteink során az *ARID1A* szerepét vizsgáltuk, amely a SWI/SNF kromatin-remodelláló komplex egyik meghatározó alegysége. Az *ARID1A* a kromatin szerkezetének módosítása révén (20A ábra) képes génexpressziós programokat szabályozni, így alkalmas lehet olyan enhancer régiók aktivitásának modulálására, amelyek közvetlenül befolyásolják a célgének kifejeződését. Mivel

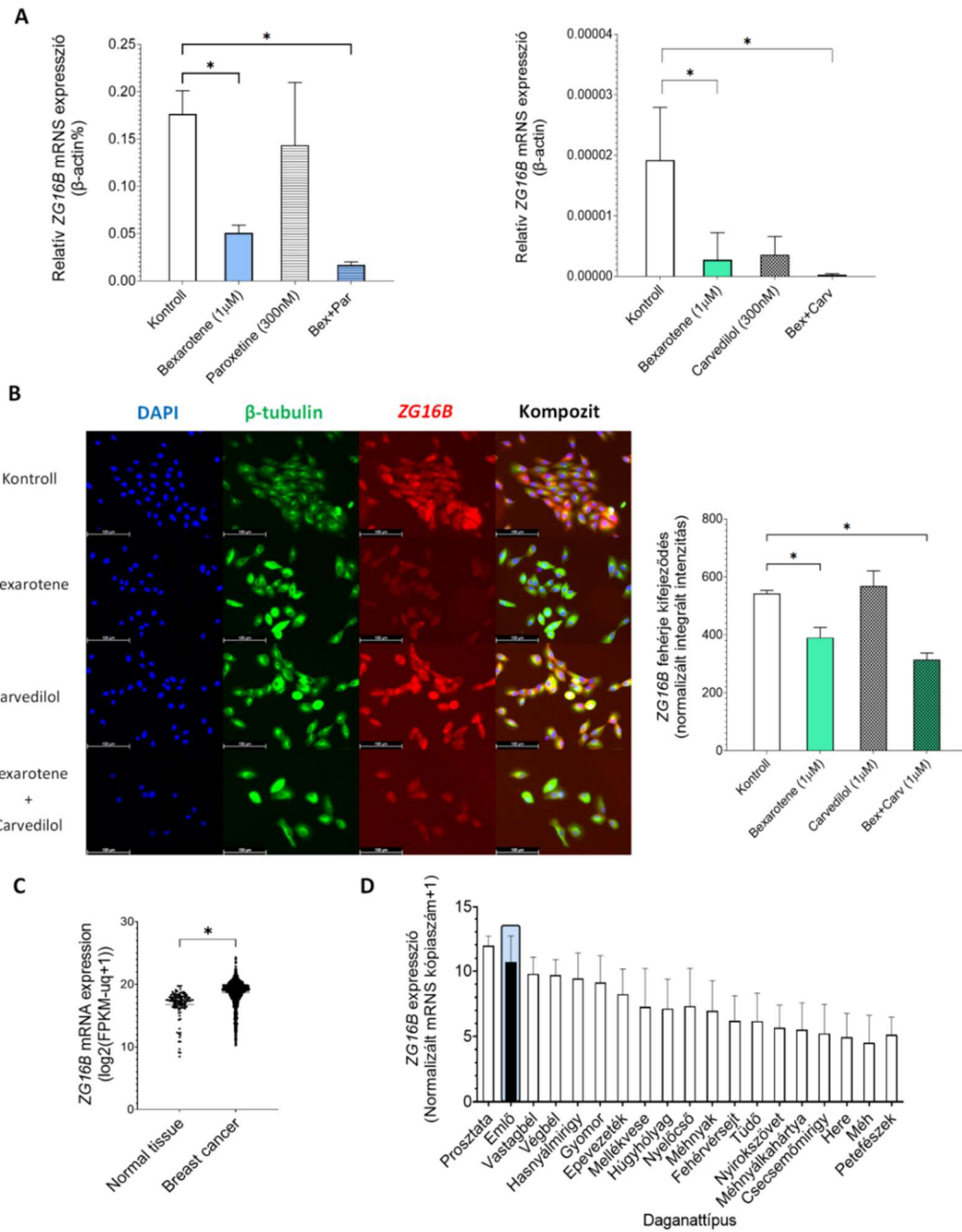
előzetes kísérletes adatok alapján a bexarotene + carvedilol kombinációja fokozza az *ARID1A* expresszióját, ezért felmerült, hogy ez a mechanizmus kulcsfontosságú lehet a *ZG16B* szuppressziójában⁶⁴.

A kombinációs kezelés során *ARID1A* által szabályozott genomi régiók azonosítására ChIP-szekvenálást végeztünk HME-hTert sejtekben, amelyeket kontrollal vagy bexarotene és carvedilol kombinációjával kezeltünk. Az eredmények rávilágítottak, hogy a *ZG16B* gént követő közeli genomi régióban jelentős *ARID1A* dúsulás figyelhető meg a kombinált kezelés hatására (20B ábra). Az azonosított genomi terület funkcionálisan egy enhancer régiónak feleltethető meg. Ezzel párhuzamosan a *H3K27ac* módosított hiszton fehérje dúsulása – amely aktív enhancerek jellegzetes epigenetikai markere – csökkent a kezelt mintákban. Az így kapott mintázat, vagyis az *ARID1A*-csúcsot kétoldról szegélyező *H3K27ac*-jelek (hills and valley mintázat), a kromatin állapotának farmakológiai kezeléstől függő átrendeződésére utal.

A ChIP-szekvenálásból származó eredményeket ChIP-qPCR vizsgálatok révén erősítettük meg. Az *ARID1A* ChIP mintákban szignifikánsan magasabb dúsulást mértünk a *ZG16B* enhancer régióban a bexarotene + carvedilol kezelést követően (20C ábra). Ezzel szemben a *H3K27ac* ChIP mintákban ugyanebben a régióban szignifikánsan alacsonyabb jelintenzitás volt detektálható (20D ábra), mely összhangban volt a szekvenálási eredményekkel.

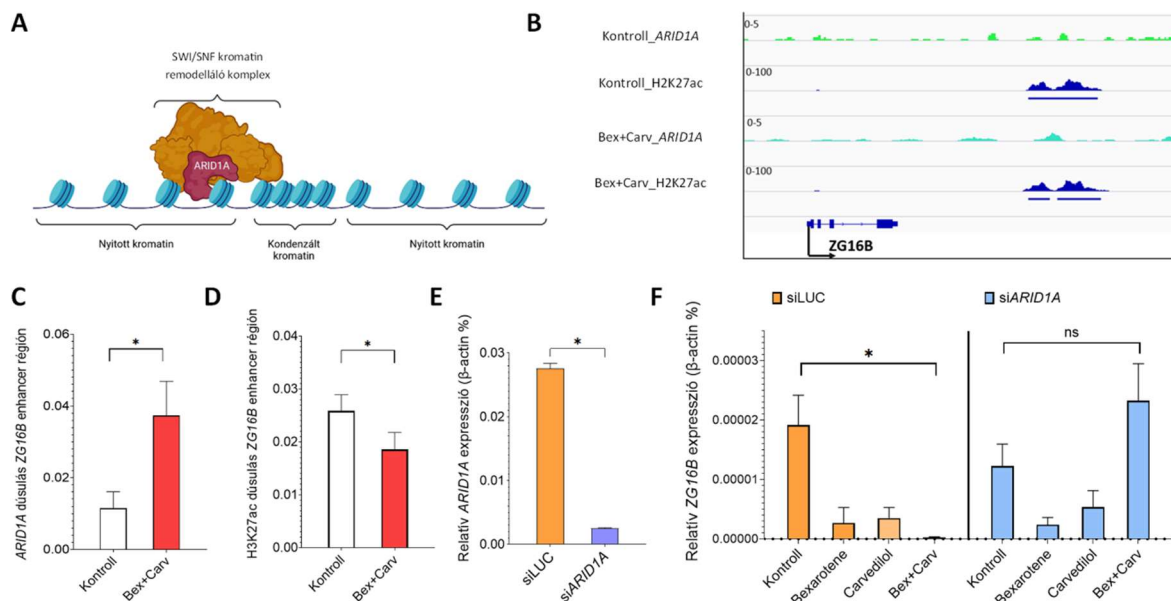
Ezt követően *ARID1A* specifikus siRNS-sel transzfektált HME-hTert sejtekben mértük a *ZG16B* és *ARID1A* mRNS szintű kifejeződését. Az adatok igazolták a transzfekció hatékonyságát, hiszen az *ARID1A* mRNS szintje szignifikánsan lecsökkent a si*ARID1A*-val kezelt sejtekben a kontroll (siLUC) transzfektált mintákhoz képest (20E ábra). A sejtek siLUC vagy si*ARID1A* transzfekciót követően ugyanakkor bexarotene-nel, carvedilollal, illetve a kettő kombinációjával is kezelve voltak. A siLUC kontroll transzfekció esetén a bexarotene és a carvedilol önmagában is csökkentette a *ZG16B* expresszióját, a kombináció esetén pedig szignifikáns szuppressziót mértünk, ezzel megismételve a korábbi megfigyeléseket (19A ábra). Ezzel szemben bár az si*ARID1A*-val kezelt sejtekben a bexarotene és a carvedilol önmagukban csökkentették a *ZG16B* szintet, a kombinációjuk már nem mutatott szignifikáns szuppresszív hatást. Ez arra utal, hogy az *ARID1A* jelentős szerepet tölt be a kombinált kezelés általi *ZG16B* szuppresszióban.

19. Ábra



19. Ábra: A ZG16B azonosítása, mint rexinoid alapú, szinergikus kombinációk közös célgénje. A, ZG16B mRNA expresszió mérése HME-hTert sejtekben bexarotene és paroxetine (bal oldali panel) vagy bexarotene és carvedilol (jobb oldali panel) kezelések mellett. (* $p < 0.05$ ANOVA, Dunnett's multiple comparison test with a single pooled variance) B, ZG16B expresszió csökkenésének igazolása bexarotene és carvedilol hatására immunfestés segítségével. (* $p < 0.05$ ANOVA, Dunnett's multiple comparison test with a single pooled variance) C, TCGA adatok alapján emlőtumorok fokozott ZG16B expressziót mutatnak a normál emlőszövethez képest. (* $p < 0.05$ T-test) D, TCGA adatok alapján az emlőtumor a második legmagasabb ZG16B expresszióval rendelkező daganattípus.

20. Ábra



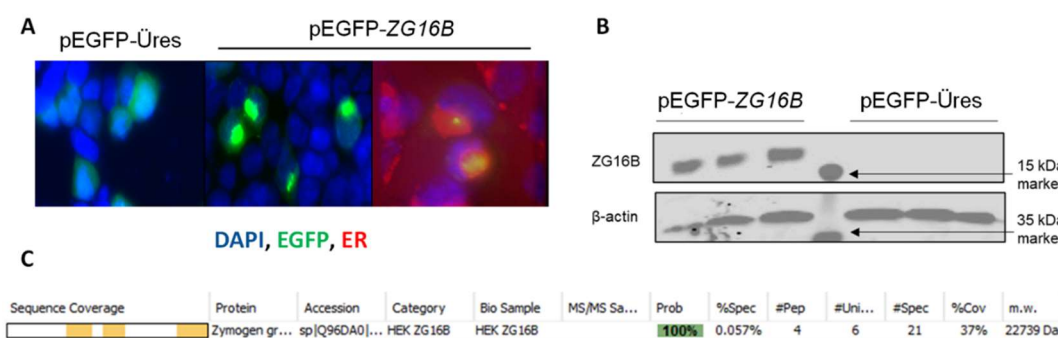
20. Ábra: A ZG16B expresszió szinergikus szuppressziója bexarotene+carvedilol kezelés hatására ARID1A-függő mechanizmuson keresztül valósul meg HME-hTert sejtekben. A, A SWI/SNF komplex és ARID1A kromatin kondenzáció szabályozásában betöltött szerepének sematikus reprezentációja. B, IGV genome browser vizsgálat alapján a ZG16B gén melletti enhancer régió ARID1A dúsulás és H3K27ac szint csökkenés látható. C, ARID1A dúsulás mérése ZG16B enhancer régió ChIP-qPCR módszerrel. (* $p < 0.05$ T-test) D, H3K27ac szint csökkenés mérhető ChIP-qPCR módszerrel a ZG16B enhancer régió. (* $p < 0.05$ T-test) E, Az ARID1A szintje siRNA alkalmazásával csökkenthető HME-hTert sejtekben. (* $p < 0.05$ T-test) F, siRNA-el előkezelt HME-hTert sejtekben a bexarotene és carvedilol kezelés csak ARID1A jelenléte mellett képes ZG16B mRNA expresszió csökkenést kiváltani. (* $p < 0.05$ ANOVA, Dunnett's multiple comparison test with a single pooled variance)

Összességében ezek az eredmények világosan rámutattak arra, hogy a ZG16B expresszió szuppressziója bexarotene + carvedilol kezelés hatására ARID1A-függő mechanizmuson keresztül valósul meg. A kromatin-remodelláló SWI/SNF komplex ARID1A alegysége a ZG16B-hez kapcsolódó enhancer régióhoz toborzódik, miközben csökkenti a H3K27ac dúsulását, ami a genomi régió kondenzáltságát fokozza, tehát gátolja az itt található gének expresszióját. Ez a kombináció-specifikus szabályozás magyarázhatja, hogy miért tűnik el a ZG16B-t szuppresszálo hatás ARID1A hiányában. Ezen eredményeink továbbá rámutattak, hogy lehetséges a ZG16B kifejeződését farmakológiai úton befolyásolni, mely egy jól körülhatárolt epigenetikai mechanizmus alapján történik.

4.10 A *ZG16B* fokozza a proliferációt normál emlősejtekben és hormon-receptor pozitív emlőtumor sejtekben

Miután felderítettük a szinergikus kombinációk általi *ZG16B* szuppresszió mechanizmusát, következő lépésként azt vizsgáltuk, hogy ez a fehérje milyen biológiai hatást gyakorol normál emlősejtekre, valamint emlőtumor sejtvonalakra. Mivel a *ZG16B* a korábbi kísérletekben a bexarotene-alapú szinergikusan antiproliferatív kombinációk egyik közös, szuppressziót mutató célgénjeként lett azonosítva, ezért feltételeztük, hogy az antiproliferatív hatások ennek a fehérjének a modulációján is keresztül megvalósulhatnak. Ennek igazolására *ZG16B*-t tartalmazó, transzfektált HEK293 sejtek által kondicionált felülszót használtunk kezelésként különböző sejtvonalakon proliferációs assay-k során (22. ábra).

21. Ábra



21. Ábra: *ZG16B* expressziós rendszer validálása. *A*, Reprezentatív képek üres pEGFP-C3 és pEGFP-ZG16B plazmidokkal transzfektált HEK293 sejtekről. A *ZG16B*-t tartalmazó vektor esetén az EGFP által adott jel az endoplazmatikus retikulumban (ER) kompartmentalizálódik. *B*, Transzfektált HEK293 sejtek felülszójának és lizátumainak Western blot vizsgálata. A felülszóból *ZG16B*-t a lizátumokból β-actint mértünk. *C*, pEGFP-ZG16B plazmiddal transzfektált HEK293 sejtek lizátumainak tandem tömegspektrometriás analízise. A teljes *ZG16B* szekvencia 37%-a volt lefedve az azonosított *ZG16B* specifikus peptid fragmensek által.

Az expressziós rendszerünk karakterizálása során a transzfektált HEK 293 sejteket fluoreszcens mikroszkópiával vizsgáltuk, mely során jól látható volt, hogy a pEGFP-ZG16B vektorral történő transzfekció esetén az EGFP által kibocsátott fluoreszcens jel az endoplazmatikus retikulumban akkumulálódott, szemben a diffúz lokalizációt mutató pEGFP-C3-Empty által szolgáltatott fluoreszcens jellel (21A ábra). Az expressziós rendszer további tesztelése céljából a sejtek által 48 órán át kondicionált felülszóból Western blot segítségével mutattuk ki a

ZG16B fehérje jelenlétét (21B ábra), továbbá a Debreceni Egyetem Proteomikai Szolgáltató Laboratóriuma segítségével tandem tömegspektrometriás analízisnek vetettük alá a transzfektált sejtek lizátumait. Az analízis során a lizátumokból 4 fehérje-specifikus, *ZG16B*-hez köthető peptidet sikerült azonosítani, ugyanakkor a kontroll plazmiddal transzfektált sejtekben nem tudtunk *ZG16B*-t kimutatni (21C ábra).

Elsőként normál humán emlő epithel sejteken (HME-hTert) vizsgáltuk a *ZG16B* proliferációra kifejtett hatását. Az eredmények (22A ábra) azt mutatták, hogy a *ZG16B* jelenléte szignifikánsan fokozta a sejtszámot a kontrollhoz képest 72 órás kezelés alatt. Amikor azonban a *ZG16B*-t neutralizáló ellenanyag is hozzáadásra került, ez a sejtosztódást serkentő hatás eltűnt, ami közvetlen bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy a megfigyelt változás valóban a *ZG16B* fehérjének tulajdonítható.

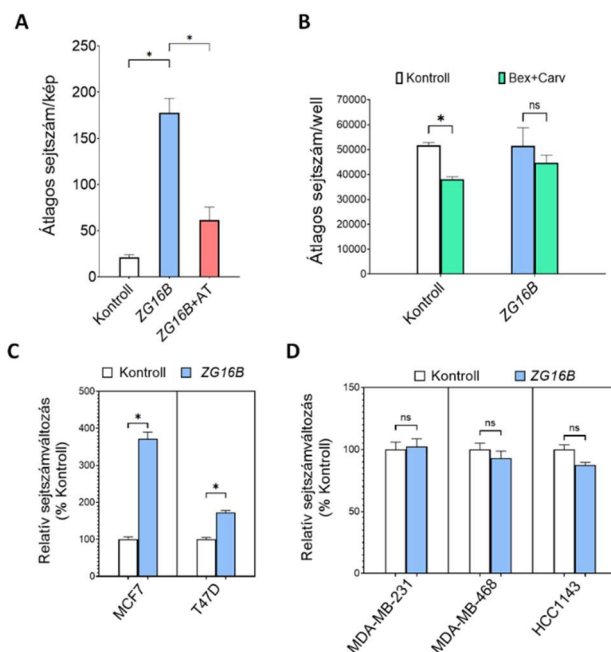
Ezután a *ZG16B* és a szinergikus bexarotene + carvedilol kombináció közötti kapcsolatot vizsgáltuk. HME-hTert sejteket először kontrollal vagy bexarotene + carvedilol kezeléssel kezeltünk, majd következő kezelésként *ZG16B*-t adtunk hozzá kondicionált felülűszo formájában. A bexarotene + carvedilol kezelés a korábbi megfigyeléseknek megfelelően antiproliferatív hatást eredményezett (22B ábra), azonban a *ZG16B* utólagos hozzáadása ezt a hatást kompenzálni tudta. Fontos megjegyezni, hogy ebben a kísérletben a *ZG16B* csak másodlagos kezelésként volt jelen, és rövidebb, 48 órás időtartamban hatott a sejtekre a korábbi kísérlethez képest. Ez magyarázhatja, hogy a *ZG16B* a kontrollhoz képest önmagában nem váltott ki szignifikáns sejtszámemelkedést.

A normál sejtek után megvizsgáltuk a *ZG16B* ösztrogén receptor-pozitív emlőtumor sejtvonalak proliferációjára (MCF7 és T47D) kifejtett hatását is. Az eredmények (22C ábra) alapján a *ZG16B* mindkét sejtvonalban szignifikánsan fokozta a proliferációt. Ezzel szemben azok a vizsgált emlőtumor sejtvonalak melyek sem ösztrogén-, sem progeszteron-, sem HER2-receptort nem expresszálnak nem reagáltak fokozott proliferációval *ZG16B* jelenlétére (22D ábra).

Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy a *ZG16B* egy olyan extracelluláris faktor, amely normál emlősejtekben és ösztrogénreceptor-pozitív emlőtumor sejtvonalakban képes fokozni a proliferációt, míg hormonreceptor-negatív daganatokban nem hat a sejtosztódásra. Emellett az is bizonyítást nyert, hogy a szinergikus bexarotene + carvedilol

kezelés antiproliferatív hatása közvetlenül összefügg a *ZG16B* szintjének csökkenésével, mivel ennek a hatásnak a neutralizálása a *ZG16B* visszapótlásával megvalósítható volt.

22. Ábra

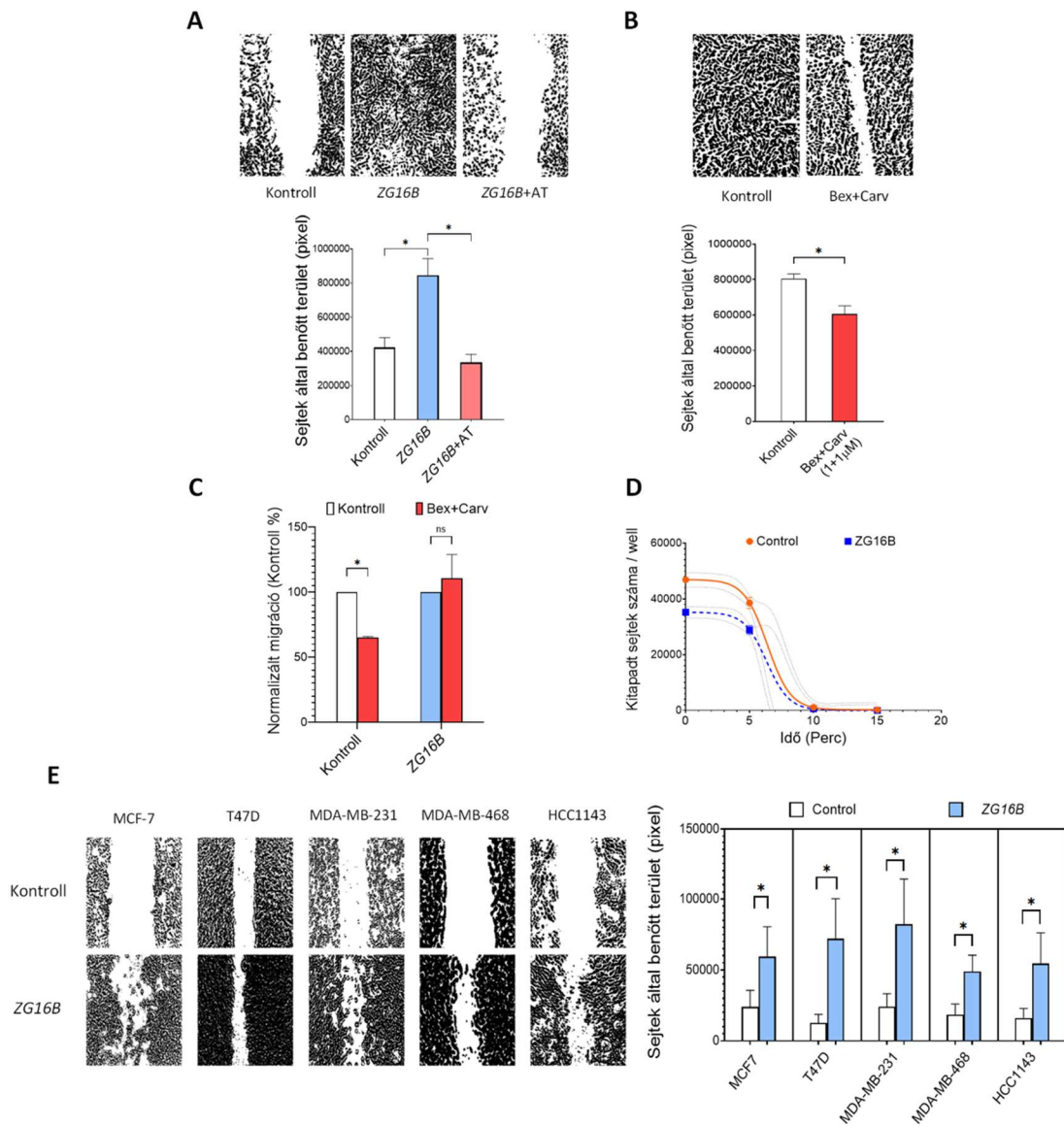


22. Ábra: A *ZG16B* fokozza a proliferációt normál emlősejtekben és hormonreceptor-pozitív emlőtumor sejtvonalakban. A, *ZG16B* HME-hTert sejtekre kifejtett proliferatív hatásának vizsgálata. Neutralizáló antitest (AT) hozzáadásával a proliferatív hatás visszaszorítható volt. (* $p < 0.05$ ANOVA, Tukey's multiple comparison test) B, HME-hTert sejtek kontroll vagy bexarotene és carvedilol kombinációjával voltak előkezelve, majd *ZG16B* kezelést kaptak, mely után a proliferációbeli különbségeket kvantitáltuk (* $p < 0.05$ T-test). C, A *ZG16B* ösztrogén receptor-pozitív MCF7 és T47D sejtekre kifejtett proliferatív hatásának igazolása. (* $p < 0.05$ T-test) D, Hormon-receptor negatív sejtvonalak (MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC1143) *ZG16B*-re adott proliferációs válaszána vizsgálata. (* $p < 0.05$ T-test)

4.11 A *ZG16B* fokozza a normál epithel sejtek és az emlőtumor sejtek motilitását

A sejtek migrációs képessége és az adhézió erőssége kulcsfontosságú tényezők mind a normál sejtek működésében, a transzformáció folyamatában és a daganatos progresszióban, ezért kiemelten fontos volt meghatározni, hogy a *ZG16B* modulációja milyen hatásokat idéz elő ezekben a folyamatokban.

23. Ábra



23. Ábra: A ZG16B fokozza az epithel sejtek és az emlőtumor sejtek motilitását. A, ZG16B HME-hTert migrációra kifejtett hatásainak vizsgálata 'wound-healing assay' segítségével. Neutralizáló antitest (AT) hozzáadásával a migrációt fokozó hatás visszaszorítható volt. (* $p < 0.05$ ANOVA, Tukey's multiple comparison test) B, Bexcatotene és carvedilol kombináció hatásának vizsgálata HME-hTert sejtek migrációjára. (* $p < 0.05$ T-test) C, HME-hTert sejtek kontroll vagy bexarotene és carvedilol kombinációjával voltak előkezelve, majd ZG16B kezelést kaptak, mely után a migrációbeli különbségeket kvantitáltuk. (* $p < 0.05$ T-test) D, Tripszines kezelés alapú adhézions assay eredményei. A grafikonon a tenyésztőedény aljára még kitapadt sejtek számát ábrázoltuk a tripszines inkubáció alatt eltelt idő függvényében. E, Emlőtumor sejtek (MCF7, T47D, MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC1143) ZG16B-re adott migrációs válaszainak vizsgálata 'wound-healing assay' segítségével. (* $p < 0.05$ T-test)

A sejtek migrációs képességét 'wound healing assay' segítségével mértük elsőként HME-hTert sejteken, melyeket *ZG16B*-t tartalmazó kondicionált felülszóval kezeltünk. *ZG16B* hatására szignifikánsan gyorsabb migrációt mutattak a HME-hTert sejtek, mint a kontroll felülszóval kezelték (23A ábra). Amikor a *ZG16B*-t semlegesítő ellenanyag is jelen volt, a *ZG16B* által fokozott migráció kompenzálódott, ezzel bizonyítva, hogy a megfigyelt hatás valóban a felülszóban jelen lévő *ZG16B*-nek tulajdonítható.

A *ZG16B* mellett párhuzamosan a bexarotene + carvedilol kombinált kezelés hatását is megvizsgáltuk (23B ábra) a migrációra nézve emlő epithel sejtekben. Az eredmények azt mutatták, hogy a kontrollhoz képest a kombináció szignifikánsan gátolta a sejtek vándorlását.

A proliferációs mérésekhez hasonlóan azt is megvizsgáltuk, hogy a bexarotene + carvedilol által gátolt migráció helyreállítható-e külsőleg pótolta *ZG16B*-vel. A méréseink (23C ábra) alapján a bexarotene + carvedilol kombinációjával előkezelt HME-hTert sejtek gátolt migrációt mutattak, azonban a *ZG16B* hozzáadása képes volt visszaállítani a migrációs képességet, tehát a sejtek újra képesek lettek jelentős mértékben visszavándorolni a karcolás területére.

A migráción kívül megvizsgáltuk még a sejtek adhézión tulajdonságait tripszin enzim-alapú adhézión assay segítségével. A kontrollal kezelt sejtek stabilan tapadtak a tenyésztő felülethez, és fokozatosan váltak fel a tripszinnel való inkubáció során (23D ábra). Ezzel szemben a *ZG16B*-t tartalmazó kondicionált felülszóval kezelt sejtek jóval gyengébb adhéziót mutattak, már rövid idő után nagy arányban váltak fel a tenyésztőedény aljáról. Ez arra utal, hogy a *ZG16B* a sejtek adhézión képességét negatívan befolyásolja, ami összhangban van a migrációt serkentő hatásával.

Végül ösztrogén receptor-pozitív (MCF7, T47D) és tripla negatív (MDA-MB-231, MDA-MB-468, HCC1143) emlőtumor sejtekben vizsgáltuk a *ZG16B* hatását a migrációra. A wound healing assay minden vizsgált sejtvonalban szignifikáns fokozódást mutatott a sejtek migrációjában *ZG16B* kezelés hatására (23E ábra), függetlenül attól, hogy a sejtek milyen hormonreceptor státusszal rendelkeztek. Ez arra utal, hogy míg a proliferációs hatások esetében a hormon receptor-státusz meghatározó tényező volt, a migráció fokozásában a *ZG16B* általánosan érvényesülő hatást fejt ki.

Összességében ezek az eredmények megerősítik, hogy a *ZG16B* nem csak proliferációt fokozó tényezőként működik, hanem a sejtek migrációs és adhézión tulajdonságait is jelentősen

befolyásolja. Normál sejtekben a *ZG16B* képes kompenzálni a bexarotene és carvedilol kombináció migrációt gátló hatását, míg tumorsejtekben hormon receptor-státusztól függetlenül serkenti a migrációt.

4.12 A *ZG16B* migrációt stimuláló hatását a *PI3K*-Akt jelátviteli útvonal közvetíti

A proliferációs és migrációs vizsgálatok eredményei alapján a következő kérdésünk az volt, hogy mely jelátviteli útvonalak aktiválódása közvetíti ezeket a hatásokat. Ennek feltárására a korábban is vizsgált három kulcsfontosságú mitogén jelátviteli elem, a Src, az Erk 1/2 és az Akt fehérje phosphorylációját követtük nyomon.

A kísérletekbe három sejtvonalat vontunk be, a normál HME-hTert sejteket, valamint két emlőtumor sejtvonalat, az ösztrogénreceptor-pozitív T47D és a tripla negatív MDA-MB-231 sejtvonalakat. A sejteket *ZG16B*-t tartalmazó kondicionált felülszóval kezeltük, majd a fehérjék phosphorylációját 0, 10 és 60 perc után vizsgáltuk Western blot segítségével.

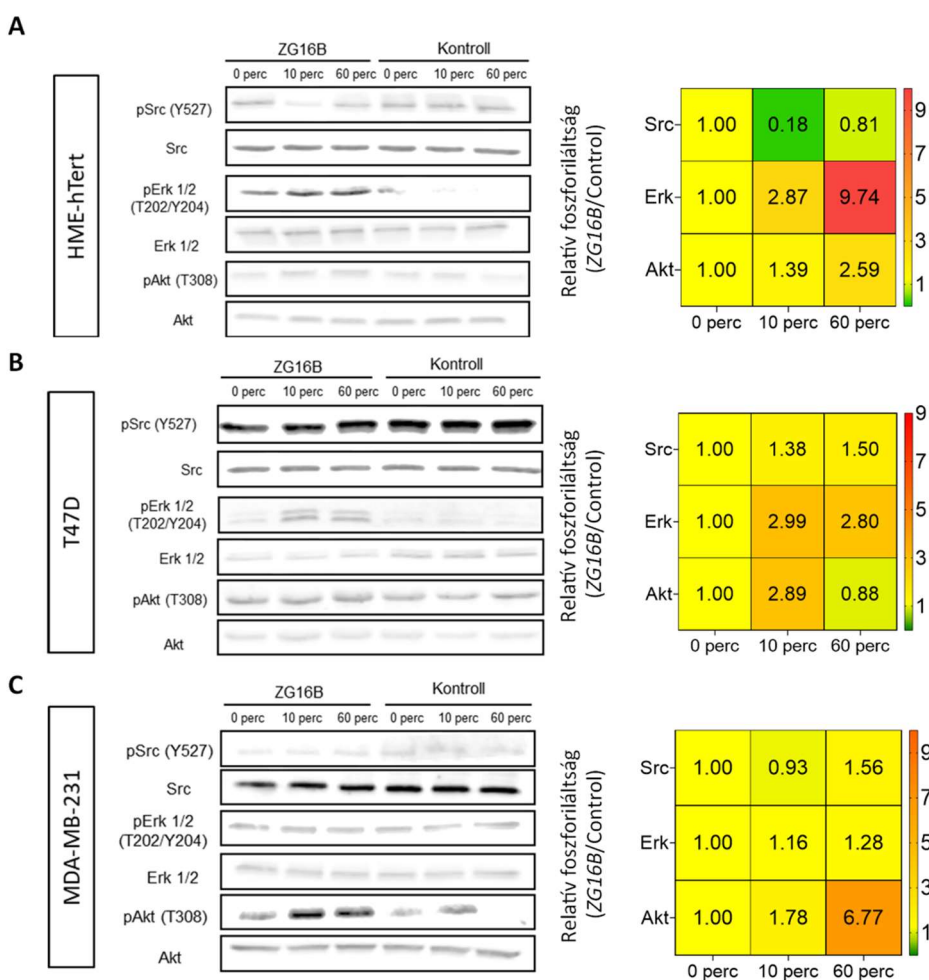
Normál HME-hTert sejtekben (24A ábra) a *ZG16B* hatására mindhárom vizsgált fehérje aktivitásában detektálható változás történt. A Src fehérje phosphorylációja 10 perccel a kezelés után csökkent, ami aktivációra utal, majd 60 perc után visszaállt a kontroll szintre. Az Erk 1/2 esetében a kontrollban nem volt phosphoryláció detektálható, azonban *ZG16B* hatására gyors phosphoryláció következett be. 60 perc elteltével az Akt is fokozott phosphorylációt mutatott. A T47D sejtekben (24B ábra) az Erk 1/2 és az Akt phosphorylációja emelkedett meg szignifikánsan *ZG16B* kezelés után, mind 10, mind 60 perces időpontban. A Src phosphoryláltsága azonban változatlan maradt. Az MDA-MB-231 sejtekben (24C ábra) a *ZG16B* hatására kizárólag az Akt fehérje phosphorylálódott 10 és 60 perc elteltével. Sem az Erk 1/2, sem a Src esetében nem volt változás tapasztalható.

Ezen eredmények arra mutatnak rá, hogy a *ZG16B* hatása a vizsgált mitogén jelátviteli útvonalakra függ a sejtvonal transzformáltságától és a hormon receptor-státusztól. Ugyanakkor az egységesen minden sejtvonalban aktivált Akt kiemeli ennek a fehérjének a központi szerepét a *ZG16B* által kiváltott jelátviteli válaszbán. Ezért következő lépésként az Akt funkcionális szerepét a *ZG16B* jelátvitelében részletesebben is vizsgáltuk. Arra voltunk kíváncsiak, hogy a *ZG16B* által indukált proliferációs és migrációs hatások valóban az Akt-útvonal aktiválódásán keresztül valósulnak-e meg. Ennek vizsgálatához a *PI3K* gátlásán alapuló LY294002 inhibitort

alkalmaztuk, mely lehetővé teszi annak igazolását, hogy az Akt phosphoryláció valóban közvetlen mediátora a *ZG16B* által kiváltott válaszoknak.

HME-hTert sejtekben végzett migrációs vizsgálatok (25A ábra) azt mutatták, hogy a *ZG16B* a kontrollhoz képest szignifikánsan serkentette a sejtek vándorlását. Ez a hatás azonban teljesen eltűnt akkor, ha a sejtek a *ZG16B* kezelés mellett *PI3K* inhibitor is kaptak, jelezve, hogy a *ZG16B* migrációt stimuláló funkciója a *PI3K*–Akt útvonal működéséhez kötött.

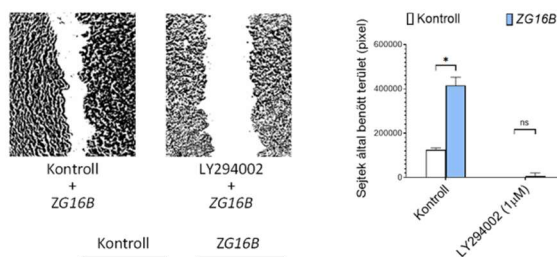
24. Ábra



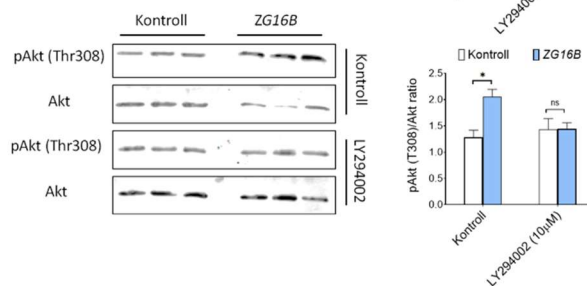
24. Ábra: A mitogen jelátviteli útvonalak *ZG16B* általi aktivációja függ a sejt transzformáltságától és hormon receptor státuszától. Src (Y527) inaktíváló hatású, Erk 1/2 (T202/Y204) aktiváló hatású és Akt (T308) aktiváló hatású phosphorylációjának vizsgálata Western blot segítségével (A) HME-hTert, (B) T47D és (C) MDA-MB-231 sejteken. Az ábrák bal oldalán reprezentatív blot-ok a jobb oldalán pedig a denzitometria eredményei láthatóak.

25. Ábra

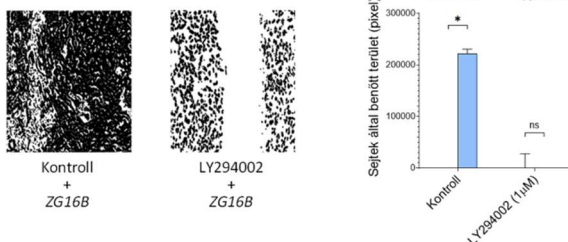
A



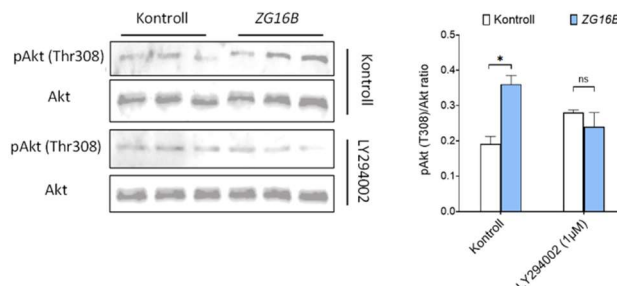
B



C



D



25. Ábra: A ZG16B migrációt stimuláló hatását a PI3K–Akt útvonal közvetíti. HME-hTert (A-B) és MDA-MB-231 (C-D) sejteken DMSO-EtOH kontroll vagy PI3K inhibitorral való előkezelést követően ZG16B útókezelést hajtottunk végre, mely után megvizsgáltuk az Akt fehérje phosphorylációját (T308) (B, D) és a sejtekre kifejtett migrációs hatást (A, C). (* $p < 0.05$ T-test)

A jelátviteli szintű változásokat Western blot analízissel követtük (25B ábra), amelyben a ZG16B hatására az Akt fehérje erőteljes phosphorylációját figyeltük meg 10 perces kezelést követően. Ez a phosphoryláció a kontrollhoz képest szignifikáns volt, azonban teljesen megszűnt, ha a sejtek LY294002-vel előkezelt állapotban kapták a ZG16B-t.

A kísérleteket kiterjesztettük az MDA-MB-231 sejtvonalra is, amelynél az Akt jelentette az egyetlen *ZG16B*-érzékeny jelátviteli elemet a korábbi vizsgálatainkban. A migrációs assay itt is azt mutatta, hogy a *ZG16B* stimulálta a sejtek vándorlását, azonban a *PI3K* inhibitor jelenléte mellett ez a hatás teljesen eltűnt (25C ábra). A jelátviteli analízis (25D ábra) megerősítette ebben a sejtvonalban is, hogy a *ZG16B* kezelés hatására a sejtekben az Akt phosphorylációja szignifikánsan emelkedik, ugyanakkor ez a phosphoryláció nem volt megfigyelhető *PI3K* gátlás mellett.

Ezek az eredmények egyértelműen bizonyítják, hogy a *ZG16B* által közvetített sejtválaszok, különösen a migráció fokozása, a *PI3K*–Akt jelátviteli útvonal aktiválódásán keresztül valósulnak meg. Mivel az Akt minden vizsgált sejtvonalban közös válaszelemként jelent meg, a *ZG16B* biológiai hatásainak egyik központi mediátoraként értelmezhető, továbbá azt jelzi, hogy a *ZG16B* migrációra kifejtett hatásai hormon receptor státusztól függetlenek.

4.13 Az ECM átstrukturálásához és sejtmotilitáshoz kapcsolódó útvonalak inverz módon szabályozottak *ZG16B* és a bexarotene + carvedilol kombinációja által

A *ZG16B* funkcionális hatásait bemutató proliferációs és migrációs kísérleteket követően transzkriptomikai elemzést végeztünk annak érdekében, hogy szélesebb körben feltárjuk, milyen gének és biológiai útvonalak állhatnak a tapasztalt biológiai válaszok hátterében. Az analízis során két fő célkitűzésünk volt: egyrészt azonosítani a *ZG16B* által szabályozott jelátviteli és strukturális folyamatokat, másrészt összevetni ezeket a bexarotene és carvedilol kezeléssel indukált változásokkal. Az így kapott profilok lehetőséget adnak arra, hogy meghatározzuk, a bexarotene és carvedilol által kiváltott transzkripciós programban mely folyamatok írhatók le közvetlenül a *ZG16B* szuppressziójának következményeként.

ZG16B-vel kezelt HME-hTert sejtek RNS-szekvenálás adatait tehát génontológiai elemzésnek vetettük alá (26A ábra). Az eredmények egyértelműen rámutattak arra, hogy a *ZG16B* elsődleges célpontjai az extracelluláris mátrixhoz (ECM) kapcsolódó útvonalak, így különösen az ECM-receptor interakció, a fokális adhézió és az aktin-citoszkeleton szabályozása, amelyek jól illeszkednek a korábbi adhéziós és migrációs kísérletekben látott funkcionális hatásokhoz.

A transzkriptomikai elemzés során a *ZG16B* által szabályozott gének közül kiemelt jelentőségűnek bizonyultak azok, amelyek az extracelluláris mátrix (ECM) szerveződésében és

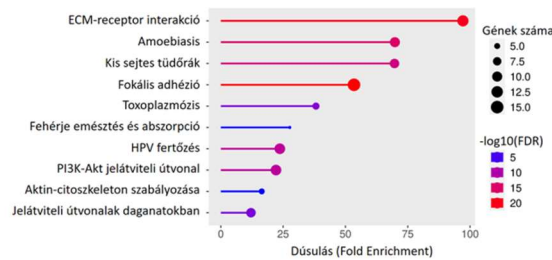
átstrukturálásában játszanak szerepet. Az 7. táblázat összefoglalja azokat a géneket, amelyek HME-hTert sejtekben kizárólag a *ZG16B* stimuláció hatására mutattak fokozott indukciót, és amelyek az ECM átszerveződésének kulcskomponenseihez kapcsolódnak. Ezeknek a géneknek az aktivitása szorosan összefügg a sejtadhézió, sejtmigráció és szöveti struktúrák dinamikus változásainak szabályozásával, amelyeket funkcionális kísérleteinkben (23. ábra) már közvetlenül is igazoltunk. Emellett olyan jelátviteli útvonalak dúsulása is látható volt, mint a *PI3K*–Akt jelátvitel, amelynek szerepét a 25. ábrában kísérletesen is igazoltuk. Ezeken túl további, a sejtmotilitással és tumorbiológiával összefüggő útvonalak (például: amoebiasis, kis sejtés tüdőrák) is előkerültek.

Gén szimbólum	Változás mértéke (Fold Change)	p-érték	Gén név	Funkció az ECM-ben
<i>FNI</i>	1.368	3.90E-31	Fibronectin 1	Köti az integríneket az extracelluláris mátrixhoz
<i>PLEC</i>	1.298	7.90E-39	Plectin	Citoszkeletális elemeket kapcsol össze
<i>COL5A1</i>	1.297	6.31E-14	Kollagén V α 1 lánc	Heterotípusos kollagénrostok szervezését szabályozza
<i>LAMA5</i>	1.279	1.51E-18	Laminin α 5 alegység	Bazális membrán glikoproteinje
<i>LAMA3</i>	1.264	6.64E-15	Laminin α 3 alegység	Bazális membrán glikoproteinje
<i>COL12A1</i>	1.256	5.28E-10	Kollagén XII α 1 lánc	Fibrillumhoz társult; ECM kölcsönhatás módosítása
<i>HSPG2</i>	1.254	2.77E-06	Heparán-szulfát proteoglikán 2	Lamininnal, prolargin-nal és IV-es típusú kollagénnel lép kölcsönhatásba
<i>DYNC1H1</i>	1.252	5.50E-14	Citoplazmatikus dynein 1 nehézlánc 1	Intracelluláris motilitás, mikrotubulus-aktivált ATP-áz
<i>COL4A2</i>	1.25	3.43E-14	Kollagén IV α 2 lánc	Bazális membrán szerkezeti eleme
<i>FBN1</i>	1.247	7.09E-08	Fibrillin 1	Kalcium-kötő ECM glikoprotein
<i>TNC</i>	1.239	9.97E-07	Tenascin C	Integrin ligandum az ECM-ben
<i>ITGB4</i>	1.238	5.77E-26	Integrin β 4 alegység	α 6 integrin partnere laminin receptorban
<i>FBN2</i>	1.233	1.12E-08	Fibrillin 2	Kalcium-kötő ECM glikoprotein
<i>PLXNA2</i>	1.215	2.99E-08	Plexin A2	Citoszkeletális átrendeződés
<i>FLNB</i>	1.21	6.82E-13	Filamin B	Aktin filamentumokat keresztköt
<i>VCAN</i>	1.203	7.19E-04	Verzikan	ECM proteoglikán; sejtadhézió, növekedés, migráció
<i>COL4A1</i>	1.185	1.04E-05	Kollagén IV α 1 lánc	Bazális membrán szerkezeti eleme
<i>TLN1</i>	1.183	4.95E-10	Talin 1	Aktin filamentumok szervezése; migráció
<i>LAMC1</i>	1.181	3.46E-06	Laminin γ 1 alegység	Bazális membrán glikoproteinje
<i>LAMB3</i>	1.18	8.41E-09	Laminin β 3 alegység	Bazális membrán glikoproteinje
<i>LAMB2</i>	1.18	2.63E-05	Laminin β 2 alegység	Bazális membrán glikoproteinje
<i>VCL</i>	1.176	4.44E-08	Vinculin	F-aktin membránhoz való rögzítése
<i>MYLK</i>	1.172	1.23E-04	Miozin könnyűlánc kináz	Citoszkeletális kontraktilis aktivitás
<i>LAMC2</i>	1.17	8.34E-09	Laminin γ 2 alegység	Bazális membrán glikoproteinje
<i>MYH9</i>	1.16	2.85E-09	Miozin nehézlánc 9	Citokinézis, sejtalak és motilitás
<i>AFAP1</i>	1.159	1.13E-04	Aktin filamentum-asszociált fehérje 1	Adapter fehérje: Src – aktin kapcsolat
<i>FLNA</i>	1.152	2.38E-10	Filamin A	Aktint kapcsol membrán glikoproteinekhez
<i>COL7A1</i>	1.151	1.03E-02	Kollagén VII α 1 lánc	Epitélium stromához való horgonyzása
<i>ITGA5</i>	1.15	9.68E-06	Integrin α 5 alegység	RGD receptor
<i>ITGA2</i>	1.144	1.40E-03	Integrin α 2 alegység	Kollagén receptor
<i>LOXL2</i>	1.143	1.38E-04	Lizin-oxidáz-szerű 2	Kollagén és elasztin keresztkötés
<i>ITGA3</i>	1.141	2.26E-11	Integrin α 3 alegység	Laminin receptor
<i>COL4A6</i>	1.139	2.05E-03	Kollagén IV α 6 lánc	Bazális membrán szerkezeti eleme
<i>ITGAV</i>	1.137	1.68E-03	Integrin α V alegység	RGD receptor
<i>LAMB1</i>	1.133	3.54E-04	Laminin β 1 alegység	Bazális membrán glikoproteinje
<i>MACF1</i>	1.132	1.42E-03	Mikrotubulus-aktin keresztkötő faktor 1	Mikrotubulust kapcsol sejtkapcsolatokhoz
<i>FERMT1</i>	1.118	2.58E-04	FERM domént tartalmazó kindlin 1	Integrin aktivitást szabályoz
<i>MMP15</i>	1.115	4.67E-02	Mátrix metalloproteinidáz 15	ECM bontása, remodellezés
<i>ITGA6</i>	1.113	6.03E-05	Integrin α 6 alegység	Laminin receptor
<i>ITGBL1</i>	1.112	2.10E-02	Integrin β -szerű 1	Integrinek α 1–11 dimerizációs partnere

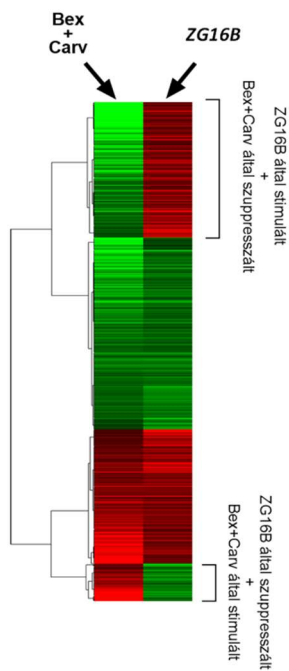
7. Táblázat: A ZG16B által indukált, extracelluláris mátrix átszerveződéséhez kapcsolódó gének összefoglalása.

26. Ábra

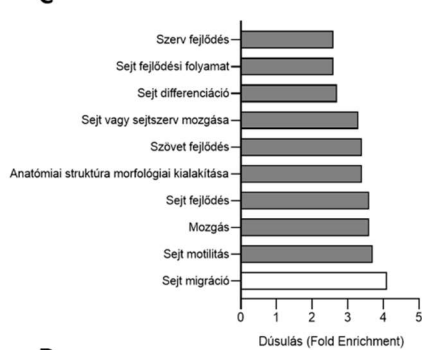
A



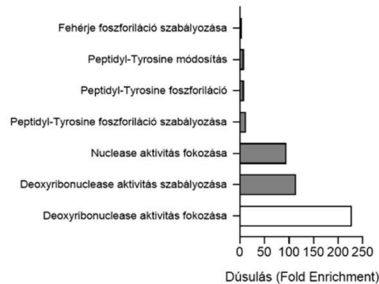
B



C



D



26. Ábra: Az ECM átstrukturálásához és sejtmotilitáshoz kapcsolódó útvonalak inverz módon szabályozottak ZG16B és Bex+Carv által. A, ZG16B hatására stimulált expressziót mutató gének gén-ontológiai analízise (ShinyGO). B, A bexarotene és carvedilol, valamint a ZG16B által szabályozott gének listáinak hierarchikus klaszterezése. C, ZG16B által stimulált és bexarotene és carvedilol által szuppresszált gének gén-ontológiai analízise (ShinyGO). D, ZG16B által szuppresszált és bexarotene és carvedilol által indukált gének gén-ontológiai analízise (ShinyGO).

A ZG16B által indukált transzkripciós profilokat ezt követően összevetettük a bexarotene és carvedilol kombinációjának hatására kialakuló transzkripciós változásokkal (26B ábra). A hierarchikus klaszterezés négy fő géncsoportot különített el: olyanokat, amelyeket ZG16B stimulál és bexarotene + carvedilol szuppresszált; olyanokat, amelyek mindkét kezelés hatására azonos irányban szabályozódnak; valamint kisebb arányban olyanokat, amelyeket a ZG16B szuppresszált és a bexarotene + carvedilol stimulál. Kiemelt jelentőségűek azok a gének,

amelyeket *ZG16B* aktivál, míg bexarotene + carvedilol gátol, hiszen ezek a *ZG16B* szuppressziójának funkcionális következményeire világíthatnak rá.

Ez utóbbi géncsoport GO-analízise (26C ábra) a sejtmigráció és sejtmozgás folyamatait állítja a középpontba. Az olyan kategóriák, mint a sejt fejlődése, differenciációja, mozgása és motilitása, mind jelentős dúsulást mutattak. A sejt migráció különösen kiemelkedett, mint olyan folyamat, amelyet kísérletesen (23C ábra) is igazoltunk, hogy ellentétesen szabályozódik *ZG16B* és a bexarotene + carvedilol kezelés hatására. Ez a párhuzam fontos kapcsolatot teremt a transzkriptomikai adatok és a funkcionális kísérletek között.

A bexarotene + carvedilol által indukált, valamint *ZG16B* által szuppresszált gének csoportja ezzel szemben más jelátviteli útvonalakra mutatott rá (26D ábra). Ezek elsősorban fehérje-phosphorylációval és peptidil-tirozin módosításokkal kapcsolatos útvonalakat érintettek, valamint kiemelkedő dúsulást mutattak a DNS lebontásához kapcsolódó folyamatok.

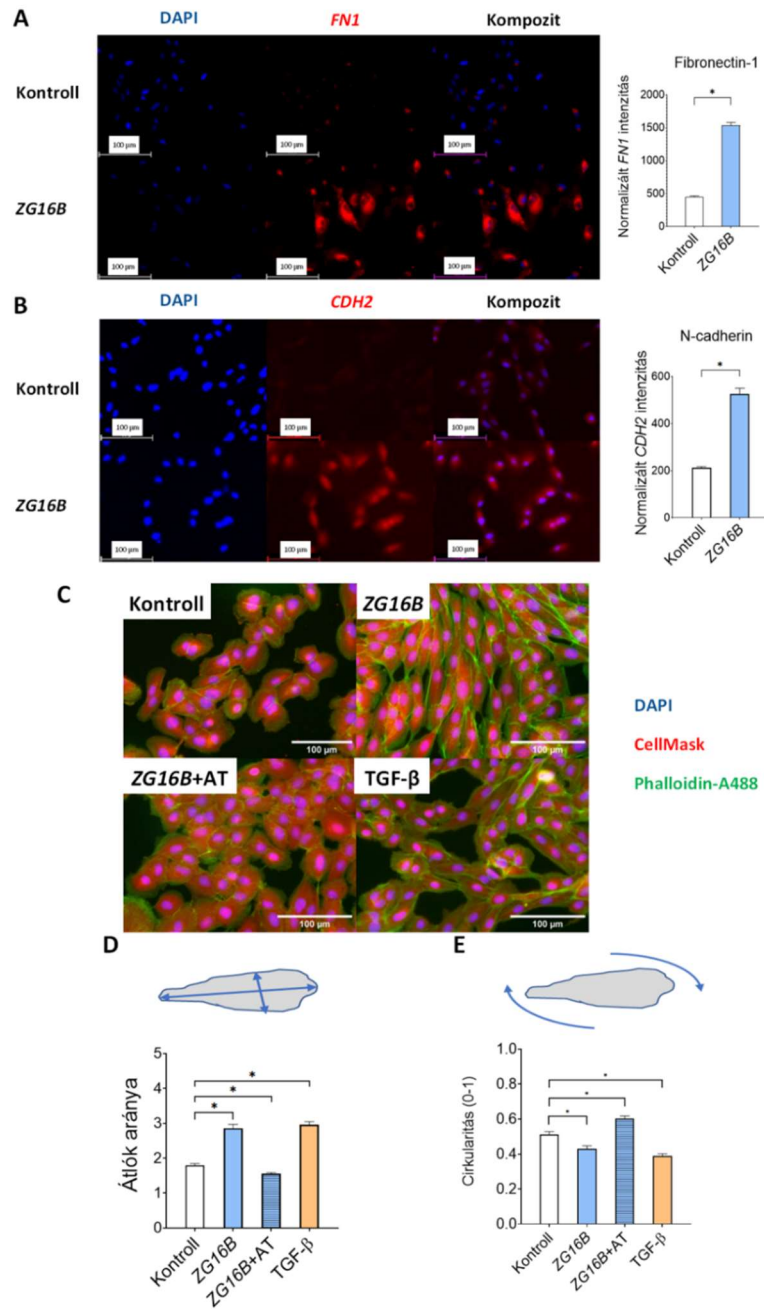
Összességében a bemutatott transzkriptomikai elemzés szorosan kapcsolódik a korábbi kísérleti eredményekhez, ugyanis egyfelől alátámasztja, hogy a *ZG16B* kulcsszereplője az ECM-remodellálásnak és a sejtmigráció szabályozásának, másfelől arra is rávilágít, hogy a bexarotene + carvedilol kombináció ezen funkciók célzott szuppressziójával fejtheti ki antiproliferatív és migrációt gátló hatásait.

4.14 A *ZG16B* normál emlő epithel sejtekben és emlőtumor sejtekben EMT-t indukál

A *ZG16B* funkcionális szerepének vizsgálatában feltárt fokozott migráció, csökkent adhézió és az extracelluláris mátrix átrendeződésére utaló transzkriptomikai adatok alapján logikus lépés volt annak felmérése, hogy a fehérje képes-e EMT indukálására. Az EMT az epithel sejtek polaritásának és sejtkapcsolatainak fokozatos elvesztésével, valamint a mesenchymális jellegű morfológia és génexpressziós profil kialakulásával jár^{174–176}. Ez a folyamat kulcsszerepet játszik a transzformáció folyamatában, továbbá a daganatok invazív és áttétképző képességének fokozásában.

HME-hTert normál emlősejtekben végzett vizsgálatok során kifejezetten arra voltunk kíváncsiak, hogy a *ZG16B* képes-e a mesenchymális markerek expresszióját fokozni, valamint képes-e változást indukálni a sejtek morfológiájában. A kísérletekben TGF- β -t használtunk pozitív kontrollként, amely jól ismert EMT-indukáló faktor.

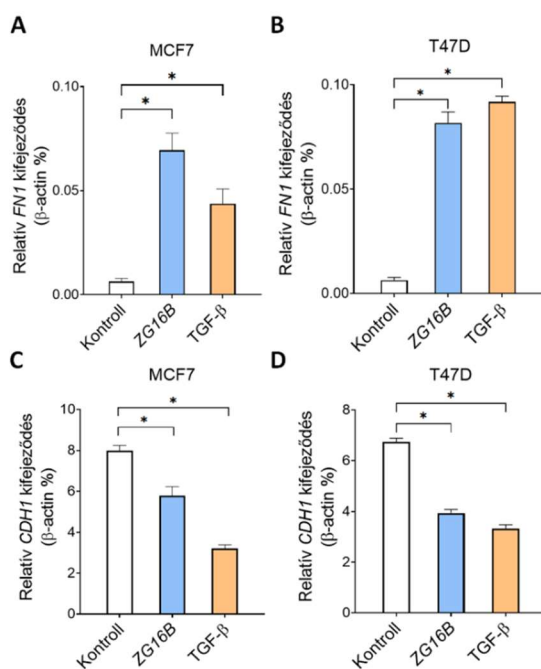
27. Ábra



27. Ábra: A ZG16B normál emlősejtekben EMT-t indukál. A, HME-hTert sejtek FN1 fehérje kifejeződésének vizsgálata immunfestés alapján. (* $p < 0.05$ ANOVA, T-test) B, HME-hTert sejtek CDH2 fehérje kifejeződésének vizsgálata immunfestés alapján. (* $p < 0.05$ T-test) C, HME-hTert sejtek morfológiai különbségeinek vizsgálata CellMask (piros) és Phalloidin-A488 (zöld) jelölések alapján. D-E, HME-hTert sejtek átló arányainak (D) és cirkularitásbeli (E) változásainak összehasonlítása ZG16B, ZG16B neutralizáló antitest (AT) és ZG16B valamint TGF- β kezelések esetén. (* $p < 0.05$ ANOVA, Dunnett's multiple comparison test with a single pooled variance)

Immunfestés alapján (27A-B ábra) megállapítottuk, hogy a *ZG16B* kezelés szignifikánsan fokozta két klasszikus mesenchymális marker, a *FN1* és az *CDH2* kifejeződését. Ezek a fehérjék a sejtek mátrixhoz való kapcsolódásában, valamint a sejt–sejt kapcsolatok kialakításában játszanak szerepet, és fokozott kifejeződésük mesenchymális állapot kialakulására utalhat. A sejtmorfológia vizsgálata (27C ábra) szintén alátámasztotta az EMT irányába történő tranzíciót. A kontroll felülszóval és *ZG16B* + neutralizáló antitesttel kezelt sejtek megőrizték kerekded, epitheliális formájukat, míg a *ZG16B*-vel, illetve TGF- β -val kezelt sejtek elongált morfológiát mutattak. Ez a morfológiai különbség kvantitatív sejtszintű elemzéssel is igazolódott, ugyanis a sejtek hosszanti és rövidebb átlójának aránya (27D ábra) szignifikánsan megnőtt *ZG16B* és TGF- β hatására, míg a cirkularitás mértéke (27E ábra) szignifikánsan csökkent, jelezve a sejtek nyújtottabb formáját.

28. Ábra



28. Ábra: A *ZG16B* emlőtumor sejtekben EMT markereket indukál. A-B, *FN1* mRNS expresszió, C-D, *CDH1* mRNS expresszió mérése MCF7 (A, C) és T47D (B, D) emlőtumor sejtekben RT-qPCR segítségével. (* $p < 0.05$ ANOVA, Dunnett's multiple comparison test with a single pooled variance)

Összességében ezek az adatok arra utalnak, hogy a *ZG16B* képes normál emlősejtekben EMT-szerű változásokat előidézni mind markerek expressziója, mind sejtmorfológia változásai alapján. Ez a megfigyelés összhangban van a fehérje migrációt és adhéziót befolyásoló

hatásaival, és újabb bizonyítékot szolgáltat arra, hogy a *ZG16B* a normál sejtek transzformációja szempontjából releváns fenotípus kialakulásában aktívan közreműködhet.

Következő lépésként a *ZG16B* EMT-t indukáló hatását emlőtumor sejtekben is megvizsgáltuk. A kapott eredmények egyértelműen alátámasztották a *ZG16B* EMT-t indukáló szerepét a vizsgált tumorsejtekben, ugyanis a *FNI* expressziója mind az MCF7 (28A ábra), mind a T47D sejtekben (28B ábra) szignifikánsan emelkedett *ZG16B* hatására, a TGF- β kezeléshez hasonlóan. Ezzel párhuzamosan a *CDH1* expressziója mindkét sejtvonalban (28C-D ábra) szignifikánsan csökkent. A két marker változása egymással összhangban az EMT klasszikus mintázatát rajzolta ki, tehát rámutatott a mesenchymális jegyek fokozott és az epitheliális jegyek szuppresszált kifejeződésére.

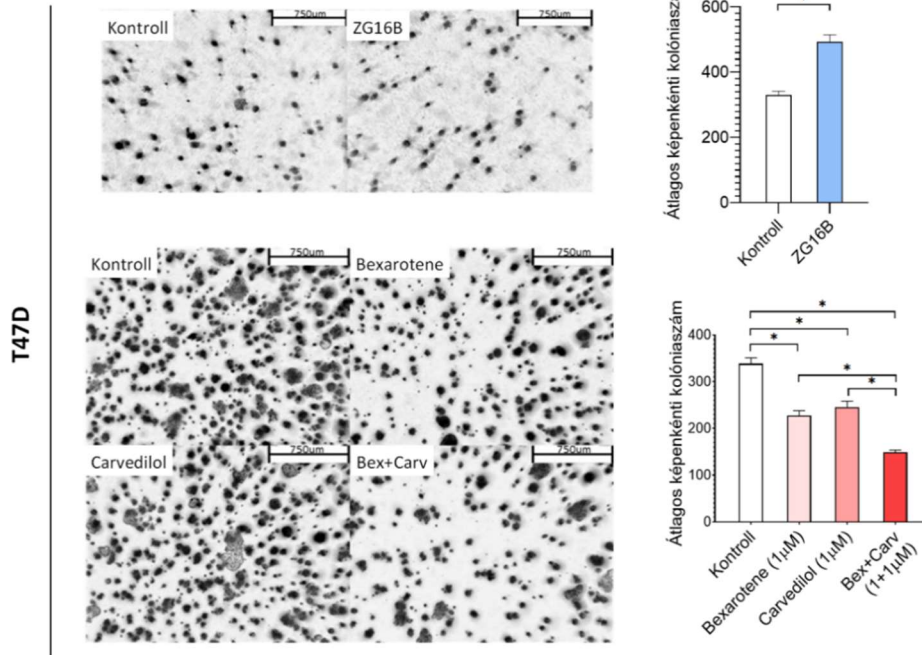
4.15 *ZG16B* és bexarotene + carvedilol kombinációja ellentétes módon szabályozzák az emlőtumorsejtek kolóniaképző képességét

Figyelembe véve a *ZG16B* eddig tapasztalt protumorigenikus hatásait az emlősejtek kontextusában, következőként azt vizsgáltuk meg, hogy a *ZG16B*, valamint a bexarotene és carvedilol önállóan vagy kombinációban milyen módon befolyásolják a tumorsejtek transzformáltságát. Ennek értékelésére soft agar kolóniaformáló assay-t alkalmaztunk, amely klasszikus módszer a sejtek transzformáltságának vizsgálatára. Ebben a modellben a sejtek csak akkor képesek kolóniát formálni, ha felszínhez való kötődés nélkül önállóan is rendelkeznek hosszan fennmaradó növekedési és túlélési potenciállal ('anchorage-independent growth'), tehát transzformáltak.

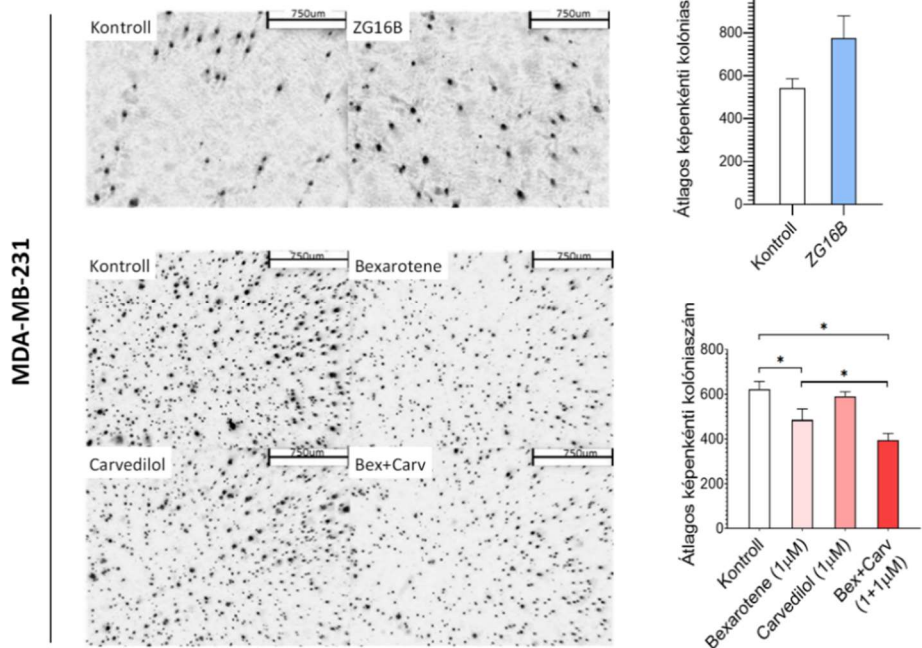
Az első kísérletünkben megállapítottuk, hogy a *ZG16B* jelenléte szignifikánsan növelte a formált kolóniák számát a kontrollhoz képest T47D sejtek esetén (29A ábra). Ezzel szemben a bexarotene és a carvedilol külön-külön is szignifikáns kolóniaszám-csökkenést okoztak. A kombinált kezelés esetén a bexarotene önálló alkalmazásánál is szignifikánsan alacsonyabb kolóniaszámot figyeltünk meg. További kísérleteink során a tripla negatív MDA-MB-231 sejteket vizsgáltuk (29B ábra). Ezen sejtek esetén a *ZG16B* szignifikánsan növelte a kolóniaszámot a kontrollhoz viszonyítva. A bexarotene szignifikánsan csökkentette a kolóniaszámot, a carvedilol azonban önmagában ennél a sejtvonalnál nem mutatott erőteljes gátló hatást. A két hatóanyag kombinációja viszont ennél a sejtvonalnál is a legerősebb kolóniaszám-csökkenést eredményezte, és a kombináció esetén a bexarotene hatásához képest is szignifikánsan alacsonyabb volt a kolóniaszám.

29. Ábra

A



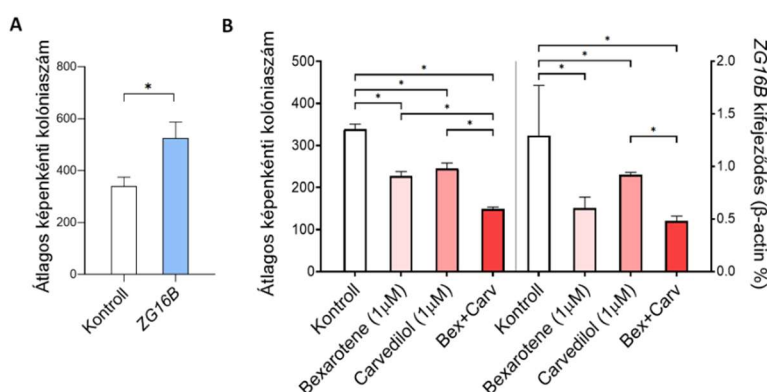
B



29. Ábra: A ZG16B fokozza a T47D és MDA-MB-231 sejtek transzformáltságát, míg a Bex+Carv kezelés gátolja azt. A, T47D sejtek transzformáltságának vizsgálata ZG16B kezelés (felső panel) és bexarotene + carvedilol kezelések (alsó panel) mellett. (* $p < 0.05$ T-test; ANOVA, Tukey's multiple comparison test) B, MDA-MB-231 sejtek transzformáltságának vizsgálata ZG16B kezelés (felső panel) és bexarotene + carvedilol kezelések (alsó panel) mellett. (* $p < 0.05$ T-test; ANOVA, Tukey's multiple comparison test)

Az előzőleg bemutatott soft agar kísérletek után az MCF7 sejtvonallal is elvégeztük a kolóniaformáló assay-t. Az első kísérletben *ZG16B*-vel kondicionált felülúszóval kezeltük az MCF7 sejteket (30A ábra). Az eredmények alapján a kontrollhoz képest szignifikánsan több kolónia alakult ki. A második kísérletben (30B ábra) a sejtek bexarotene-el, carvedilol-al, illetve a kettő kombinációjával lettek kezelve. Az adatok egyértelműen azt mutatták, hogy mindhárom kezelés szignifikánsan csökkentette a kolóniák számát a kontrollhoz viszonyítva, és a kombináció hatása a két hatóanyag önálló alkalmazásához képest is szignifikánsan erőteljesebb volt. Fontos megállapítás, hogy nem csak a kolóniaszám csökkent, hanem a kolóniákból izolált RNS vizsgálata során RT-qPCR-rel a *ZG16B* mRNS szintje is csökkenést mutatott a szerek önálló és kombinált alkalmazása esetén.

30. Ábra



30. Ábra: A *ZG16B* fokozza az MCF7 sejtek transzformáltságát, amit a bexarotene és carvedilol kombinációja szignifikánsan csökkent. A, MCF7 sejtekkel végzett soft agar kolónia formáló assay eredményei *ZG16B* kezelés mellett. (* $p < 0.05$ T-test) B, MCF7 sejtekkel végzett soft agar kolónia formáló assay eredményei bexarotene és carvedilol kezelések mellett. A grafikon bal oldalán a kolóniaszámok jobb oldalon pedig a kolóniákból izolált RNS-ből mért *ZG16B* expressziós szint került feltüntetésre. (* $p < 0.05$ T-test; Tukey's multiple comparison test)

Összességében a soft agar assay eredményei megerősítik, hogy a *ZG16B* a tumorsejtek számára proliferációs és túlélési előnyt biztosít, ugyanakkor a bexarotene és különösen a bexarotene + carvedilol kombináció hatékonyan képes ellensúlyozni ezt a hatást. Ezek az adatok szervesen illeszkednek a korábbi proliferációs és EMT-kísérletekhez, és egyértelműen rávilágítanak a *ZG16B* potenciális onkogén funkciójára, valamint a kombinációs kezelések tumorsejtekre kifejtett transzformációt csökkentő hatására.

4.16 A bexarotene + carvedilol kombinációja csökkenti a *ZG16B* és *FNI* expresszióját normál emlőszövetben és xenograft emlőtumor szövetben

Annak érdekében, hogy igazoljuk, korábbi *in vitro* kísérletes megfigyeléseink replikálhatók *in vivo* környezetben is, két különböző állatmodellt vontunk be a vizsgálatainkba. Egyrészt MMTV-*ERBB2* transzgénikus egereket, amelyek HER2-t túlexpresszálnak, és emiatt a humán emlődaganat megelőzésének és korai beavatkozási lehetőségeinek vizsgálatára széles körben alkalmazott preklinikai modellnek számítanak. Másrészt MDA-MB-231 sejtvonallal xenograftált SCID egereket, melyek humán tripla negatív emlődaganat *in vivo* vizsgálatára adnak lehetőséget.

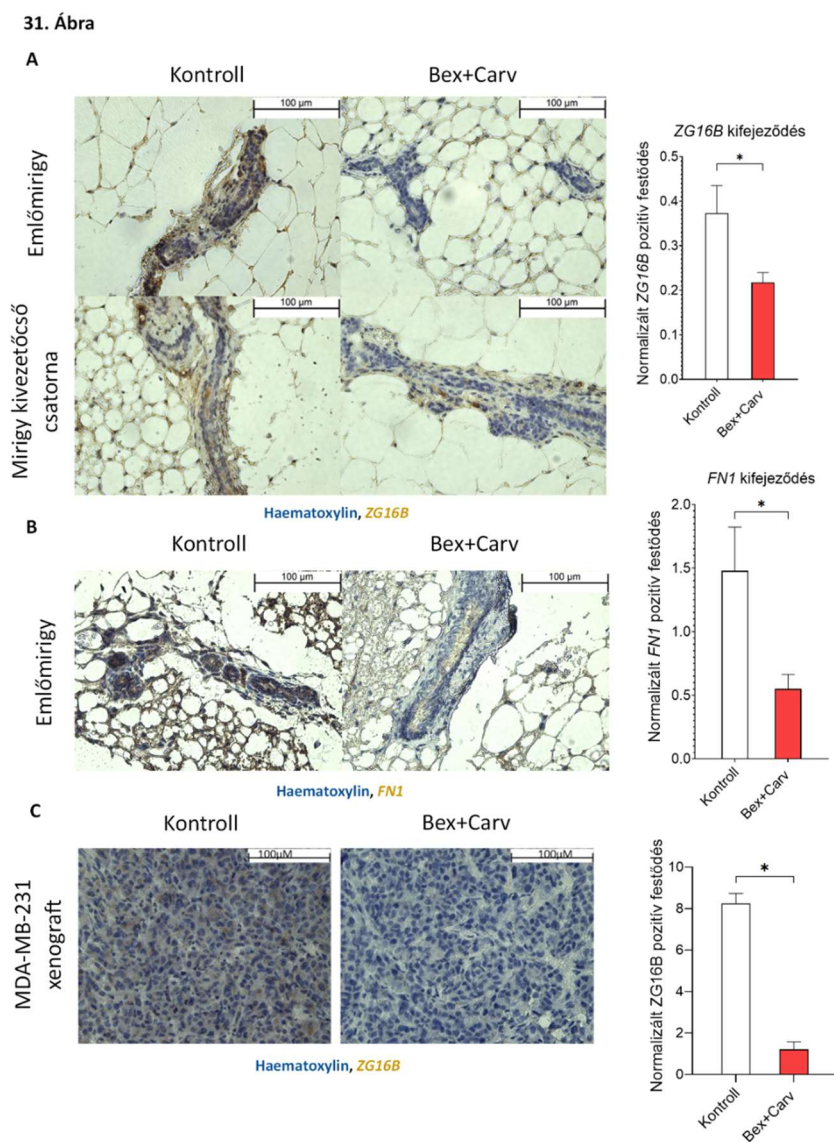
Az MMTV-*ERBB2* modellből származó minták immunhisztokémiai vizsgálatai során a normál emlőmirigyekben egyértelmű *ZG16B* szuppressziót detektáltunk bexarotene és carvedilol kezelés hatására (31A ábra). A *ZG16B* ellenes antitesttel végzett festések mind a kivezetőcsatornák, mind az emlőmirigy területén csökkent jelintenzitást mutattak a kontrollal kezelt állatokhoz képest. A kísérlet tehát igazolta, hogy a kombináció képes normál emlőszövetben *in vivo* is gátolni a *ZG16B* kifejeződését, ami megerősítette a korábbi *in vitro* RT-qPCR és fehérjeszintű eredményeinket.

Az *FNI* fehérje immunhisztokémiai vizsgálata ugyanezen mintákban szintén szignifikáns szuppressziót mutatott (31B ábra). A kontrollal kezelt állatokhoz képest a bexarotene és carvedilol kombinációjával kezelt egerek emlőmirigyekben az *FNI* jelintenzitás szignifikánsan csökkent. Ez a megfigyelés megerősíti, hogy a kombinációs kezelés nem csupán a *ZG16B* expresszióját csökkenti, hanem az emlőmirigy ECM dinamikáját is képes befolyásolni *in vivo*.

Az MDA-MB-231 sejtekkel képzett xenograft tumorok proliferatív régióiból származó metszetek immunhisztokémiai festése során a *ZG16B* expressziója a kontrollal kezelt állatokban kifejezetten erős volt, míg a bexarotene-el és carvedilol-al kezelt állatokban szignifikánsan alacsonyabb jelintenzitás volt kimutatható (31C ábra). Ez egyértelműen bizonyította, hogy a kombináció nem csak normál szövetekben, hanem daganatos környezetben is képes a *ZG16B* expressziójának csökkentésére.

Összességében az *in vivo* kísérletek kulcsfontosságú bizonyítékot nyújtanak arra, hogy a bexarotene és carvedilol kombinációs kezelése biológiailag releváns környezetben is képes szuppresszálni a *ZG16B* expresszióját, és ezzel összhangban az ECM komponensek közül az

FN1 szintjét is csökkenti. Ezen túlmenően, arra is kísérletes bizonyítékot szolgáltatunk, hogy *in vivo* tripla negatív tumorokban is képes ez a hatóanyag-kombináció csökkenteni a *ZG16B* szintjét.



31. Ábra: A bexarotene és carvedilol kombinációja *in vivo* csökkenti a ZG16B és FN1 expresszióját normál emlőszövetben és MDA-MB-231 xenograft tumorokban. A, Bexarotene és carvedilol hatásának vizsgálata a normál emlőszöveti ZG16B expresszióra. Bal oldalon immunhisztokémiai jelölések reprezentatív képei láthatóak, jobb oldalon pedig ezek kiértékeléséből származó eredmények kerültek bemutatásra. B, Bexarotene és carvedilol hatásának vizsgálata a normál emlőszöveti FN1 expresszióra immunhisztokémiai festés segítségével. C, MDA-MB-231 xenograft tumorszövet ZG16B tartalmának vizsgálata immunhisztokémiával. Az immunhisztokémiai festések kiértékelése során az immunfestés adta terület nagyságát a haematoxylin adta festődés területére normalizáltuk. (* $p < 0.05$ T-test)

5. Diszkusszió

5.1 A monoamin jelátvitel klinikai jelentősége és potenciális transzlációs szerepe emlőrákban

A neurotranszmitter-mediált jelátviteli útvonalak szerepének vizsgálata az emlőtumorsejtekben az utóbbi évtizedben jelentős térnyeréssel egy új daganatbiológiai kutatási irányként alakult ki¹⁷⁷. A neurotranszmitter receptorok aktivációja hatással lehet a sejtciklus szabályozására, az EMT és az angiogenezis folyamataira, továbbá hozzájárulhat a tumor mikrokörnyezetének sejtes és szerkezeti átalakulásához¹⁷⁸. Az emlőtumorsejtekre számos más szolid daganattípushoz hasonlóan gyakorta jellemző a fokozott innerváció, továbbá klinikai megfigyelések szerint ez a magasabb szöveti idegrost-sűrűség kedvezőtlen prognózissal társul^{179,180}.

Az emlőrák vonatkozásában egyre több kísérletes és klinikai adat utal arra, hogy a stressz által kiváltott, β -adrenerg receptorokon keresztül közvetített jelátvitel releváns modulátora lehet a tumorok progressziójának és a relapszusnak. Az adrenalin vagy noradrenalin progressziót elősegítő hatásai között említhető a β_2 -adrenerg receptorok aktivációján keresztül megvalósuló proliferációt, migrációt és invazív fenotípus kialakulását támogató hatás¹⁸¹. Ezek mellett a β -adrenerg receptorok stimulációja fokozhatja az angiogenezist a VEGF-expresszió indukcióján keresztül, valamint hozzájárulhat az immunosuppresszív tumor mikrokörnyezet kialakulásához az effektor T-sejt válasz gyengítése és a myeloid eredetű szuppresszor sejtek arányának növelése révén^{182,183}. Ugyanakkor, az adrenerg stimuláció tumorbiológiai jelentőségének feltárása felvetette ezen jelátviteli útvonal terápiás célpontként való hasznosíthatóságát is. Ennek megfelelően az elmúlt években jelentősen megnőtt azon publikált tanulmányok száma, amelyek retrospektív klinikai adatok analízise alapján értékelték a β -blokkolók használatát és az emlőrák kialakulása vagy prognózisa közötti összefüggést. Bár az összesített túlélési eredmények nem minden esetben mutattak egységes képet, több vizsgálat korrelációt írt le a β -blokkoló használat és a csökkent recidíva-, illetve csökkent metasztázis-kockázat között, különösen agresszívebb, hormonreceptor-negatív emlőrák altípusok esetén^{184–189}.

Bár a β -blokkolók esetében egyre több adat utal arra, hogy a daganat progresszió és a relapszus kockázatát befolyásolhatják, ezen megfigyelések jelentősége túlmutathat egyetlen receptorcsaládon. Az adrenerg modulátorok azért bírnak kiemelt transzlációs értékkel, mert olyan, klinikailag jól karakterizált, széles körben alkalmazott gyógyszercsoportról van szó, amelyet a betegek nagy része egyéb, nem onkológiai indikációk miatt (például cardiovascularis

betegségekben) már eleve hosszú távon használ. Hasonló helyzet figyelhető meg más, monoamin jelátviteli modulátorok esetében is. Például, a 5-HT receptorokat és transzportereket célzó antidepresszánsok, illetve a hisztamin receptorokat gátló antiallergiás szerek szintén széles populációban, gyakran hosszú távon alkalmazott készítmények. Ugyanakkor az ezen receptorcsaládokhoz kapcsolódó jelátvitel emlőtumorokban betöltött jelentőségének szisztematikus vizsgálata eddig elmaradt. A daganatos megbetegedéshez társuló pszichés megterhelés következtében az onkológiai betegek körében az antidepresszánsok alkalmazása számottevően gyakoribb az általános populációhoz képest¹⁹⁰. Ennek következtében az emlőrákban szenvedő vagy azon átesett betegek és 5-HT-jelátvitelt moduláló hatóanyagokkal kezelt egyének populációinak metszete klinikailag releváns nagyságrendű lehet. Továbbá, mivel a 5-HT vagy egyéb monoamin receptorokhoz kapcsolt jelátviteli útvonalak ugyanazokon a jelátviteli komponenseken keresztül szignalizálnak felmerülhet, hogy a monoamin receptorok modulálása a normál emlő epithel sejtek fiziológiája és a tumoros transzformáció korai lépései szempontjából is releváns megközelítések alapját képezhetik.

A klinikai gyakorlatban széles körben alkalmazott szelektív 5-HT visszavétel gátlók elsődleges célpontja a 5-HT transzporter. A transzporter gátlása következtében a szinaptikus térben megjelenő 5-HT hosszabb ideig marad jelen, ami a célreceptorok aktivációjának elnyúlását és a 5-HT jel erősödését eredményezi¹⁹¹. Bár az SSRI kezelésekkel kapcsolatos retrospektív vizsgálatok eredményei nem egységesek, egyes tanulmányok csökkent emlőrák kialakulási kockázatot írtak le SSRI használat mellett^{192,193}. Az eredmények ellentmondásossága részben abból is fakadhat, hogy ezek az elemzések jellemzően nem veszik figyelembe az emlőtumorok molekuláris és receptor státuszon alapuló heterogenitását. Hasonló jelenség volt megfigyelhető az adrenerg jelátvitel modulációját vizsgáló tanulmányok esetében is, ahol a daganatok molekuláris klasszifikációja alapján végzett elemzések rámutattak arra, hogy a β blokkolók preventív hatása elsősorban hormonreceptor-negatív daganatokban érvényesülhet. Ezzel szemben, ha a daganatok összességét vizsgálták, a molekuláris klasszifikáció bevonása nélkül szintén ellentmondásos eredményeket kaphatunk¹⁸⁸. Ez az összefüggés arra utal, hogy az SSRI-kel kapcsolatos retrospektív adatok értelmezését is jelentősen árnyalhatja az elemzésbe bevont betegek daganattípusainak részletesebb molekuláris klasszifikációjának hiánya.

5.2 Az intra- és extracelluláris 5-HT hatások elkülönítésének koncepcionális és technikai korlátai

A 5-HT emlőmirigybeli fiziológiájával foglalkozó publikációk többsége elsősorban a külsőleg hozzáadott 5-HT hatását vizsgálta, és nem tett egyértelmű különbséget a sejtekbe bejutó 5-HT mennyisége és a sejtfelszíni receptorok aktivációján keresztül közvetített hatások között. Ez a megközelítés azonban koncepcionális szempontból korlátozó lehet, mivel az intracelluláris és extracelluláris 5-HT által kiváltott jelátviteli mechanizmusok eltérőek lehetnek, és potenciálisan különböző biológiai válaszokat eredményezhetnek. A 5-HT fiziológiájában az intra- és extracelluláris hatások egyértelmű elkülönítésének ilyen irányú feltárását ugyanakkor jelentős technikai nehézségek akadályozzák, ugyanis a legtöbb vizsgált sejttes modell rendszerekben gyakran eleve jelen van az endogén 5-HT. A rendszerben jelen lévő 5-HT-t egyes sejtek endogén úton is képesek előállítani, vagy származhat a sejtek fenntartásához használt médium kiegészítő komponenseiből is. További technikai kihívást jelent, hogy bár a 5-HT mennyisége immunológiai, tömegspektrometriás vagy spektrofotometriás módszerekkel kvantifikálható, az eredet és az intra- és extracelluláris arányok dinamikus becslése csak korlátozottan megoldható. A 5-HT ilyen dinamikus jelenlétének mérésére fejlesztettek már módosított 5-HT analógokat, azonban ezek esetében jogosan merül fel a hatásspektrum és a fiziológias relevancia eltérésének lehetősége¹⁹⁴. Újabb technológiák alapján elektrokémiai módszerekkel már jóval dinamikusabban detektálható a 5-HT akár *in vivo* rendszerekben is, azonban ezek a mérési technológiák jelenleg nehezen hozzáférhetőek és drágák^{195,196}.

5.3 A szerotonin jelátvitel proliferációt szabályozó jelentősége normál epithel sejtekben

A normál epithel sejtek osztódási rátája alkalmas és releváns paraméter a kemopreventív hatás azonosítására, mert a daganatképződés egyik legkorábbi és legáltalánosabb lépése a homeosztatikusan szabályozott proliferáció felborulása. Az emelkedett osztódási ráta már a malignus transzformációt megelőzően megjelenhet, így a proliferáció csökkentése egy korai, még reverzibilis beavatkozási pontot jelenthet. Emellett a normál epithel sejtekben mért proliferációs válasz érzékenyen integrálja a növekedési faktorok, hormonális és parakrin jelátviteli utak változásait, szemben a tumorsejtekkel, melyek genetikai és epigenetikai szinten rögzült torzító adaptációi módosítják a sejtek által adott választ. Ezért az osztódási ráta mérséklése normál epithel sejtekben funkcionális indikátora lehet annak, hogy egy beavatkozás

képes-e csökkenteni a daganatképződés kockázatát anélkül, hogy citotoxikus hatást fejtene ki^{197,198}.

Az emlőszövet homeosztatikus 5-HT jelátvitelének kialakításában meghatározó tényező, hogy a normál emlő epithel sejtek képesek a 5-HT endogén előállítására¹⁹⁹. Ezt támasztják alá saját eredményeink is, amelyekben igazoltuk, hogy a 5-HT bioszintézisének kulcsenzimként ismert triptofán-hidroxiláz-1 kifejeződik normál emlő epithel sejtekben. A 5-HT emlőszövetben betöltött fiziológiás szerepe tekintetében leginkább a szekretoros aktiváció és az involúció folyamatában betöltött szerepet jelentőségét írták le eddig²⁰⁰. Vizsgálataink során a 5-HT sejten belüli jelenléte immunjelöléssel kimutatható volt. A kimutatott 5-HT eredete ugyanakkor nem határozható meg egyértelműen, mivel nem zárható ki, hogy a sejtek által szintetizált és felvett 5-HT mellett a sejt kultúra médiumában endogén módon jelenlévő 5-HT is hozzájárul a sejten belül mérhető jelhez. Irodalmi adatok szerint emlőtumor sejtekben a *TPHI* expressziója gyakran magasabb a normál sejtekhez képest, ami feltehetően emelkedett 5-HT is termeléssel társul^{201,202}. Ezen kívül más publikációkban is megerősítik, hogy a normál és emlőtumor sejtek is képesek a 5-HT szintézisére, az utóbbiakban jóval magasabb mértékben a környező normál szövetekhez képest²⁰³. A 5-HT jelátvitel szabályozását azonban nem kizárólag a szintézis mértéke határozza meg, hanem jelentős szerepet játszik a 5-HT transzporter működése is, amely az extracelluláris térből történő 5-HT felvételéért felelős. A transzporter aktivitása az elektrokémiai nátrium és kálium gradienshez kötött, amelyet az ATP-dependens nátrium kálium pumpa működése tart fenn²⁰⁴. Ennek megfelelően a transzporter működésében bekövetkező változások nem csak a sejten belüli 5-HT koncentrációt módosíthatják, hanem a receptor mediált jelátvitel időbeli és térbeli mintázatát is alakíthatják.

Az általunk végzett proliferációs kísérletekben a 5-HT transzporter funkcionális inaktiválása géncsendesítés alkalmazásával gátolta a normál emlő epithel sejtek proliferációját. Ezt a megfigyelést farmakológiai megközelítéssel is megerősítettük, mivel a paroxetine kezelések hasonló irányú hatást eredményeztek. Ezzel szemben a további vizsgált szelektív 5-HT visszavétel gátlók, például a citalopram és a sertralín, a tesztelt koncentrációtartományban nem váltottak ki összehasonlítható proliferáció-gátló hatást. Ez a különbség nagy valószínűséggel a vizsgált hatóanyagok eltérő 5-HT transzporter affinitásával magyarázható, mivel a paroxetine lényegesen nagyobb kötődési affinitással rendelkezik a transzporterhez a másik két SSRI-hez képest¹⁷⁰. Ezen eredmények alapján, a további kísérleteinkben a paroxetine alkalmazása

szolgált arra a célra, hogy a 5-HT intra- és extracelluláris hatásait funkcionálisan elkülöníthető módon vizsgáljuk. Továbbá, ezek az eredmények visszairányítják a figyelmet az SSRI használat és az emlőrák kockázata közötti összefüggéseket vizsgáló retrospektív tanulmányokra. Amellett, hogy ezekben az elemzésekben jellemzően nem került sor az emlőtumorok molekuláris klasszifikációjának figyelembevételére, további lényeges szempont lehet az alkalmazott SSRI-k egymástól való elkülönítése a 5-HT transzporterhez, vagy más monoaminerg célpontokhoz mutatott affinitásuk alapján.

5.4 A SERT gátlásához társuló transzkriptomikai változások jellemzése

A tapasztalt antiproliferatív hatás mellett azt is prezentálni tudtuk, hogy a sejtekbe bejutó 5-HT mennyisége csökkenthető a transzporter paroxetine-el történő gátlásával. Ez egyúttal jelezte számunkra, hogy a 5-HT transzporter amellett, hogy kifejeződik normál emlő epithel sejteken funkcionálisan aktív 5-HT transzferért felelős. Az epithel sejteken elvégzett transzkriptomikai elemzéseink ugyanakkor arra mutattak rá, hogy paroxetine kezelés hatására számos sejtfelszíni receptor aktivációval kapcsolatos gén expressziója fokozódik. A fokozott kifejeződést mutató gének útvonal-analízise során előkerültek direkt G-fehérje mediált jelátviteli útvonalak, de például az ion-homeosztázishoz (főként kalcium) kapcsolható útvonal is, valamint a szinaptikus jelátvitelhez kapcsolható gének is fokozott expressziót mutattak. Ezek az útvonalak és a hozzá kapcsolódó gének fokozott kifejeződése egyértelműen arra mutat rá, hogy a transzporter gátlásakor a sejtek olyan fehérjéket kezdenek el termelni, mely a sejtfelszíni receptorokon keresztül megvalósuló jelátvitelhez szükségesek. A paroxetine kezelés hatására megfigyelt transzkriptomikai változások ugyanakkor feltehetően nem az akut GPCR aktiváció közvetlen következményei, hanem egy adaptív válasz részét képezik a tartós 5-HT ingerre, mivel a sejtek hosszabb 24 órás intervallumban voltak kitéve paroxetine kezelésnek. A 5-HT transzporter gátlása feltehetően elnyújtott extracelluláris 5-HT jelenlétet eredményez, amely kezdeti receptor aktivációt, majd deszenzitizációt vált ki, ezt követően pedig a sejt kompenzációs átprogramozással reagál. Ennek részeként fokozódhat a GPCR jelátvitelhez kapcsolódó komponensek, a kalcium homeosztázist szabályozó elemek, valamint a strukturált, szinapszisszerű jelátvitel kialakításában szerepet játszó gének expressziója. Bár ezen mechanisztikus összefüggéseket kísérletesen egyesével nem validáltuk, a megfigyelt transzkriptomikai válasz mintázata összhangban van azzal a lehetőséggel, hogy a vizsgált sejtes modellrendszerben a paroxetine kezelés fokozott és időben elnyújtott 5-HT stimulációt eredményez.

A transzkriptomikai analízis során több olyan útvonalat azonosítottunk, amelyekhez csatolható gének expressziós szintje jelentősen csökkent paroxetine kezelést követően. Ide sorolhatóak a sejtciklus szabályozásához, a genomi integritás fenntartásához és az endoplazmatikus retikulum stressz válaszhoz kapcsolható útvonalak. Ezen transzkripciós változások értelmezésekor figyelembe kell venni, hogy a vizsgált sejtes modellrendszerben a normál emlő epithel sejtek fiziológiai körülmények között is hozzáférnek 5-HT-hoz, amelynek egy része a sejtekbe jutva többféle intracelluláris célponton keresztül válthat ki biológiai választ. A 5-HT transzporter gátlása paroxetine kezelés hatására nem csak az extracelluláris 5-HT szintet és az abból fakadó receptor stimuláció mértékét növeli, hanem ezzel egyidejűleg csökkenti a sejtekbe jutó 5-HT mennyiségét is. A sejtekbe bejutó 5-HT enzimatis lebonása során reaktív oxigén gyökök keletkeznek, amely jelenséget saját kísérleteinkben is detektáltuk. Ez az alapjelenség illeszkedik azon irodalmi adatokhoz, amelyek szerint emlőtumorokban a monoamin-oxidáz enzim aktivitása pro-tumorigenikus tényezőként értelmezhető, mivel az általuk generált oxidatív stressz fokozhatja a genomi instabilitást²⁰⁵. Saját eredményeink alapján a sejtekbe jutó 5-HT mennyiségének csökkentése a 5-HT lebontásából származó reaktív oxigén gyökök szintjének mérséklődésével járt együtt. Ez szoros összefüggést mutatott azzal a megfigyeléssel, hogy gátolt 5-HT transzporter mellett szignifikánsan csökkent a γ H2AX-pozitív, DNS-károsodást hordozó sejtek aránya. Ebben a kontextusban a megfigyelt szuppresszált transzkripciós programok is nagyobb valószínűséggel inkább az intracelluláris 5-HT hatásainak részleges megszűnéséként értelmezhetők. Ezek az eredmények együttesen arra utalnak, hogy a 5-HT sejten belüli lebontásához kapcsolódó oxidatív stressz mérséklése az SSRI kezelések hatására hozzájárulhat a kromatin integritásának fenntartásához normál emlő epithel sejtekben. Ezzel összhangban korábbi irodalmi adatok fontos kapcsolatot írtak le a depresszió és az oxidatív stressz között, ahol az oxidatív stressz által kiváltott DNS-károsodás hozzájárult a pszichiátriai kórképekben megfigyelt felgyorsult biológiai öregedéshez^{206,207}. Végül, klinikai megfigyelések szerint, a depresszióban szenvedő betegek esetében az általános DNS-károsodás mértéke emelkedett az egészséges populációhoz képest, ugyanakkor az SSRI kezelések képesek ezen hatások mérséklésére^{208,209}.

5.5 A sejtfelszíni 5-HT receptor-mediált jelátvitel szerepe a proliferáció és a mitogén jelátviteli útvonalak szabályozásában

Eredményeink alapján a paroxetine kezelés hatására a sejtekbe jutó 5-HT mennyiségének csökkenése az intracelluláris 5-HT által közvetített hatások fokozatos gyengüléséhez vezet, ami elsősorban a kezelés korai fázisában járulhat hozzá a megfigyelt transzkripció és sejtes változásokhoz. Ez a hatás azonban időben korlátozott, és a tartós kezelés során várhatóan háttérbe szorul a sejtfelszíni 5-HT receptorokon keresztül megvalósuló jelátvitellel szemben, amelyet a transzporter gátlása következtében fennmaradó extracelluláris 5-HT jelenlét folyamatosan fenntart. Ennek funkcionális jelentőségét vizsgálva elemeztük, hogy a 5-HT önmagában, illetve paroxetine-el kombinálva milyen hatást gyakorol a normál emlő epithel sejtek proliferációjára. Eredményeink azt mutatták, hogy transzporter gátlása mellett a 5-HT antiproliferatív hatása erősödik, ami arra utal, hogy a paroxetine által kiváltott proliferációcsökkenés elsősorban a sejtfelszíni receptorok fokozott és elnyújtott stimulációjának tulajdonítható.

A 5-HT sejtfelszínen keresztül megvalósuló antiproliferatív hatásának további igazolásaként megvizsgáltuk, hogy az emlősejtekben esszenciális mitogén jelátviteli útvonalak aktivitása hogyan szabályozódik szerotoninerg stimuláció hatására. Az Erk 1/2 (*MAPK*), az Akt (*PI3K*–Akt tengely) és a Src-hoz kapcsolt jelátviteli útvonalak a sejtek növekedésének, túlélésének és motilitásának szabályozásában általánosan elfogadott központi útvonalakként emelhetők ki, amelyek különböző extracelluláris ingerek hatásait képesek összehangolni^{210,211}. Az Erk 1/2 (*MAPK* útvonal) klasszikusan a mitogén jellegű ingerekhez és a sejtciklus szabályozásához kapcsolódik, míg a *PI3K*-Akt útvonal a sejtanyagcsere, a túlélési mechanizmusok és a stresszválasz integrációjában tölt be kulcsszerepet. Az epitheliális sejtekben a FAK–Src tengely elsődleges funkciója az adhézió dinamikus szabályozása. A fokális-adhéziók kialakulása, érésük és lebomlásuk finomhangolása ezen a tengelyen keresztül zajlik. Ez biztosítja, hogy a sejtek stabilan rögzüljenek a bazális membránhoz, ugyanakkor képesek legyenek morfológiai adaptációra és kontrollált mozgásra a szöveten belül.

Az általunk végrehajtott kísérletekben a három vizsgált jelátviteli elem közül egyedül az Erk 1/2 fehérjék gyors dephosphorylációja volt megfigyelhető 5-HT hatására. Az Erk 1/2 csökkent phosphoryláltsága a sejtosztódást befolyásoló jelátviteli útvonal inaktiválódására vezethető vissza, mely támogatja az általunk tapasztalt, 5-HT-ra adott antiproliferatív választ is. *In vivo*

patkány modellben kimutatták, hogy akut stressz hatására a Pyk2 phosphorylációjának csökkenése együtt jár az Erk 1/2 aktivitás mérséklődésével a laterális szeptum szövetében²¹². Más tanulmányok ezzel szemben a 5-HT által kiváltott Erk 1/2 aktivációt írták le egyéb sejttypusokban^{213,214}. A 5-HT Erk 1/2-re gyakorolt hatása ezek alapján erősen függ a vizsgált sejt vonal vagy szövet sajátosságaitól. Eredményeink alapján az emlő epithel sejtekben megfigyelt Erk 1/2 dephosphoryláció nagyobb valószínűséggel a sejt felszíni 5-HT receptorokon keresztül megvalósuló jelátvitel következménye, mintsem a 5-HT direkt intracelluláris hatásáé. Ezt támasztja alá az is, hogy a paroxetine jelenlétében a hatás jelentősen erősödött. Fontos kiemelni, hogy adrenerg receptorok esetén is leírtak hasonló jelenséget, ugyanis a G_s fehérje-kapcsolt β₂-adrenerg receptorok szelektív agonistája is képes az Erk 1/2 dephosphorylációját kiváltani a kanonikus cAMP által szabályozott jelátviteli útvonalon keresztül²¹⁵. Mivel működésüket tekintve a 5-HT receptorok között is találhatóak ugyanezen elv alapján működő G_s-kapcsolt receptorok, ezért feltételezhetően hasonló molekuláris mechanizmusok következményeképp írható le az általunk is tapasztalt Erk 1/2 dephosphoryláció 5-HT hatására.

5.6 Az 5-HT receptorok expresszióbeli és funkcionális heterogenitása normál emlő epithel sejtekben

Ezen eredmények alapján a további vizsgálatok során a sejt felszíni 5-HT receptorok funkcionális szerepére és az általuk közvetített jelátvitel részletesebb feltárására helyeztük a hangsúlyt. Transzkriptomikai adataink alapján megállapítottuk, hogy a szakirodalomban leírtakhoz hasonlóan, a normál emlő epithel sejtek egyszerre többféle 5-HT receptort is expresszálnak²¹⁶. HME-hTert sejtekben az *5-HT₇* izoforma mutatta messze a legmagasabb transzkript szintet, ugyanakkor emellett *5-HT_{1B}*, *-1D*, *-2A*, *-2B*, *-2C*, *-4*, *-5A* izoformák kifejeződése is detektálható volt. Mivel az *5-HT₇* receptor izoformából nagyságrenddel nagyobb mennyiség található a sejt felszínen, ez önmagában is növelheti annak valószínűségét, hogy a 5-HT elsődlegesen ehhez a receptor izoformához kötődjön, különösen alacsony 5-HT koncentrációk mellett. Ugyanakkor a 5-HT receptorok affinitása és kötési kinetikája receptoronként eltérő, ezért egy kisebb számban jelen lévő, de nagy affinitású receptor izoforma már alacsony ligand koncentrációnál is aktiválódhat, míg egy nagyobb számban expresszált, de kisebb affinitású receptor csak magasabb koncentrációk mellett válik meghatározóvá. Ennek következtében a sejtek által produkált válasz koncentrációtól függő módon akár receptor preferencia-váltást is mutathat.

Mindezt tovább bonyolítja, hogy a különböző G-fehérje útvonalak által közvetített jelek nem lineárisan adódnak össze, tehát nem csupán az expresszióbeli különbségek határozzák meg az endogén ligandra kialakuló jelátvitelt és fenotípusos választ. Ez adódhat abból is például, hogy már alacsonyabb mértékű G_i -mediált jelátvitel is hatékonyan képes csökkenteni egy domináns G_s -útvonal által kiváltott cAMP-választ. Emellett a jelátvitel hatékonysága receptoronként is jelentősen különbözhet, így egy kevésbé abundáns receptor erőteljesebb sejten belüli jelamplifikáció révén aránytalanul markáns biológiai választ válthat ki, ami különösen igaz, ha a csatolt jelátvitel például a MAPK- és Ca^{2+} -függő útvonalakat érinti. Továbbá fontos kiemelni a receptorok hetero- vagy homo-dimerizációs képességét, mely jelentősen módosíthatja egy adott izoformához kötött kanonikus jelátviteli útvonal aktiválódását²¹⁷. Jó példa erre az $5-HT_{1A}$ és $5-HT_7$ által alkotott heterodimer kialakulása, melyben az $5-HT_{1A}$ -hoz kapcsolt jelátviteli útvonal inaktiválódik, erősítve az $5-HT_7$ receptorhoz köthető G_s -kapcsolt útvonal aktiválódását²¹⁸. Végül a jelátviteli válasz időbeli dinamikája is meghatározó tényező. A $5-HT$ receptorok deszenzitizációs és internalizációs kinetikája eltérő, ezért hosszan tartó ligandexpozió során a kezdetben domináns receptor által közvetített jel fokozatosan háttérbe szorulhat. Összességében, bár saját transzkriptomikai adataink - korrelálva a szakirodalmi adatokkal- megerősítik az $5-HT_7$ receptor izoforma domináns jelenlétét a vizsgált modellrendszerben, ez az expressziós adat önmagában még nem elégséges ahhoz, hogy az $5-HT_7$ izoformát tegyük felelőssé a paroxetine és a $5-HT$ antiproliferatív hatásáért.

További vizsgálataink célja ezért az volt, hogy validáljuk a normál emlő epithel sejtekben kifejeződő $5-HT$ receptor izoformák funkcionális szerepét az endogén ligand ($5-HT$), valamint szelektív receptor agonisták és antagonisták alkalmazásával. A receptorok G-fehérje-kapcsoltságának megfelelő jelátviteli válaszok vizsgálatára a G_s és G_i -kapcsolt receptorok által modulált adenilát-cikláz aktivitást cAMP-szint mérésével követtük, míg a G_q -kapcsolt receptorok által aktivált foszfolipáz C működését az IP1 szint meghatározásával jellemeztük, amely megbízhatóan korrelál az IP3 képződésével. A kísérletek során három általunk kiválasztott reprezentatív, validáltan kifejeződő és eltérő G-fehérje-kapcsoltsággal rendelkező receptort választottunk ki reprezentatív célpontként, nevezetesen az $5-HT_{1D}$, az $5-HT_{2B}$ és az $5-HT_7$ receptorokat. Ezeket a receptorokat $5-HT$ -val, valamint szelektív agonistákkal és antagonistákkal moduláltuk. Eredményeink alapján $5-HT$ kezelés hatására mind a cAMP, mind az IP1 szint emelkedése mérhető volt a kontrollhoz képest, ami a sejtekben működőképes $5-HT$

receptor jelátvitelt jelez. A szelektív modulátorok alkalmazásával mindhárom vizsgált receptor esetében a várható, kanonikus másodlagos hírvivő választ detektáltuk. A G_s és G_i -kapcsolt $5-HT_{1D}$ és $5-HT_7$ receptorok esetében szignifikáns változások mutatkoztak a cAMP-szintekben, míg a G_q -kapcsolt $5-HT_{2B}$ receptor aktivációja elsősorban az IP1 szint emelkedésében volt tetten érhető. Fontos megfigyelés továbbá, hogy az egyes receptorokra szelektív modulátorok nem befolyásolták az eltérő G-fehérje-kapcsoltságú 5-HT receptorok működését, ami alátámasztja a vizsgált jelátviteli válaszok specificitását. Figyelembe véve, hogy az általunk használt sejtvonalon 5-HT hatására többféle másodlagos hírvivő termelése is beindult, a modellünkben többféle 5-HT receptor szimultán aktivációja feltételezhető.

5.7 A 5-HT receptor útvonalak célzott farmakológiai szűrése az antiproliferatív jelátviteli elemek azonosítására

Következő lépésként, ezért egy olyan hatóanyag-könyvtárat állítottunk össze, mely alkalmas eszköz lehet annak megállapításához, hogy a három kanonikus útvonal közül melynek a célzott modulációja vezethet antiproliferatív válaszhoz normál emlő epithel sejteken. A hatóanyag-könyvtár összeállításával kapcsolatban fontos megemlíteni azt a limitációt az $5-HT_{1E}$ és $5-HT_{1F}$ esetében antagonistá, továbbá az $5-HT_{1B}$, $5-HT_{2A}$ receptorok tekintetében agonista beszerzésére nem volt lehetőségünk a kísérleteket megelőzően. Ezeken kívül az összes HME-hTert sejten kifejeződő GPCR típusú 5-HT receptort célzó hatóanyag rendelkezésünkre állt. A hatóanyagok tesztelése során egy olyan hatóanyag szűrővizsgálatot állítottunk be, mely dózis-hatás görbék felvételével (0.1-10 μ M koncentrációtartományban) antiproliferatív hatás alapján volt képes kiválogatni azokat a hatóanyagokat, melyek képesek gátolni a normál sejtek osztódását. A vizsgálat során a legmagasabb tesztelt koncentráció is még a szérumszinten is elérhető dózistartományba esett, továbbá a kísérletek indításakor alacsony denzitással osztottuk ki az optikai plate-ekre a sejteket, és a kontroll növekedéséhez viszonyítva követtük a kezelt sejtek osztódását.

Eredményeinket tekintve több hatóanyag is jelentős antiproliferatív hatást váltott ki HME-hTert sejtekből. 4 μ M küszöbértéknél állapítottuk meg azt az IC_{50} értéket, ami alatt egy adott hatóanyagot antiproliferatív hatásúként értékeltünk. Ez alatt a küszöbérték alatt G_q -kapcsolt antagonisták ($5-HT_{2A}$ - R96544, $5-HT_{2B}$ - LY266097), G_s -kapcsolt agonisták ($5-HT_7$ – LP211, $5-HT_6$ – WAY181187), egyetlen G_i -kapcsolt agonista ($5-HT_{1F}$ - LY344864) és több G_i -kapcsolt antagonistá ($5-HT_{1B}$ – SB216641, $5-HT_{1D}$ – LY310762, $5-HT_{5A}$ – SB699551) szerepelt

eredményeinkben. Ezek együtt egységes képet rajzolnak ki, ugyanis a hatóanyagok többsége a G_s -kapcsolt útvonal aktiválását és a G_q vagy G_i útvonal inaktiválását eredményezi. Egyedül az $5-HT_{1F}$ agonista (LY344864) hatása tér el ettől a mintázattól, azonban a tesztelt hatóanyag-könyvtárban ezen hatóanyag mellett megtalálható volt még egy másik $5-HT_{1E}/5-HT_{1F}$ agonista (BRL54443), mely nem mutatott olyan markánsan antiproliferatív hatást, mint az LY344864. A kettő közül az LY344864 rendelkezik magasabb affinitással ($pK_i=0.006$) a másik hatóanyaghoz képest ($pK_i=8.7$) az $5-HT_{1F}$ receptorhoz. Bár direkt farmakológiai modulációval kapcsolatban a szakirodalomban még nem áll rendelkezésre adat, a normál és tumorszövet közötti expressziós adatokat tekintve az $5-HT_{1F}$ receptor normál szövetben magasabb expressziót mutat, mint HER2+ vagy tripla negatív tumorokban, ezért az LY344864 és az általa célzott receptor érdekes új célpont lehet kemoprevenziós szempontból²¹⁹. Azonban az összes markáns antiproliferatív hatást felmutató hatóanyagokból kirajzolódó mintázatot tekintve felmerülhet az is, hogy a G_i -kapcsolt antagonisták és a G_s -kapcsolt agonisták tulajdonképpen azonos irányba mutatva, adenilát-cikláz és cAMP mediált jelátvitelt támogatnak. Ezek alapján a G_s -kapcsolt útvonal jelentősége az antiproliferatív válaszban kiemelt jelentőségűnek bizonyulhat. A G_s -kapcsolt jelátvitelért felelős $5-HT_6$ receptor expresszióját kedvező túlélési faktorként említik, mely a daganatokban mutatott csökkent expresszióból és a feltételezett immun-mikrokörnyezetet befolyásoló hatásból következik²²⁰. Az $5-HT_7$ esetén viszont meglepő összefüggést tártak fel a normál és emlőtumor szövetben betöltött funkcióit tekintve. Tripla negatív emlőtumor szövetben fokozott expressziót mutattak ki, mely összefüggésben állt azzal, hogy a 5-HT ezen receptor izoformán keresztül képes elősegíteni a tumor progresszióját a proliferáció és a metasztázisképzés korai szakaszában. Ezzel szemben MCF10A sejtmmodellben a szintén magas expressziót mutató $5-HT_7$ izoforma az $5-HT_7$ -cAMP-PKA jelátviteli tengely aktivációján át antiproliferatív hatást mutatott²¹⁶. Ez utóbbi szakirodalmi adat, azonos irányba mutat a saját eredményeinkkel, továbbá ezeket kiegészítettük a receptor szelektív aktivációjából származó eredményekkel.

A G_s -kapcsolt jelátvitel aktivációjával elért antiproliferatív hatás mellett ugyanakkor fontos szerepe van az ezt gátló G_i -kapcsolt receptorok gátlásának is. Borjú emlő epithel sejtekben leírták, hogy a pertussis toxin antiproliferatív hatással bírt, és képes volt attenuálni a sejtkultúra szérumában bejuttatott növekedési faktorok proliferatív hatását²²¹. A pertussis toxin a G_i alegység ADP-ribosilációjával képes elérni az alegység inaktivációját, így kvázi felszabadítani

az adenilát-cikláz gátlás alól, teret engedve így a konstitutív cAMP termelésnek G_s -kapcsolt receptor stimuláció esetén. A saját rendszerünkben is a végeredményt tekintve hasonló jelenség játszódhatott le, ugyanis a 5-HT receptorok antagonistával történő gátlása mellett a médiumban jelen lévő 5-HT a maradék nem gátolt receptor aktivációjára fordulhatott, amelyek jelentős többsége expressziós adatok alapján az *5-HT₇* izoforma volt. A normál szövet mellett a G_i -kapcsolt jelátvitelnek további terápiás vonatkozásának tekintetében leírták, hogy HER2+ daganatokban gyakran aberráns G_i -kapcsolt GPCR jelátvitel alakul ki, mely elsősorban a *PI3K/Akt* és az Src jelátviteli útvonalak aktivációjához vezet²²². Ez a megfigyelés a GPCR jelátvitel gátlásával tumor-terápiás megközelítést alapozhat meg. A G_q -kapcsolt receptor modulátorok esetén meglepő módon az antagonisták esetén tapasztaltunk markáns antiproliferatív választ. Ez azért érdekes, mert a 5-HT alapvetően egy aktiváló hatású ligand. Tehát, ha a 5-HT antiproliferatív hatása a G_q -kapcsolt receptorokon keresztül valósulna meg, akkor az agonisták esetén lenne várható antiproliferatív válasz, azonban G_q -kapcsolt receptorok aktivációja érdemben nem befolyásolta a sejtek osztódását.

Az *5-HT₇* szerepét a 5-HT antiproliferatív hatásában komplementációs kísérletekkel validáltuk. A vizsgálatok során a sejteket *5-HT_{1D}*, *5-HT_{2B}* vagy *5-HT₇* receptor antagonistákkal, valamint adenilát-cikláz vagy PKA inhibitorokkal előkezeltük, majd ezt követően 5-HT-val, paroxetine-el és a kettő kombinációjával utókezeltük a sejteket. Az eredmények alapján, az 5-HT stimuláció vagy a transzporter-gátláson alapuló antiproliferatív hatást egyedül az *5-HT₇*-Adenilát-cikláz-PKA tengely bármely pontján történő gátlása tudta kioltani. Ezek alapján a 5-HT és paroxetine antiproliferatív hatása mögött nagy valószínűséggel az *5-HT₇* receptoron keresztül megvalósuló aktivált jelátvitel felelős, melyet a vizsgált modellben a receptor izoforma nagyságrenddel nagyobb mértékű kifejeződése is támogat. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy az *5-HT_{1D}* és az *5-HT_{2B}* receptorok gátlása önmagában is csökkent proliferációt eredményezett, ami megerősíti a szűrővizsgálatok során kapott megfigyeléseinket.

5.8 A G-fehérje-kapcsolt jelátvitel általános szerepe a proliferáció szabályozásában normál emlő epithel sejtekben

Mivel a G_s mediált jelátviteli útvonal más receptorokon keresztül is aktiválható felmerülhet, hogy az *5-HT₇* receptorra jellemző mechanizmus egy jóval általánosabb szabályozási elvet tükröz. Mivel az adenilát-cikláz és PKA inhibitorokkal végzett kísérletünk is a kanonikus G_s -kapcsolt aktiváció útvonalát emeli ki antiproliferatív hatás alapján, a továbbiakban

kiterjesztettük a vizsgálatunkat egyéb GPCR jelátviteli családokra is, köztük a muszkarinos acetyl-cholin, dopamin és hisztamin receptorcsaládokra. Az acetyl-cholin receptorokat tekintve a két hatóanyag mutatott erősebb antiproliferatív hatást, a G_i -kapcsolt *CHRM4*- és a G_q -kapcsolt *CHRM3* antagonistái. A dopamin-receptor modulátorok közül a *DRD1* és *DRD5*, G_s -kapcsolt receptorok agonistája, a G_i -kapcsolt *DRD2* és *DRD3* receptorok antagonistái bizonyultak hatékonynak a sejtszám csökkentésében. A hisztamin receptorok esetén a G_i -kapcsolt *HRH3* antagonistája és a G_q -kapcsolt *HRH1* antagonistája mutatott antiproliferatív hatást. Összevetve ezeket az eredményeket a 5-HT receptorok esetében feltárt jelenségekkel, egy olyan egyértelmű mintázat rajzolódik ki, melyben a G_s -kapcsolt útvonal aktiválása, a G_i - és G_q -kapcsolt útvonal gátlása eredményez proliferáció-gátlást HME-hTert sejtekben. Érdekes megfigyelés, hogy az antiproliferatív hatásúként klasszifikált 15 hatóanyag közül 7 volt G_i -kapcsolt receptor antagonistája, 3 olyan volt mely G_s -kapcsolt receptor agonistája, 4 olyan, ami G_q -kapcsolt receptor antagonistája és egy, ami G_i -kapcsolt receptor agonistája. Ezek az arányok jól tükrözik a vizsgált receptorhalmaz eloszlását: G_s -kapcsolt receptor modulátor – 6 db, G_i -kapcsolt receptor modulátor – 13 db, G_q -kapcsolt receptor modulátor – 7 db. Mivel feltételezhető, hogy a 5-HT-hoz hasonlóan, a vizsgált modell rendszerben több egyéb monoamin és az acetyl-cholin receptorok endogén ligandjai is folyamatosan jelen vannak, ezért számos GPCR részben aktivált alapállapotban működhet, ami az agonisták hatását gyengítheti a proliferáció alapú méréseinkben. Ezzel szemben az antagonisták a bazális jelátvitel csökkentésén és a G_i -mediált gátló tónus feloldásán keresztül a GPCR-hálózat egyensúlyát könnyebben átrendezhetik, ami összességében könnyebben detektálható sejtes válaszhoz vezethet.

5.9 A rexinoid alapú kemoprevenció szinergikus erősítése 5-HT jelátviteli modulációval

A bexarotene és más rexinoidok kemopreventív potenciálját az emlőrák megelőzésének kontextusában elsősorban *in vitro* és *in vivo* preklinikai modellek támasztják alá. Például, tripla negatív emlőtumorképződéssel jellemezhető transzgén egérmodellben is leírták már, hogy a bexarotene mérsékelte a korai premalignus elváltozások kialakulását²²³. A koncepciót több összefoglaló munka is úgy értelmezi, hogy az RXR-agonizmus különösen ígéretes lehet ER-negatív prevencióban^{224,225}. Ugyanakkor, a rexinoidok hosszú távú, preventív alkalmazásának egyik fő korlátja a dózisfüggő mellékhatásprofil, amely szisztémás kezelésnél gyakran lipidanyagcsere-eltérésekkel és endokrin hatásokkal jár. A bexarotene esetén a

hypertriglyceridaemia és hypercholesterolaemia, valamint a centrális hypothyreosis jól ismert és gyakori mellékhatás, emellett hematológiai eltérések, például leukopenia vagy neutropenia is előfordulhatnak²²⁶. Ezek a toxicitások kellő indoklást adnak arra, hogy hosszú távú kemoprevencióban a rexinoidokat szinergikus kombinációkban vizsgáljuk, mert ilyen módon a hatásosság fenntartása elvileg alacsonyabb rexinoid dózissal is elérhető lehet, miközben a toxikus mellékhatások jelentkezése jelentősen csökkenthető lenne²²⁴. Alternatív, dóziskímélő stratégia lehet még a lokális rexinoid expozíció is, például a bexarotene topikális alkalmazásával, mely jelenleg klinikai vizsgálat alatt áll. Ez a fejlesztési irány szintén azt a törekvést tükrözi, hogy preventív alkalmazás során a tolerálhatóság legalább olyan meghatározó, mint a biológiai hatékonyság²²⁷.

A kombinációs stratégiák irányába mutató megközelítésünket megalapozta a munkacsoport azon korábbi megfigyelése, mely alapján a nem szelektív β -blokkoló carvedilol és a bexarotene együttes alkalmazása szinergikusan antiproliferatív hatású normál emlő hámsejtes modellekben *in vitro* és *in vivo*^{64,65}. Ezek a megfigyelések arra szolgálnak bizonyítékot, hogy a rexinoid hatás modulálható más jelátviteli útvonalak például az adrenerg-jelátvitel farmakológiai befolyásolásával, ami különösen releváns lehet dóziskímélő, hosszú távú preventív stratégiák kialakításában. Jelen doktori kutatás eredményeinek fényében ezért felmerült annak a kérdése, hogy a 5-HT receptorok modulációjával lehetséges-e hasonló módon potenciálni a bexarotene hatását. Ennek vizsgálatához dózis-hatás vizsgálatokban elemeztük a bexarotene és a paroxetine közötti kölcsönhatást. Eredményeink alapján a vizsgált két hatóanyag kombinációja esetén is képesek voltunk szinergikus hatást detektálni normál emlő epithel sejtekben proliferációs assay segítségével. A 2D sejtenyésztésen alapuló proliferációs assay mellett HME-hTert sejtekből képzett 3D szferoidokon is megvizsgáltuk a kombináció hatását. A sejtek által kialakított 3 dimenziós struktúrákból, továbbá a környező ECM-ből származó mechanikus és biokémiai jelek jelenléte miatt jóval fiziológiásabb környezetben, és hosszabb kezelési idő volt lehetőségünk a hatóanyag kombinációk vizsgálatára. Eredményeink alapján a bexarotene és paroxetine kombinációjával kezelt szferoidok méretben kisebbek voltak a kezelés végére a kontrollhoz viszonyítva, továbbá a szferoidban található sejtek kisebb arányban mutattak pozitivitást a Ki-67 proliferációs markerre nézve a kontrollhoz képest. Mivel korábbi vizsgálatainkban már megállapítottuk, hogy a paroxetine oldaláról az antiproliferatív hatásért a sejtfelszíni receptorokon keresztül megvalósuló jelátvitel a felelős jelentős részben, ezért

megvizsgáltuk, hogy a 5-HT bexarotene-el való kombinálása hogyan befolyásolja a sejtek osztódását. A vizsgálat során jóval markánsabb szinergiát tapasztaltunk a paroxetine-el való kombináláshoz képest. Ugyanakkor, ha a 5-HT és bexarotene kombinációval történő kezelés mellett a 5-HT transzportert is gátoltuk paroxetine-el akkor ez a szinergia tovább erősödött. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy a 5-HT receptorok stimulációja kombinálva a rexinoid bexarotene-el jelentősen vissza tudja szorítani a normál emlősejtek proliferációját. Ezen eredményeink alapján a 5-HT jelátvitel célzott modulációja alkalmas lehet a rexinoidok antiproliferatív hatásának szinergikus erősítésére. A bexarotene-el kombinált kezelések megtervezésekor elsődleges szempont volt a transzlációs relevancia biztosítása. Bár előző kísérleteink egyértelműen igazolták, hogy a 5-HT antiproliferatív hatásáért döntően a G_s -kapcsolt receptorokon keresztül aktiválódó jelátvitel felelős, a kombinációs vizsgálatokban olyan hatóanyagokat akartunk előnyben részesíteni, amelyek klinikai alkalmazhatósága és biztonságossági profilja már jól ismert. Ennek megfelelően a paroxetine mint régóta használt, széles körben alkalmazott antidepresszáns alkalmasabb kiindulási pontot jelentett egy potenciálisan hosszú távon is alkalmazható, alacsony dózisu preventív stratégia szempontjából, mint szelektív 5-HT₇ receptor-, adenilát-cikláz- vagy PKA-modulátorok bevonása. Ez utóbbiak kombinációban történő vizsgálata ugyanakkor indokolt és releváns további kutatási irányt jelenthet a későbbiekben.

5.10 A *ZG16B* epigenetikai szabályozása rexinoid alapú szinergikus kombinációk hatására

Bár a bexarotene és a monoamin jelátvitelt befolyásoló szerek közötti szinergiát több kombináció esetén is validáltuk, a szinergia pontos molekuláris hatásmechanizmusa jelenleg nem ismert. Ennek feltárásához olyan molekuláris markerek azonosítását tűztük ki célul, amelyek tumorbiológiai szempontból relevánsak, és egyben több, egymástól független szinergikus, rexinoid alapú kombináció hatására is transzkripcionális szinten regulálódnak. Ezen kritériumok alapján került a fókuszunkba a *ZG16B*, amely mind a bexarotene és paroxetine, mind pedig a bexarotene és carvedilol kombináció alkalmazása során szuppressziót mutatott normál emlő epithel sejtekben. A gén kiválasztását indokolta még, hogy a TCGA adatainak elemzése alapján a *ZG16B* emlőtumor szövetben emelkedett expressziót mutat a normál emlőszövethez képest, valamint különböző daganattípusokat összehasonlítva, az emlőrák a második legmagasabb *ZG16B* expresszióval jellemezhető daganatfajtának bizonyult.

Az előzetes munkáink egyértelműen igazolták, hogy a bexarotene és carvedilol szinergikus antiproliferatív hatása nem kizárólag klasszikus jelátviteli útvonalak modulációjára vezethető vissza, hanem epigenetikai transzkripcionális szabályozó folyamatok módosításával jár együtt⁶⁴. Bemutattuk, hogy a kombinációs kezelés az *ARID1A*- és *BRG1*-tartalmú SWI/SNF kromatin remodelláló komplex genomi DNS-hez való toborzását és az azon való eloszlását módosítja, ami kulcsfontosságú a TGF- β -kapcsolt gének transzkripció újraszabályozásához. Ez a jelenség az EMT gátlásához vezet normál és tumorsejtes modellekben⁶⁴. Ennek ismeretében logikusan merült fel a kérdés, hogy a jelen munkában vizsgált *ZG16B* expressziójának szabályozásában milyen szerepet tölthet be a SWI/SNF komplex, és hogy feltárható-e olyan epigenetikai szabályozás, amely a bexarotene és carvedilol által aktiválódik a *ZG16B* gén expressziójának befolyásolása során.

ChIP-szekvenálás alkalmazásával azonosítottunk egy, a *ZG16B* génhez tartozó távoli enhancer régiót, amelyen a bexarotene és carvedilol kombinációs kezelése mellett az *ARID1A* szignifikánsan fokozott kötődést mutatott. Ezzel párhuzamosan ugyanebben a genomi régióban csökkent a H3 hiszton acetylációja, ami a kromatin kondenzáltabb állapotára és ebből következően csökkent transzkripciós aktivitásra utal. Ezek az adatok együttesen arra engednek következtetni, hogy a bexarotene és carvedilol kombinált kezelése a *ZG16B* enhancer régióján *ARID1A*-mediált kromatin-szerkezetbeli átrendeződést indukál, amely funkcionálisan a *ZG16B* gén expressziójának gátlásában nyilvánul meg. Ebben a mechanizmusban az *ARID1A* kulcsszerepének további igazolására a HME-hTert sejtekben csendesítettük az *ARID1A* gént siRNS segítségével, majd a sejteket bexarotene-el, carvedilol-al, illetve ezek kombinációjával kezeltük. A *ZG16B* expressziójának mérésével sikerült igazolnunk, hogy a *ZG16B* jelentős szuppressziója a kombinált kezelésre specifikus jelenség, és nem az egyes hatóanyagok önálló hatásának következménye. Emellett azt a következtetést is levonhatjuk, hogy ez a szabályozási mechanizmus szigorúan függ az *ARID1A* jelenlététől, mivel annak hiányában a bexarotene és carvedilol kombináció *ZG16B*-expressziót csökkentő hatása teljes mértékben megszűnt. Ugyanakkor fontos kiemelni azt is, hogy a bexarotene és a carvedilol önmagában is képes volt csökkenteni a *ZG16B* kifejeződését. A bexarotene és carvedilol kombinációjára vonatkozó eredményeinket MMTV-*ERBB2* transzgenikus egér normál emlőszövetek immunhisztokémiai feldolgozásával is validáltuk. Megállapítottuk, hogy a bexarotene és carvedilol kezelés *in vivo* is képes csökkenteni az emlőszövetben kifejeződő *ZG16B* mennyiségét fehérje szinten, mind

az emlőmirigyekben, mind pedig azok kivezető csatornáinak epithel sejtjeiben. Ennek a mechanizmusnak a transzlációs jelentősége abban rejlik, hogy klinikailag már alkalmazott, ismert toxicitásprofillal rendelkező hatóanyagok kombinációjával egy olyan epigenetikai szabályozási csomópontot tudtunk célzottan modulálni, amely egy daganatprogresszióval összefüggésbe hozott faktor expresszióját már a transzformáció korai szakaszában képes befolyásolni.

5.11 A *ZG16B* tumorbiológiai szerepe és feltáratlan biológiai szerepe az emlőszövetben

A *ZG16B*, amelyet a korai irodalomban 'Pancreatic Adenocarcinoma Upregulated Factor' néven (PAUF) írtak le, egy szekretált, lektinszerű fehérje, amely cukorkötő régiója segítségével feltételezhetően glükózaminoglikánokhoz való kötődést segíthet elő. Legnagyobb mértékben szerepét a pancreas ductalis adenocarcinomában tárták fel, ahol a *ZG16B* eredetileg a daganatban fokozottan expresszáldó, szekretált faktorok keresése során került fókuszba¹⁶². Több, egymást kiegészítő publikáció is azt támasztja alá, hogy a *ZG16B* képes a veleszületett immunválasz sejt komponenseit átprogramozni mely azt eredményezi, hogy a tumor számára kedvező gyulladásos és immunszuppresszív környezet alakul ki^{163,164}. Továbbá leírták, hogy a *ZG16B* a TLR-jelátvitelt aktiválva szelektíven képes Erk-irányú aktivációt és tumor progressziót támogató citokinek termelését előidézni, miközben gátolja a TLR-mediált NF- κ B választ, ezzel elősegítve az immunszuppressziót²²⁸. *In vivo* vizsgálatok alapján azt is leírták, hogy a *ZG16B* fokozza a myeloid eredetű szuppresszor sejtek felhalmozódását és funkcionális aktivitását hasnyálmirigy daganatokban¹⁶³. A *ZG16B* tumorsejtekre kifejtett hatásai között kiemelhető a migráció, invázió és metasztatikus potenciál fokozása, amely elsősorban a CXCR4 és fokális-adhézióhoz (FAK) kapcsolt útvonalak aktiválásának következményeként írhatók le²²⁸. A *ZG16B* több daganattípusban is megjelent, mint progresszióval összefüggő faktor. Colorectalis daganatban például kiderült, hogy a PAUF/*ZG16B* a sejtciklushoz és mitotikus funkciókhoz kapcsolódó folyamatokat, valamint a Wnt/ β -katenin útvonalat is befolyásolja¹⁶⁵. A *ZG16B*-vel kapcsolatos eddigi kutatások alapján a klinikai transzláció szempontjából kiemelhető a faktor prognosztikus biomarkerként való felhasználhatósága, mivel a *ZG16B* több adatbázis és integratív elemzés alapján többféle daganatban, például emlőtumorokban is gyakran emelkedett expressziót mutat. Ezt jól példázza, hogy emlőrákban normál szövethez képest emelkedett *ZG16B*-expressziót írtak le, ugyanakkor érdekes módon a

túlélési analízisben a magas expresszió kedvezőbb prognózissal volt társítható¹⁶⁸. További transzlációs irányt képezhet a *ZG16B* terápiás relevanciája. Hasnyálmirigy daganatban leírták, hogy a *ZG16B* gátlása fokozhatja a gemcitabinnal szembeni érzékenységet, ami arra utal, hogy a *ZG16B*-hez kapcsolt hatások a gyógyszerrezisztenciában is jelentős szerepet tölthetnek be²²⁹. A *ZG16B* szerepe ugyanakkor túlmutathat a klasszikus tumornövekedést és metasztázisképzést támogató funkciókon is. Kimutatták ugyanis, hogy a tumor által szekretált, keringő *ZG16B* cachexiát képes előidézni egérmodellekben, tehát a PAUF a szisztémás daganat-asszociált szövődmények egyik fontos mediátora is lehet²³⁰. Összességében a *ZG16B* tumorbiológiai szerepét több daganattípusban már részletesen feltárták, ugyanakkor ezek a munkák döntően a daganatprogresszió kulcslépéseire fókuszáltak, így a proliferáció, invázió, áttétképzés, angiogenezis, immunmikrokörnyezet formálása és terápiás rezisztencia összefüggéseiben értelmezték a faktor jelentőségét.

Ezzel szemben lényegesen kevesebb adat áll rendelkezésre arról, hogy a *ZG16B* milyen szerepet tölthet be a daganat-iniciáció korai eseményeiben, illetve abban, hogy normál szöveti kontextusban miként befolyásolja a sejtek működését. Különösen az emlőszövetben szembetűnő ez a hiány, mert a rendelkezésre álló publikációk jellemzően a tumorszövetben megfigyelt fokozott expressziót és ennek lehetséges biomarker vonatkozásait írják le, miközben eddig elmaradt a *ZG16B* funkcionális karakterizálása nem transzformált és emlőtumorsejtekben¹⁶⁸. Ennek megfelelően indokolt lehet a *ZG16B* autokrin és parakrin hatásainak mechanisztikus feltérképezése a normál emlőszövetben és emlőtumorkban.

5.12 A *ZG16B* szekretált faktor funkcionális validálása és proliferációra gyakorolt hatása emlősejtekben

A *ZG16B* funkcionális vizsgálatához PCR-alapú klónozással és restrikciós emésztést követő ligálással hoztunk létre egy expressziós vektort, amelyet HEK293 sejtekbe transzfektáltunk. A HEK293 sejtvonalat host-rendszerként azért választottuk, mert normál körülmények között ezek a sejtek nem expresszálják a *ZG16B*-t, így a transzfekciót követően megjelenő fehérje egyértelműen az általunk sejtekbe transzfektált vektor eredménye. Az expressziós rendszer további előnye, hogy a vektor tervezésekor az EGFP koexpresszióját is biztosítottuk, ami lehetővé tette a transzfekciós hatékonyság folyamatos monitorozását. Ugyanakkor a *ZG16B* szekrécióját irányító szignál-peptid a transzláció során a szignál-peptidáz hatására lehasadt az EGFP-val együtt, így a szekretált *ZG16B* natív formában került az extracelluláris térbe. A

további kísérleteinkben figyelembe véve a szekretált *ZG16B* 16 kDa méretét, a transzfektált HEK293 sejtek kondicionált felülúszóit méretkizárásos szűrés segítségével koncentráltuk, megszabadulva így számos egyéb felülúszóban jelen lévő kisebb vagy nagyobb méretű szekretált faktortól.

A létrehozott expressziós rendszer által termeltetett *ZG16B*-t ezután normál és emlőtumor sejtek kezelésére használtuk, elsőként proliferációs assay-kben. Megállapítottuk, hogy a fehérje képes volt elősegíteni a normál sejtek és az ER⁺ tumorsejtek proliferációját. Azt, hogy ez valóban a fehérjének köszönhető - nem más egyéb hasonló méretű faktornak - *ZG16B* ellenes antitest hozzáadásával igazoltuk, mely hatékonyan visszaszorította a faktor proliferációt stimuláló hatását. Ugyanakkor azt is igazoltuk, hogy a *ZG16B* szuppressziójának kulcsszerepe van a bexarotene és carvedilol antiproliferatív hatásában, ugyanis normál emlő epithel sejtekben *ZG16B* kezeléssel képesek voltunk részben kompenzálni az őt szuppresszálo szinergikus kombináció antiproliferatív hatását. Érdekes módon, tripla negatív emlőtumorsejtek esetén a *ZG16B* nem tudta fokozni a sejtsztódást, tehát ezen eredmények arra utalnak, hogy a *ZG16B* faktor proliferációt befolyásoló szerepe elsősorban a korai, könnyebben szabályozható állapotokban releváns.

5.13 A *ZG16B* migrációt fokozó hatásának jellemzése

A *ZG16B* leggyakrabban leírt funkcionális hatása a tumorsejtek mozgékonyságának fokozása, az inváziós kapacitás növelése és a metasztatikus terjedés támogatása^{161,228}. Ennek fényében, indokolt annak vizsgálata, hogy emlő epithel sejtekben és emlőtumorsejtekben milyen mértékben és milyen mechanizmusokon keresztül befolyásolja a *ZG16B* a sejtek migrációját. Eredményeink alapján a tapasztalt proliferációs válaszokkal ellentétben, hormonreceptor-státusztól függetlenül, összes vizsgált emlő eredetű sejtvonalban markáns migrációt fokozó hatást tapasztaltunk *ZG16B* hatására. Ugyanakkor a proliferációs adatokhoz hasonlóan a bexarotene és carvedilol hatására gátolt migrációt a *ZG16B* képes volt visszaállítani, mely azt jelzi, hogy a *ZG16B*-nek szerepe lehet a kemopreventív kombináció migrációt gátló hatásában. A szakirodalom alapján a *ZG16B* migrációt és inváziót fokozó hatása elsősorban a TLR-kapcsolt Erk 1/2 /MAPK jelátvitel aktivációjához, a CXCR4-mediált kemotaktikus válasz fokozásához, valamint a FAK-Src és *PI3K*/Akt útvonalak aktiválásához köthető^{228,231}. Ennek megfelelően a *ZG16B* hatásmechanizmusának feltárásához indokoltnak tartottuk az Erk 1/2, Src és Akt jelátviteli elemek phosphorylációs állapotának változásait feltérképezni *ZG16B*

hatására. Normál sejtek, ER pozitív- és tripla negatív emlőtumor sejtek esetén sejtvonalanként eltérő választ kaptunk az egyes jelátviteli elemek aktiválódása szempontjából. Az Akt fehérje fokozott aktiválódása mindhárom vizsgált sejtvonalon megfigyelhető volt, azonban az Erk fehérje aktiválódását csak normál sejteken és T47D sejteken tudtuk detektálni. Normál sejtek esetén az Src fehérje aktiválódását is ki tudtuk mutatni, amit a gátló hatású phosphoryláció (Y527) alóli felszabadulás jelzett. Ennek a differenciált válasznak egy része egybe esik a proliferációs és migrációs eredményekkel is, ugyanis mivel a *MAPK*-Erk útvonal elsősorban a mitogén funkciókat befolyásoló útvonal, így a tripla negatív tumorsejtekkel kapott eredmények támogatják a proliferációs adatokat, mely szerint ezeknek a sejteknek az osztódására a *ZG16B* nincs hatással. A három vizsgált jelátviteli elem közül egyedül az Akt fehérje aktiválódása mutatott olyan szintű egyezést, mely a migrációs eredményekből is kitűnt. Ezért következő lépésként azt vizsgáltuk meg, hogy a *PI3K* gátlása mellett a *ZG16B* képes-e ugyanúgy modulálni a migrációt. Azonban normál sejtekben és tripla negatív tumorsejtekben *PI3K* inhibitor (LY294002) jelenléte mellett a *ZG16B* nem tudta stimulálni a sejtek migrációját, illetve ezzel párhuzamosan az Akt phosphorylációját sem tudta indukálni. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy emlősejtekben a *ZG16B* által kiváltott fokozott migrációs válasz elsősorban a *PI3K*-Akt jelátviteli útvonalon keresztül megvalósuló jelátvitel következménye.

5.14 A *ZG16B* által indukált extracelluláris mátrix-újraszerveződés jelentősége

Ahhoz, hogy szélesebb körben felmérhessük a *ZG16B* által kiváltott választ, RNS-szekvenálást hajtottunk végre kezelt HME-hTert sejteken, melyek eredményei jórészen megerősítették a korábbi kísérletekben tapasztalt fenotípusos válaszokat. A differenciáltan expresszált gének listájában számos olyan gén expressziója fokozódott, melyek a fokális adhézió kialakításában, a *PI3K*-Akt jelátviteli útvonal működésében, és az aktin-citoszkeleton szabályozásában töltenek be kulcsszerepet. Ezek az eredmények megerősítik azokat az eredményeinket, amivel rámutattunk a *ZG16B* *PI3K*-Akt útvonalon keresztül megvalósuló migrációt fokozó hatására normál emlő epithel sejtekben. Ezen kívül megfigyeltük, hogy fokozódott számos olyan gén kifejeződése, melyek az ECM által közvetített jelek feldolgozásában töltenek be jelentős szerepet. Az általunk tapasztalt transzkriptomikai változásokhoz nagyon hasonlóan, hasnyálmirigy-daganatsejtekben a *ZG16B* expressziójának fokozása több, a tumorprogresszióhoz és metasztázisképzéshez kapcsolódó gén, köztük az *ICAM1*, *EGFR*,

HDAC3, *MAP3K8*, *CDK6*, *PALLD*, *ITGAV* és *CXCR4* indukciójával, valamint az MMP2 és MMP9 expressziójának emelkedésével járt együtt²²⁸. Ezekkel párhuzamosan a β -katenin jelátvitel aktivációját és a β -katenin-függő transzkripciós program fokozódását is leírták, ami egy összehangolt, migrációt, inváziót és proliferációt támogató génexpressziós átrendeződésre utal¹⁶⁰.

Mivel korábbi eredményeinkben a bexarotene és carvedilol kombinációja által kiváltott antiproliferatív és migrációt gátló hatást a *ZG16B* hozzáadása képes volt kompenzálni, ezért megvizsgáltuk, hogy a kétféle kezelés által kialakított transzkripciós profilok mennyiben fednek át egymással. Ahogy az várható volt, találtunk olyan géneket, melyek mindkét kezelés esetén azonos irányban szabályozódtak, tehát vagy szuppresszáldtak, vagy indukálódtak. Ez azt jelzi, hogy a bexarotene és carvedilol által kiváltott transzkripciós változások nem feleltethetők meg teljes mértékben a *ZG16B* szuppressziója következményeként. Ez elsősorban a rexinoidok pleiotróp, több egymással párhuzamos transzkripciós programot befolyásoló hatása miatt is lehetséges, mivel az RXR aktivációja révén a rexinoidok több nukleáris receptor útvonalat integrálnak, így sejttípus és kontextusfüggő módon eltérő génexpressziós változásokat képesek kiváltani⁵⁴. Ugyanakkor jelentős számú olyan gént is azonosítottunk, mely bexarotene és carvedilol kombinációja, valamint a *ZG16B* által ellentétes irányban szabályozódott. A bexarotene és carvedilol kombinációja által indukált és *ZG16B* által szuppresszált gének halmazainak metszete nagyságrendileg kevesebb gént tartalmazott, továbbá ezek jelentős része a dezoxiribonukleáz aktivitás negatív irányú szabályozásának irányába mutatott. A dezoxiribonukleáz aktivitás szabályozásához kapcsolódó gének megjelenése arra utal, hogy a bexarotene és carvedilol kombinált kezelése a sejtekben a genom- és kromatin-integritás védelmét elősegítő változások is indukálódnak mely fakadhat például a SWI/SNF komplex modulációjából, melynek jelentős szerepe van a DNS-hibajavításban is²³². A *ZG16B* hatásának vonatkozásában eddig még nem írtak le olyan irányú változásokat melyek ezen folyamatokat érintenék, azonban a transzkripciós adatok arra utalnak, hogy ez a szekretált faktor képes ezen folyamatok inaktivációjára.

Azon gének között, melyek *ZG16B* által stimuláltak ugyanakkor bexarotene és carvedilol kombinációja által szuppresszáltak számos olyan gén emelkedett ki, melyek az extracelluláris mátrix átrendezésében, a sejt-ECM közötti kapcsolatok kialakításában, adhézis és migrációs képességek befolyásolásában töltenek be kulcsszerepet. A *FNI* (fibronectin 1) fokozott

expressziója különösen jelentős, mivel a *FNI* kulcsszerepet játszik az integrineken keresztüli sejt-adhézióban, a migráció során szükséges ideiglenes adhéziós komplexek kialakításában, a stromális mátrix denzitásának meghatározásában és expressziója számos daganattípusban összefüggést mutat az invazív fenotípussal^{233,234}. Ehhez szorosan kapcsolódik a *PLEC* (plectin) emelkedett szintje, amely a citoszkeletális elemek és az adhéziós struktúrák összekapcsolásán keresztül mechanikai stabilitást és dinamikus alkalmazkodóképességet biztosít a migráló sejtek számára²³⁵. A bazális membrán összetételének átalakulására utal a *LAMA3* és *LAMA5* laminin alegységek fokozott expressziója. A laminin hálózat szerkezetének befolyásolásán keresztül szintén befolyásolható a sejtek polaritása, tapadása és irányított mozgása, továbbá a hálózat szerkezete prognosztikus és prediktív jelentőséggel bírhat daganatokban²³⁶. A kollagénmátrix szerkezetének módosulását jelzi a *COL5A1* fokozott kifejeződése, amely a kollagénrostok szervezésében vesz részt, és ismerten hozzájárulhat a mátrix merevségének és topológiájának olyan irányú változásaihoz, amelyek elősegítik a sejt migrációt²³⁷. Ezekkel párhuzamosan több, a sejt-ECM kapcsolatokat közvetlenül moduláló komponens emelkedett expressziója is megfigyelhető, ami arra utal, hogy a *ZG16B* nem egyetlen ECM-elem vagy adhéziós fehérje szintjét növeli meg izoláltan, hanem egy komplex, strukturálisan és funkcionálisan összehangolt mátriszóma átalakulást indít el.

Az emlődaganatok mikrokörnyezetében a mátriszóma átfogó újraszerveződése alapvetően meghatározza a daganatos szövet fizikai tulajdonságait és a sejtek viselkedését. A daganatképződés során az extracelluláris mátrix összetétele és szerkezete jelentősen átalakul, amely fokozott kollagén-, fibronectin- és proteoglikán-depozícióban, a rostok megvastagodásában, keresztkötéseik növekedésében és a mátrix topográfiájának rendezettebbé válásában nyilvánul meg^{238,239}. Ezek a változások a szövet merevségének progresszív növekedéséhez vezetnek, miközben a mátrix dinamikus lebontása és újraépítése inváziót elősegítő struktúrákat és migrációs útvonalakat hozhat létre. A megváltozott extracelluláris mátrix nem csupán biokémiai, hanem biomechanikai következményekkel is jár, amelyek közé tartozik a szilárd komponensek által kifejtett stressz fokozódása és az intersticiális folyadéknyomás emelkedése²⁴⁰. A növekvő szöveti nyomás kompressziót gyakorolhat az erekre és a környező struktúrákra, ami perfúziós zavarokat, hypoxiát és a terápiás ágensek csökkent szöveti hozzáférhetőségét eredményezheti, miközben a megváltozott mátrixarchitektúra önmagában is fizikai akadályt képezhet a molekuláris transzport számára.

Ezzel párhuzamosan a sejtek a megváltozott mechanikai környezetet aktívan érzékelik és jelátviteli válaszokká fordítják le, mivel a fokozott merevség és feszülés integrin-mediált tapadások, fókuszadhéziók és citoszkéletális kontraktilitás kialakulásához vezet, amelyek proliferációt, túlélést és invazív fenotípust támogató jelátviteli útvonalakat aktiválhatnak²⁴⁰. Ezen mechanoszenzitív válaszok révén a fizikai mikrokörnyezet nem passzív következménye, hanem aktív szabályozója a daganatsejtek biológiájának. Vizsgálatainkhoz illeszkedően különösen fontos hangsúlyozni, hogy a *ZG16B* hatására a fokozott extracelluláris mátrix komponens depozíció normál emlő epithel sejtekben indul meg, ami arra utal, hogy a *ZG16B* már nem malignus környezetben is képes a stromális és mechanikai mikrokörnyezet áthangolására. Ez a megfigyelés azt a koncepciót erősíti, hogy a *ZG16B* által indukált mátrixátalakítás a szövet merevségének és feszültségi állapotának korai megváltoztatásán keresztül hozzájárulhat olyan mechanoszenzitív jelátviteli programok aktiválásához, amelyek később a tumorprogresszió és az invazív viselkedés kialakulását is elősegíthetik.

5.15 *ZG16B* hatására EMT indukálódik, és fokozódik az emlőtumorsejtek transzformáltsága

Az extracelluláris mátrix struktúrájának, és biomechanikai sajátosságainak megváltozása gyakran együtt jár az epitheliális és mesenchymális jellegek közötti egyensúly eltolódásával, amely a daganatprogresszió során jól körülhatárolható, EMT-ként leírt folyamat formájában jelenik meg.²⁴¹ Bár az EMT-t klasszikusan a TGF- β jelátviteli útvonalhoz kötik, számos további jelátviteli mechanizmus is képes annak indukciójára. Fontos azonban kiemelni, hogy nem transzformált, normál epithel sejtekben az EMT esetenként fiziológiás, reverzibilis módon is előfordulhat. Például a sebgyógyulás során is megfigyelhető, ahol az epithel sejtek átmeneti plaszticitása elengedhetetlen a sebzáródás hatékony lezajlásához¹⁷⁵. Mivel a *ZG16B* hatására nem csak a mátriszóma és az adhézis kapcsolatok újraszerveződése volt megfigyelhető, hanem több mesenchymális marker, köztük a *FNI* fokozott expressziója is, ezért következő lépésként megvizsgáltuk a *ZG16B* EMT-re gyakorolt hatását normál emlő epithel és emlőtumor sejtekben. Az eredmények alapján a *ZG16B* hatására EMT irányába mutató transzkripciós változások voltak detektálhatók mind az epitheliális, mind a mesenchymális marker gének expressziójában. Hasonló mintázat volt megfigyelhető nem transzformált emlő epithel sejtekben is, ahol a mesenchymális markerek fokozott expressziója mellett a morfológiai átalakulás szintén a mesenchymális fenotípus irányába történő elmozdulást jelezte *ZG16B*

jelenlétében. Továbbá, MMTV-*ERBB2* transzgén egérmodell normál emlőszöveiteinek vizsgálata során a bexarotene és carvedilol kombinációjának hatására bekövetkező *ZG16B* szint csökkenés mellett, a *FN1* mesenchymális marker expressziója is mérsékeltebb volt.

Korábbi vizsgálatok rámutattak, hogy az EMT kialakulása és a mátriszóma átszerveződése kedvezhet a konvencionális kemoterápiás szerekkel szembeni rezisztencia kialakulásának^{242,243}. Tekintettel arra, hogy a *ZG16B* az EMT-t és a mátriszóma újraszerveződését egyaránt képes befolyásolni, potenciális biomarkerként szolgálhat az invazív fenotípus predikciójára, valamint a terápiás rezisztencia kialakulásának előrejelzésére is. Ezt a felvetést támogatja az a publikált eredmény is, amely szerint a *ZG16B* szuppressziója hasnyálmirigy-daganatsejtekben fokozta a gemcitabine-kezeléssel szembeni érzékenységet²²⁹. A *ZG16B* általunk feltárt funkcióit ezen szakirodalmi adatokkal összevetve felmerülhet annak feltárása, hogy a *ZG16B* szuppresszálasából származó szenzitizáló hatás fakadhat-e a *ZG16B* által indukált EMT-folyamatokból vagy a mátrix szabályozásból.

Az EMT kialakulásának és a mátriszóma újraszervezésének képessége arra utal, hogy transzformált tumorsejtek esetén ilyen jellegű stimuláció mellett a sejtek fokozott adaptációs előnyre tehetnek szert olyan környezeti feltételek között, ahol a fiziológiás extracelluláris mátrixstruktúra vagy a megszokott kitapadási felület nem áll rendelkezésre. Az EMT-hez társuló sejtplaszticitás és az ECM-remodelling révén a daganatsejtek képessé válhatnak arra, hogy a környezetüket részben újradefiniálják, illetve olyan túlélési útvonalakat aktiváljanak, amelyek függetlenítik őket a tapadásfüggő növekedéstől²⁴⁴. A soft agar colony forming assay egy klasszikus módszer ezen tulajdonság mérésére, mivel az inert, kitapadásra alkalmatlan agaróz mátrixban kizárólag a transzformált sejtek képesek hosszú távon életben maradni, proliferálni és így kolóniákat kialakítani.

Ezért megvizsgáltuk, hogy az agarózba ágyazott daganatsejtek kolóniaképző kapacitása miként változik *ZG16B* kezelést követően, illetve a *ZG16B*-t szuppresszáló bexarotene és carvedilol kombináció alkalmazása mellett. Eredményeink azt mutatták, hogy a bexarotene és carvedilol kombinált kezelés mind ösztrogénreceptor-pozitív, mind hormonreceptor-negatív emlőtumorsejtekben szignifikánsan csökkentette a kolóniaképző képességet, míg *ZG16B* jelenlétében ezzel ellentétes, kolóniaképzést stimuláló hatás volt megfigyelhető. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a *ZG16B* által indukált EMT- és mátriszóma-átalakítás nem csupán a migrációt és inváziót támogatja, hanem a kitapadástól független túlélést és proliferációt is

elősegítheti, ami az agresszív daganatsejtek egyik karakterisztikus tulajdonsága. Bár tumorsejtekben korábban nem vizsgáltuk a bexarotene és carvedilol kombináció *ZG16B* expresszióra kifejtett hatását, MCF7 ösztrogénreceptor-pozitív emlőtumor sejtek által képzett kolóniákban a kolóniaformálás gátlása mellett egyértelműen kimutatható volt a *ZG16B* expressziójának csökkenése is. Ezzel összhangban az MDA-MB-231 sejtvonallal kialakított *in vivo* egér (SCID) xenograft modellekből származó tumorszövetek immunhisztokémiai elemzése azt mutatta, hogy a *ZG16B* expressziója hormonreceptor-negatív emlőtumorsejtekben is hatékonyan csökkenthető bexarotene és carvedilol kombinált alkalmazásával. Ezen eredmények alapján a *ZG16B* szabályozása nem csak az emlődaganatok kialakulásának gátlásában, hanem a már kialakult emlőtumorsejtek progressziójának mérséklésében is potenciális terápiás jelentőséggel bírhat.

5.16 A doktori kutatás jelentősége, limitációi és lehetséges jövőbeli irányai

Jelen doktori kutatás eredményei összességében arra világítanak rá, hogy a monoamin GPCR-jelátvitel, különösen a 5-HT rendszer célzott modulációja, eddig alulértékelt, ugyanakkor biológiailag és transzlációs szempontból is releváns beavatkozási pontot jelent az emlőrák kemoprevenziójában és progressziójának befolyásolásában. Vizsgálataink során igazoltuk, hogy normál emlő epithel sejtekben a 5-HT antiproliferatív hatása elsősorban a sejtfelszíni receptorokon keresztül, dominánsan az 5-HT₇-adenilát-cikláz-PKA tengely aktivációján át valósul meg, miközben a sejtekbe jutó 5-HT mennyiségének csökkentése mérsékli az oxidatív stresszt és a DNS-károsodást. Több GPCR családot megvizsgálva egy olyan általános mintázat rajzolódott ki, amelyben a G_s-kapcsolt jelátvitel aktiválása, valamint a G_i- és G_q-kapcsolt útvonalak gátlása az epithel sejtek proliferációjának csökkentését idézi elő. Klinikai szempontból különösen jelentős, hogy a 5-HT jelátvitel farmakológiai modulációja jelenleg is klinikai használatban lévő SSRI-vel megvalósítható, és ezek kombinációja a rexinoid bexarotene-el szinergikusan antiproliferatív hatást eredményezett alacsony hatóanyag-dózisok alkalmazása mellett. A kombinációs stratégiák molekuláris hátterének feltárása során azonosítottuk a *ZG16B*-t mint központi, epigenetikailag szabályozott effektort, amelynek *ARID1A*-függő szuppressziója nem csak a proliferációt, hanem az EMT-hez, a mátriszóma-átalakuláshoz és a sejtmigrációhoz kapcsolódó motilis fenotípus kialakulását is gátolja normál emlő epithel és emlőtumor sejtekben. Eredményeink alapján a *ZG16B* egy új lehetséges prognosztikus biomarkerként emelhető ki emlődaganatban, mivel potenciálisan alkalmas lehet

a daganatok invazív viselkedésének és progressziós kockázatának előrejelzésére. Ezen kívül, a *ZG16B* direkt terápiás célpontot képezhet olyan megközelítések számára, amelyek a tumorprogressziót és az invazív fenotípus kialakulását kívánják mérsékelni. Mindezek alapján a 5-HT receptorok célzott modulációja, illetve a *ZG16B*-t moduláló rexinoid-alapú kombinációk olyan, klinikailag már elérhető hatóanyagokra épülő, hosszú távon is alkalmazható stratégiák alapját képezhetik, amelyek hormonreceptor-státusztól független útvonalak modulálásával járulhatnak hozzá az emlőrák kockázatának és agresszivitásának csökkentéséhez.

Az eredmények értelmezésekor ugyanakkor fontos elkülöníteni a kemopreventív és a már kialakult daganat progresszióját befolyásoló hatásokat. Jelen munkában kemopreventív jelentőségűnek azokat a megfigyeléseket tekintjük, amelyek normál emlőepithel sejtekben, illetve tumormentes emlőszövetben a malignus transzformációt megelőző folyamatok – így a proliferáció, a sejtes homeosztázis vagy a tumorpromotáló mikrokörnyezet kialakulásának – módosítására utalnak. Ezzel szemben a már transzformált emlőtumorsejteken végzett migrációs, EMT- és kolóniaformáló vizsgálatok, valamint a kialakított xenograft tumorok vizsgálata során kapott eredmények a tumorprogressziót befolyásoló, potenciálisan terápiás jelentőségű hatásokat modellezik.

Eredményeink értelmezése során azonban fontos figyelembe venni néhány módszertani és koncepcionális limitációt. A 5-HT intra- és extracelluláris hatásainak teljes körű, kvantitatív elkülönítése technikai okokból korlátozott volt, különösen a sejt kultúrák rendszerekben endogén módon jelen lévő 5-HT miatt. A 5-HT receptor izoformák hetero- és homodimerizációját, valamint az időfüggő receptor-dominancia váltás mechanizmusait nem tártuk fel részletesen, mivel az általunk tapasztalt, egységes irányba mutató, kanonikus jelátviteli válaszok alapján ezek vizsgálatát a kutatás keretein belül nem tartottuk indokoltnak. Az SSRI-k és egyéb GPCR-modulátorok hatásait elsősorban normál emlő epithel sejtekben elemeztük, ezért a tumorspecifikus, molekuláris altípusfüggő eltérések részletes feltérképezése további vizsgálatokat igényel. Az új kemopreventív megközelítések megalapozásához ugyanakkor a normál sejtekben tapasztalt válaszok feltérképezése képvisel nagyobb relevanciát, a jelentősen torzult szabályozással bíró tumorsejtek válaszainak vizsgálatához képest^{44,54}. A *ZG16B* funkcionális szerepének vizsgálata döntően sejtes és preklinikai modellekre támaszkodott, azonban az állatmodellekben végzett kísérleteink főként a

bexarotene és carvedilol hatásának tanulmányozására épültek. Jelen eredményeink fényében, további állatkísérletek végzésére mutatkozhat igény, mely alapvetően két további irányba mutathat: egyrészt a szerotoninerg stimuláció önmagában és rexinoidokkal való kombinációinak rákmegelőző hatásának vizsgálatára, másrészt a *ZG16B* emlőtumor iniciációban és progressziójában betöltött szerepének vizsgálatára lenne tervezhető további állatkísérletes munka.

Ezen limitációk ellenére a bemutatott eredmények számos új kutatási irányt nyitnak meg, amelyek potenciálisan a kutatómunka folytatásának és kiterjesztésének tekinthetők. Eddigi kutatásunk és a szakirodalom hiányosságai alapján indokoltta vált a 5-HT jelátvitel klinikai relevanciájának újraértékelése molekuláris altípusokra bontott emlőrák-betegcsoportokon, különös tekintettel a különböző SSRI-k alkalmazása és a tumorbiológiai kimenetel közötti összefüggésekre. A szerotoniláció és más intracelluláris 5-HT-mediált mechanizmusok feltárása új perspektívát nyithat a sejtes homeosztázis és a tumoriniciáció korai lépéseinek megértésében, továbbá fontos prediktív vagy prognosztikus biomarkerek azonosítására nyithat lehetőséget. A 5-HT laktációt követő involúcióban betöltött fiziológiás szerepe, valamint az a klinikai megfigyelés, hogy a szülés és szoptatás csökkenti az emlőrák kockázatát, felveti annak lehetőségét is, hogy a szerotoninerg jelátvitel farmakológiai modulációja kontrollált módon elősegítheti az epithelium megújulását, ami új, preventív szemléletű megközelítések fejlesztését vetheti fel. Transzlációs szempontból különösen ígéretes irányt képezhet egy személyre szabott, GPCR-expressziós profilra épülő kemoprevenziós kezelési panel kidolgozása, amely az egyéni jelátviteli sajátosságok figyelembevételével teszi lehetővé az optimálisan célozható útvonalak kiválasztását. A *ZG16B* további vizsgálata klinikai betegmintákban szükséges annak eldöntésére, hogy expressziója alkalmas-e prognosztikus biomarkerként a daganatok invazivitásának, EMT-állapotának vagy terápiás rezisztenciájának előrejelzésére, valamint, hogy direkt terápiás célpontként milyen mértékben járulhat hozzá a tumorprogresszió gátlásához. Végül a *ZG16B* által indukált mátriszóma-átalakulás és ECM-rigiditás változásainak komplexebb, biomechanikai vizsgálata lehetőséget nyújtana arra, hogy jobban megismerhessük az emlőtumorsejtek progressziója során újrászerveződő mátrix tulajdonságait és hatását. Ma már több olyan új generációs *in vitro* technológia áll rendelkezésre melyben a sejtek ko-kultúrák felállításban, integrált mikrofluidikás rendszerekkel és bioszenzorok segítségével teszik lehetővé az ilyen vizsgálatok elvégzését. Ezek előnye, hogy a valós idejű adatregisztráció

mellett a konvencionális sejt kultúrák modellekhez képest jóval fiziológiásabb környezetben teszik lehetővé akár a szekretált faktorok vagy egyéb farmakológiai kezelések hatásosságának és toxicitásának tesztelését, továbbá a mátrix tulajdonságainak finomhangolhatósága lehetővé teszi az eltérő típusú mátrixok sejtekre kifejtett hatásának vizsgálatát.

6. Összefoglalás - Magyar

Az emlőrák megelőzése és progressziójának gátlása továbbra is jelentős kihívást jelent, különösen a hormonreceptor-negatív emlőtumorsejtek esetén. A retinoid X receptor (*RXR*) agonisták hormon receptor-független kemopreventív stratégiát képviselnek, klinikai alkalmazásukat azonban dóziszfüggő mellékhatások korlátozzák. Ez indokoltá teszi olyan kombinációs megközelítések keresését, amelyek alacsonyabb hatóanyag-koncentrációk mellett is hatékony biológiai választ képesek kiváltani.

Jelen doktori munka központi hipotézise alapján, a monoamin jelátviteli útvonalak és a rexinoid jelátvitel kombinált modulációja új, eddig alulértékelt lehetőséget kínál az emlőrák kemoprevenciójában.

Vizsgálataink során igazoltuk, hogy a szerotonin (5-hydroxytryptamine - 5-HT) rendszer nem csupán a központi idegrendszerben, hanem normál emlő epithel sejtekben is funkcionális jelátviteli szereppel bír, és alapvetően befolyásolja a sejtek proliferációját. Eredményeink alapján a monoaminerg GPCR-jelátvitel iránya meghatározó a normál emlő epithel sejtek proliferatív válaszában. Kimutattuk, hogy a G_s -kapcsolt jelátviteli útvonalak aktiválása, valamint a G_i - és G_q -kapcsolt receptorok gátlása antiproliferatív hatást eredményez. A 5-HT által kiváltott hatásban kiemelt szerepet töltött be a *5-HT₇* receptor közvetítette jelátvitel.

A monoaminerg jelátvitel és a rexinoid kezelés közötti kölcsönhatások vizsgálata során igazoltuk, hogy a bexarotene és monoaminerg modulátorok (paroxetine vagy carvedilol) kombinációja normál emlő epithel sejtekben szinergikus antiproliferatív hatást fejt ki. A kombinációs megközelítés molekuláris hátterének feltárása során azonosítottuk a Zymogene Granule Protein 16B (*ZG16B*) gént, mint olyan közös célpontot, amelynek expressziója a rexinoid–monoaminerg kombinációk hatására szuppresszálódik.

A *ZG16B* funkcionális jellemzése során kimutattuk, hogy a fehérje normál emlő epithel és emlőtumor sejtekben egyaránt fokozza a proliferációt, a migrációt és a tumorsejtek

transzformációját. A *ZG16B* sejtmigrációt fokozó hatásának kialakulásához a *PI3K/Akt* jelátviteli útvonal aktivációja szükséges. Transzkriptomikai elemzések alapján a *ZG16B* az extracelluláris mátrix újraszerveződésében és az epitheliális–mesenchymális tranzíció (EMT) szabályozásában játszik meghatározó szerepet, amelyek a rexinoid–monoaminerg kombinált kezelés hatására szuppresszálódnak.

Összességében a doktori kutatás eredményei rámutatnak arra, hogy a monoaminerg GPCR-jelátvitel célzott modulációja, különösen a 5-HT rendszer bevonása, új és transzlációs szempontból releváns beavatkozási pontot jelent az emlőrák kemoprevenenciójában. A rexinoid és monoaminerg jelátvitel kombinált modulációja lehetőséget teremt alacsony dózisu, hosszú távon alkalmazható preventív stratégiák kidolgozására. A *ZG16B* azonosítása, mint epigenetikailag szabályozható, tumorprogressziót elősegítő szekretált faktor, új perspektívát nyithat biomarker-fejlesztési és célzott preventív megközelítések számára.

7. Összefoglalás – Angol (Summary)

The prevention of breast cancer and the inhibition of its progression remain significant challenges, particularly in the case of hormone receptor-negative breast tumors. Retinoid X receptor (*RXR*) agonists represent a hormone receptor-independent chemopreventive strategy. However, their clinical application is limited by dose-dependent adverse effects. This necessitates the development of combination approaches capable of eliciting effective biological responses at lower drug concentrations.

Based on the central hypothesis of the present doctoral research, the combined modulation of monoaminergic signaling pathways and rexinoid signaling represents a novel opportunity in breast cancer chemoprevention.

In our studies, we demonstrated that the serotonin signaling system is not only functional in the central nervous system but also plays an active signaling role in normal mammary epithelial cells, influencing cellular proliferation. Our results indicate that the directionality of monoaminergic GPCR signaling is a key determinant of the proliferative response in normal mammary epithelial cells. We showed that activation of G_s -coupled signaling pathways, as well as inhibition of G_i - and G_q -coupled receptors, results in antiproliferative effects. Among serotonin-mediated effects, signaling through the *5-HT₇* receptor plays a prominent role.

Investigating the interactions between monoaminergic signaling and rexinoid treatment, we demonstrated that the combination of bexarotene with monoaminergic modulators (paroxetine or carvedilol) exerts a synergistic antiproliferative effect in normal mammary epithelial cells. During the exploration of the molecular mechanisms underlying this synergistic effect, we identified the Zymogene Granule Protein 16B (*ZG16B*) gene as a common target, whose expression is suppressed by rexinoid–monoaminergic combinations.

Functional characterization of *ZG16B* revealed that the protein promotes proliferation, migration, and EMT in both normal mammary epithelial and breast tumor cells. Furthermore *ZG16B* treatment promoted tumorigenic transformation of breast cancer cells. The pro-migratory effect of *ZG16B* requires activation of the *PI3K*/Akt signaling pathway. Transcriptomic analyses further demonstrated that *ZG16B* plays a key role in extracellular matrix remodeling and in the regulation of epithelial–mesenchymal transition (EMT), both of which are suppressed by rexinoid–monoaminergic combination treatment.

Overall, these findings highlight that targeted modulation of monoaminergic GPCR signaling, particularly involving the 5-HT system, represents a novel and translationally relevant intervention point in breast cancer chemoprevention. The combined modulation of rexinoid and monoaminergic signaling offers the potential for developing low-dose, long-term preventive strategies. The identification of *ZG16B* as an epigenetically regulated, secreted factor promoting tumor progression opens new perspectives for biomarker development and targeted preventive approaches.

8. Irodalomjegyzék

1. Bray Bsc, F. *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J. Clin.* **74**, 229–263 (2024).
2. Saleem, M. *et al.* The BRCA1 and BRCA2 Genes in Early-Onset Breast Cancer Patients. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1292**, 1–12 (2020).
3. Clamp, A., Danson, S. & Clemons, M. Hormonal risk factors for breast cancer: Identification, chemoprevention, and other intervention strategies. *Lancet Oncology* **3**, 611–619 (2002).

4. Friedenreich, C. M., Ryder-Burbidge, C. & McNeil, J. Physical activity, obesity and sedentary behavior in cancer etiology: epidemiologic evidence and biologic mechanisms. *Mol. Oncol.* **15**, 790 (2020).
5. Romieu, I. *et al.* Alcohol intake and breast cancer in the European Prospective investigation into Cancer and Nutrition. *Int. J. Cancer* **137**, 1921 (2015).
6. Luo, J. *et al.* Association of active and passive smoking with risk of breast cancer among postmenopausal women: a prospective cohort study. *The BMJ* **342**, d1016 (2011).
7. Bodewes, F. T. H., van Asselt, A. A., Dorrius, M. D., Greuter, M. J. W. & de Bock, G. H. Mammographic breast density and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Breast* **66**, 62–68 (2022).
8. Cyr, A. E. & Kennard, K. Individualizing Breast Cancer Risk Assessment in Clinical Practice. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **32**, 647–661 (2023).
9. Harkness, E. F., Astley, S. M. & Evans, D. G. Risk-based breast cancer screening strategies in women. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **65**, 3–17 (2020).
10. Usher-Smith, J. A. *et al.* Proactive breast cancer risk assessment in primary care: a review based on the principles of screening. *Br. J. Cancer* **128**, 1636 (2023).
11. Stevanato, K. P. *et al.* Use and Applicability of the Gail Model to Calculate Breast Cancer Risk: A Scoping Review. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **23**, 1117–1123 (2022).
12. Kurian, A. W. *et al.* Performance of the IBIS/Tyrer-Cuzick model of breast cancer risk by race and ethnicity in the Women’s Health Initiative. *Cancer* **127**, 3742–3750 (2021).
13. Easton, D. F. *et al.* Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *New England Journal of Medicine* **372**, 2243–2257 (2015).
14. Ho, W. K. *et al.* Polygenic risk scores for prediction of breast cancer risk in Asian populations. *Genet. Med.* **24**, 586 (2021).
15. Dowsett, M. *et al.* Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 1656–1664 (2011).
16. Wang, Q. L. *et al.* Risk of estrogen receptor–specific breast cancer by family history of estrogen receptor subtypes and other cancers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* **115**, 1020 (2023).
17. Erler, J. T. *et al.* Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* **440**, 1222–1226 (2006).

18. Insua-Rodríguez, J. & Oskarsson, T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 41–55 (2016).
19. Ratajczak-Wielgomas, K. & Dziegiel, P. The role of periostin in neoplastic processes. *Folia Histochem. Cytobiol.* **53**, 120–132 (2015).
20. Li, W. *et al.* MicroRNA and cyclooxygenase-2 in breast cancer. *Clin. Chim. Acta* **522**, 36–44 (2021).
21. Wan, J. C. M. *et al.* Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA. *Nature Reviews Cancer* 2017 17:4 **17**, 223–238 (2017).
22. Ballestrero, A. *et al.* Effect of different cytokines on mammaglobin and maspin gene expression in normal leukocytes: possible relevance to the assays for the detection of micrometastatic breast cancer. *British Journal of Cancer* 2005 92:10 **92**, 1948–1952 (2005).
23. Monson, K. R. *et al.* Circulating growth factor concentrations and breast cancer risk: a nested case-control study of IGF-1, IGFBP-3, and breast cancer in a family-based cohort. *Breast Cancer Res.* **22**, 109 (2020).
24. Zheng, R. *et al.* Expression of ALDH1 and TGFβ2 in benign and malignant breast tumors and their prognostic implications. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 4173 (2014).
25. Hunter, A. Mammographic density: The risk and detection of breast cancer. *Journal of BioLaw and Business* **10**, 60–61 (2007).
26. Yala, A., Lehman, C., Schuster, T., Portnoi, T. & Barzilay, R. A Deep Learning Mammography-based Model for Improved Breast Cancer Risk Prediction. *Radiology* **292**, 60–66 (2019).
27. McKinney, S. M. *et al.* International evaluation of an AI system for breast cancer screening. *Nature* **577**, 89–94 (2020).
28. Khanna, N. N. *et al.* Economics of Artificial Intelligence in Healthcare: Diagnosis vs. Treatment. *Healthcare* **10**, 2493 (2022).
29. Logan, J., Kennedy, P. J. & Catchpoole, D. A review of the machine learning datasets in mammography, their adherence to the FAIR principles and the outlook for the future. *Sci. Data* **10**, (2023).
30. Sourlos, N. *et al.* Recommendations for the creation of benchmark datasets for reproducible artificial intelligence in radiology. *Insights Imaging* **15**, 248- (2024).

31. Lastrucci, A. *et al.* Transforming Breast Imaging: A Narrative Review of Systematic Evidence on Artificial Intelligence in Mammographic Practice. *Diagnostics* **15**, 2197 (2025).
32. Yasmin, A. *et al.* Emerging Biomarkers in Breast Cancer: Translational and Multi-Omics Perspectives in Precision Oncology. *Biomarkers* 1–43 (2025)
33. Tsang, J. Y. S. & Tse, G. M. Molecular Classification of Breast Cancer. *Adv. Anat. Pathol.* **27**, 27–35 (2020).
34. Orrantia-Borunda, E., Anchondo-Nuñez, P., Acuña-Aguilar, L. E., Gómez-Valles, F. O. & Ramírez-Valdespino, C. A. Subtypes of Breast Cancer. *Breast Cancer* 31–42 (2022)
35. Kensler, K. H. *et al.* PAM50 Molecular Intrinsic Subtypes in the Nurses' Health Study Cohorts. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **28**, 798 (2018).
36. Sporn, M. B. & Suh, N. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* **21**, 525–530 (2000).
37. Tsao, A. S., Kim, E. S., Waun, ; & Hong, K. Chemoprevention of Cancer. *CA Cancer J. Clin.* **54**, 150–180 (2004).
38. Gu, K. J. & Li, G. An Overview of Cancer Prevention: Chemoprevention and Immunoprevention. *J. Cancer Prev.* **25**, 127 (2020).
39. Bao, T., Prowell, T. & Stearns, V. Chemoprevention of breast cancer: tamoxifen, raloxifene, and beyond. *Am. J. Ther.* **13**, 337–348 (2006).
40. Chlebowski, R. T. Current concepts in breast cancer chemoprevention. *Pol. Arch. Med. Wewn.* **124**, 191–199 (2014).
41. Fisher, B. *et al.* Tamoxifen for Prevention of Breast Cancer: Report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **90**, 1371–1388 (1998).
42. Cuzick, J. *et al.* Use of anastrozole for breast cancer prevention (IBIS-II): long-term results of a randomised controlled trial. *The Lancet* **395**, 117–122 (2020).
43. Cuzick, J. Aromatase inhibitors for breast cancer prevention. *Journal of Clinical Oncology* **23**, 1636–1643 (2005).
44. Uray, I. P. & Brown, P. H. Chemoprevention of Hormone Receptor-Negative Breast Cancer: New Approaches Needed. *Recent Results Cancer Res.* **188**, 147 (2011).
45. Sarti, S. *et al.* Pharmacological Prevention in Breast Cancer: Current Evidence, Challenges, and Future Directions. *Cancers* 2025, Vol. 17, Page 3597 **17**, 3597 (2025).

46. Cazzaniga, M. & Bonanni, B. Breast Cancer Chemoprevention: Old and New Approaches. *Biomed Res. Int.* **2012**, 985620 (2012).
47. Litzenburger, B. C. & Brown, P. H. Advances in preventive therapy for estrogen-receptor-negative breast cancer. *Curr. Breast Cancer Rep.* **6**, 96–109 (2014).
48. Almansour, N. M. Triple-Negative Breast Cancer: A Brief Review About Epidemiology, Risk Factors, Signaling Pathways, Treatment and Role of Artificial Intelligence. *Front. Mol. Biosci.* **9**, 836417 (2022).
49. Carbine, N. E., Lostumbo, L., Wallace, J. & Ko, H. Risk-reducing mastectomy for the prevention of primary breast cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* **4**, (2018).
50. Zagami, P. & Carey, L. A. Triple negative breast cancer: Pitfalls and progress. *npj Breast Cancer* 2022 8:1 **8**, 95- (2022).
51. Simeone, A. M. & Tari, A. M. How retinoids regulate breast cancer cell proliferation and apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 1475–1484 (2004).
52. Veronesi, U. *et al.* Randomized Trial of Fenretinide to Prevent Second Breast Malignancy in Women With Early Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* **91**, 1847–1856 (1999).
53. Zanardi, S. *et al.* Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention. *Endocr. Relat. Cancer* **13**, 51–68 (2006).
54. Uray, I. P., Dmitrovsky, E. & Brown, P. H. Retinoids and rexinoids in cancer prevention: from laboratory to clinic. *Semin. Oncol.* **43**, 49–64 (2016).
55. Lefebvre, P., Benomar, Y. & Staels, B. Retinoid X receptors: common heterodimerization partners with distinct functions. *Trends Endocrinol. Metab.* **21**, 676–683 (2010).
56. Xu, R., Zhang, L., Pan, H. & Zhang, Y. Retinoid X receptor heterodimers in hepatic function: structural insights and therapeutic potential. *Front. Pharmacol.* **15**, 1464655 (2024).
57. Li, Y. *et al.* The rexinoid, bexarotene, prevents the development of premalignant lesions in MMTV-erbB2 mice. *British Journal of Cancer* 2008 98:8 **98**, 1380–1388 (2008).
58. Scarisbrick, J. J. *et al.* U.K. consensus statement on safe clinical prescribing of bexarotene for patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Br. J. Dermatol.* **168**, 192–200 (2013).

59. Liby, K. *et al.* The combination of the rexinoid, LG100268, and a selective estrogen receptor modulator, either arzoxifene or acolbifene, synergizes in the prevention and treatment of mammary tumors in an estrogen receptor-negative model of breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5902–5909 (2006).
60. Mazumdar, A. *et al.* The Combination of Tamoxifen and the Rexinoid LG100268 Prevents ER-Positive and ER-Negative Mammary Tumors in P53-Null Mammary Gland Mice. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **5**,
61. Parikh, N. R. *et al.* Oleanane triterpenoids in the prevention and therapy of breast cancer: current evidence and future perspectives. *Phytochem. Rev.* **13**, 793 (2014).
62. Bowen, C. M. *et al.* Combination of Sulindac and Bexarotene for Prevention of Intestinal Carcinogenesis in Familial Adenomatous Polyposis. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **14**, 851–862 (2021).
63. Melancon, K. *et al.* Regression of NMU-induced mammary tumors with the combination of melatonin and 9-cis-retinoic acid. *Cancer Lett.* **227**, 39–48 (2005).
64. Jdeed, S., Lengyel, M. & Uray, I. P. Redistribution of the SWI/SNF Complex Dictates Coordinated Transcriptional Control over Epithelial-Mesenchymal Transition of Normal Breast Cells through TGF- β Signaling. *Cells* **11**, (2022).
65. Jdeed, S., Erdős, E., Bálint, B. L. & Uray, I. P. The Role of ARID1A in the Nonestrogenic Modulation of IGF-1 Signaling. *Mol. Cancer Res.* **20**, 1071–1082 (2022).
66. carvedilol | Ligand Activity Charts | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY.
67. Wagner, L. & Kenreigh, C. Carvedilol. *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* 1–5 (2024)
68. Murnane, K. S. *et al.* The adrenergic receptor antagonist carvedilol interacts with serotonin 2A receptors both in vitro and in vivo. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **181**, 37 (2019).
69. Morales, P. *et al.* Progress on the development of Class A GPCR-biased ligands. *Br. J. Pharmacol.* **182**, 3249–3300 (2025).
70. McCorvy, J. D. & Roth, B. L. Structure and Function of Serotonin G protein Coupled Receptors. *Pharmacol. Ther.* **150**, 129 (2015).
71. Noda, M., Higashida, H., Aoki, S. & Wada, K. Multiple signal transduction pathways mediated by 5-HT receptors. *Mol. Neurobiol.* **29**, 31–39 (2004).
72. Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**, 512–517 (2005).

73. DeWire, S. M., Ahn, S., Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* **69**, 483–510 (2007).
74. Urban, J. D. *et al.* Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **320**, 1–13 (2007).
75. Kenakin, T. Functional selectivity and biased receptor signaling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **336**, 296–302 (2011).
76. Ben-Jonathan, N. & Hnasko, R. Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor. *Endocr. Rev.* **22**, 724–763 (2001).
77. Medina, V. *et al.* Histamine-mediated signaling processes in human malignant mammary cells. *Cancer Biol. Ther.* **5**, 1462–1471 (2006).
78. Sales, M. E. *et al.* Role of Muscarinic Acetylcholine Receptors in Breast Cancer: Design of Metronomic Chemotherapy. *Curr. Clin. Pharmacol.* **14**, 91 (2019).
79. Español, A., Jacob, G., Dmytrenko, G. & Sales, M. Muscarinic activation enhances the anti-proliferative effect of paclitaxel in murine breast tumor cells. *Anticancer Agents Med. Chem.* **13**, 1273–1279 (2013).
80. Español, A., Salem, A., Sanchez, Y. & Sales, M. E. Breast cancer: Muscarinic receptors as new targets for tumor therapy. *World J. Clin. Oncol.* **12**, 404 (2021).
81. Gargiulo, L. *et al.* Differential β 2-adrenergic receptor expression defines the phenotype of non-tumorigenic and malignant human breast cell lines. *Oncotarget* **5**, 10058 (2014).
82. Pérez Piñero, C., Bruzzzone, A., Sarappa, M. G., Castillo, L. F. & Lüthy, I. A. Involvement of α 2- and β 2-adrenoceptors on breast cancer cell proliferation and tumour growth regulation. *Br. J. Pharmacol.* **166**, 721 (2012).
83. Løfling, L. L. *et al.* β -blockers and breast cancer survival by molecular subtypes: a population-based cohort study and meta-analysis. *British Journal of Cancer* **2022** 127:6 **127**, 1086–1096 (2022).
84. Strell, C. *et al.* Use of beta-blockers in patients with ductal carcinoma in situ and risk of invasive breast cancer recurrence: a Swedish retrospective cohort study. *Breast Cancer Res. Treat.* **207**, 293–299 (2024).
85. Matthes, S. & Bader, M. Peripheral Serotonin Synthesis as a New Drug Target. *Trends Pharmacol. Sci.* **39**, 560–572 (2018).
86. Berger, M., Gray, J. A. & Roth, B. L. The expanded biology of serotonin. *Annu. Rev. Med.* **60**, 355–366 (2009).

87. Horseman, N. D. & Collier, R. J. Serotonin: A local regulator in the mammary gland epithelium. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2**, 353–374 (2014).
88. Marshall, A. M., Hernandez, L. L. & Horseman, N. D. Serotonin and serotonin transport in the regulation of lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **19**, 139–146 (2014).
89. Stull, M. A. *et al.* Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16708 (2007).
90. Daws, L. C. Unfaithful neurotransmitter transporters: focus on serotonin uptake and implications for antidepressant efficacy. *Pharmacol. Ther.* **121**, 89–99 (2009).
91. Duan, H. & Wang, J. Selective transport of monoamine neurotransmitters by human plasma membrane monoamine transporter and organic cation transporter 3. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **335**, 743–753 (2010).
92. Li, R. W. S. *et al.* Involvement of organic cation transporter-3 and plasma membrane monoamine transporter in serotonin uptake in human brain vascular smooth muscle cells. *Front. Pharmacol.* **4 FEB**, 40722 (2013).
93. Muma, N. A. & Mi, Z. Serotonylation and Transamidation of Other Monoamines. *ACS Chem. Neurosci.* **6**, 961–969 (2015).
94. Walther, D. J. *et al.* Serotonylation of Small GTPases Is a Signal Transduction Pathway that Triggers Platelet α -Granule Release. *Cell* **115**, 851–862 (2003).
95. Bader, M. Serotonylation: Serotonin Signaling and Epigenetics. *Front. Mol. Neurosci.* **12**, 499188 (2019).
96. Hoyer, D., Hannon, J. P. & Martin, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **71**, 533–554 (2002).
97. 5-Hydroxytryptamine receptors | G protein-coupled receptors | IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY.
98. Theriot, J., Wermuth, H. R. & Ashurst, J. V. Antiemetics, Selective 5-HT₃ Antagonists. *StatPearls* (2024).
99. Manabe, N., Wong, B. S. & Camilleri, M. New-generation 5-HT₄ receptor agonists: potential for treatment of gastrointestinal motility disorders. *Expert Opin. Investig. Drugs* **19**, 765–775 (2010).
100. Gaitonde, S. A. *et al.* Pharmacological fingerprint of antipsychotic drugs at the serotonin 5-HT_{2A} receptor. *Molecular Psychiatry* 2024 29:9 **29**, 2753–2764 (2024).

101. Price, A. E., Anastasio, N. C., Stutz, S. J., Hommel, J. D. & Cunningham, K. A. Serotonin 5-HT_{2C} Receptor Activation Suppresses Binge Intake and the Reinforcing and Motivational Properties of High-Fat Food. *Front. Pharmacol.* **9**, 821 (2018).
102. Field, S. L. *et al.* Amplifying local serotonin signaling prior to dry-off hastens mammary gland involution and redevelopment in dairy cows. *J. Dairy Sci.* **106**, 3719–3733 (2023).
103. Stull, M. A. *et al.* Mammary gland homeostasis employs serotonergic regulation of epithelial tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 16708 (2007).
104. Marshall, A. M., Hernandez, L. L. & Horseman, N. D. Serotonin and Serotonin Transport in the Regulation of Lactation. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **19**, 139–146 (2014).
105. Kumar, S., Das, A. & Sen, S. Extracellular matrix density promotes EMT by weakening cell-cell adhesions. *Mol. Biosyst.* **10**, 838–850 (2014).
106. Kaushik, S., Pickup, M. W. & Weaver, V. M. From transformation to metastasis: deconstructing the extracellular matrix in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **35**, 655–667 (2016).
107. Caputo, A. *et al.* Spatial transcriptomics suggests that alterations occur in the preneoplastic breast microenvironment of BRCA1/2 mutation carriers. *Mol. Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-23-0489> (2023)
108. Schedin, P. & Keely, P. J. Mammary gland ECM remodeling, stiffness, and mechanosignaling in normal development and tumor progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 1–22 (2011).
109. Paavolainen, O. & Peuhu, E. Integrin-mediated adhesion and mechanosensing in the mammary gland. *Semin. Cell Dev. Biol.* **114**, 113–125 (2021).
110. Zhu, J., Xiong, G., Trinkle, C. & Xu, R. Integrated extracellular matrix signaling in mammary gland development and breast cancer progression. *Histol. Histopathol.* **29**, 1083 (2014).
111. Hynes, R. O. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687 (2002).
112. Fu, H. L. *et al.* Discoidin Domain Receptors: Unique Receptor Tyrosine Kinases in Collagen-mediated Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 7430–7437 (2013).
113. Berdiaki, A. *et al.* Extracellular Matrix Components and Mechanosensing Pathways in Health and Disease. *Biomolecules* **14**, 1186 (2024).

114. Schedin, P. & Keely, P. J. Mammary Gland ECM Remodeling, Stiffness, and Mechanosignaling in Normal Development and Tumor Progression. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a003228 (2011).
115. Provenzano, P. P. *et al.* Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* **4**, (2006).
116. Boyd, N. F. *et al.* Breast tissue composition and susceptibility to breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 1224–1237 (2010).
117. Levental, K. R. *et al.* Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* **139**, 891–906 (2009).
118. Acerbi, I. *et al.* Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integr. Biol. (Camb)*. **7**, 1120–1134 (2015).
119. Kalluri, R. & Zeisberg, M. Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 392–401 (2006).
120. Garamszegi, N., Garamszegi, S. P., Shehadeh, L. A. & Scully, S. P. Extracellular matrix-induced gene expression in human breast cancer cells. *Mol. Cancer Res.* **7**, 319–329 (2009).
121. Perou, C. M. *et al.* Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 9212–9217 (1999).
122. Maquart, F. X., Pasco, S., Ramont, L., Hornebeck, W. & Monboisse, J. C. An introduction to matrikines: Extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity - Implication in tumor invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **49**, 199–202 (2004).
123. Schor, S. L. & Schor, A. M. Tumour-stromal interactions: Phenotypic and genetic alterations in mammary stroma - implications for tumour progression. *Breast Cancer Research* **3**, 373 (2001).
124. Jain, R. Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. *Cancer Res.* (1987).
125. Brown, W. S. & Wendt, M. K. Integrin-mediated resistance to epidermal growth factor receptor-targeted therapy: an inflammatory situation. *Breast Cancer Res.* **16**, 1–3 (2014).
126. Hunter, A. Mammographic density: The risk and detection of breast cancer. *Journal of BioLaw and Business* **10**, 60–61 (2007).
127. Ellies, L. G. Collagen and fibronectin: threads linking obesity and breast cancer. *Ann. Transl. Med.* **4**, S50–S50 (2016).

128. Kuziel, G., Moore, B. N. & Arendt, L. M. Obesity and Fibrosis: Setting the Stage for Breast Cancer. *Cancers* 2023, Vol. 15, Page 2929 **15**, 2929 (2023).
129. Li, J. *et al.* Lysyl Oxidase (LOX) Family Proteins: Key Players in Breast Cancer Occurrence and Progression. *J. Cancer* **15**, 5230–5243 (2024).
130. Cetin, M. *et al.* A highly potent bi-thiazole inhibitor of LOX rewires collagen architecture and enhances chemoresponse in triple-negative breast cancer. *Cell Chem. Biol.* **31**, 1926-1941.e11 (2024).
131. Ferreira, S., Saraiva, N., Rijo, P. & Fernandes, A. S. LOXL2 Inhibitors and Breast Cancer Progression. *Antioxidants* 2021, Vol. 10, Page 312 **10**, 312 (2021).
132. Ren, F. *et al.* Overexpression of MMP Family Members Functions as Prognostic Biomarker for Breast Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* **10**, e0135544 (2015).
133. Li, H. C. *et al.* Prognostic value of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in patients with lymph node-negative breast carcinoma. *Breast Cancer Res. Treat.* **88**, 75–85 (2004).
134. Winer, A., Adams, S. & Mignatti, P. Matrix Metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy: Turning Past Failures into Future Successes. *Mol. Cancer Ther.* **17**, 1147 (2018).
135. He, Q. *et al.* Tumor microenvironment responsive drug delivery systems. *Asian J. Pharm. Sci.* **15**, 416 (2019).
136. Jin, Z., Al Amili, M. & Guo, S. Tumor Microenvironment-Responsive Drug Delivery Based on Polymeric Micelles for Precision Cancer Therapy: Strategies and Prospects. *Biomedicines* 2024, Vol. 12, Page 417 **12**, 417 (2024).
137. Infante, J. R. *et al.* Phase 1 trials of PEGylated recombinant human hyaluronidase PH20 in patients with advanced solid tumours. *British Journal of Cancer* 2018 **118**:2 **118**, 153–161 (2017).
138. Van Cutsem, E. *et al.* Randomized phase III trial of pegvorhyaluronidase alfa with nab-paclitaxel plus gemcitabine for patients with hyaluronan-high metastatic pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Clinical Oncology* **38**, 3185–3194 (2020).
139. Varani, J. *et al.* All-trans retinoic acid stimulates growth and extracellular matrix production in growth-inhibited cultured human skin fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* **94**, 717–723 (1990).

140. Zasada, M. & Budzisz, E. Retinoids: active molecules influencing skin structure formation in cosmetic and dermatological treatments. *Advances in Dermatology and Allergology/Postępy Dermatologii i Alergologii* **36**, 392 (2019).
141. JANSSEN DE LIMPENS, A. M. P. The local treatment of hypertrophic scars and keloids with topical retinoic acid. *British Journal of Dermatology* **103**, 319–323 (1980).
142. Kang, S., Fisher, G. J. & Voorhees, J. J. Photoaging and Topical Tretinoin: Therapy, Pathogenesis, and Prevention. *Arch. Dermatol.* **133**, 1280–1284 (1997).
143. Sadick, N., Pannu, S., Abidi, Z. & Arruda, S. Topical Treatments for Photoaged Skin. *J. Drugs Dermatol.* **22**, 867–873 (2023).
144. Zhou, T. B., Drummen, G. P. C. & Qin, Y. H. The Controversial Role of Retinoic Acid in Fibrotic Diseases: Analysis of Involved Signaling Pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 226 (2012).
145. Wang, L. *et al.* Effects of retinoic acid on the development of liver fibrosis produced by carbon tetrachloride in mice. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1772**, 66–71 (2007).
146. Xiao, W. *et al.* Retinoic Acid Ameliorates Pancreatic Fibrosis and Inhibits the Activation of Pancreatic Stellate Cells in Mice with Experimental Chronic Pancreatitis via Suppressing the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *PLoS One* **10**, e0141462 (2015).
147. Reich, L. A., Leal, A. S., Ellsworth, E. & Liby, K. T. The Novel RXR Agonist MSU-42011 Differentially Regulates Gene Expression in Mammary Tumors of MMTV-Neu Mice. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, (2023).
148. Kim, M. S. *et al.* Src is a novel potential off-target of RXR agonists, 9-cis-UAB30 and Targretin, in human breast cancer cells. *Mol. Carcinog.* **54**, 1596–1604 (2015).
149. Chaturvedi, S. *et al.* 5-HT₂ and 5-HT_{2B} antagonists attenuate pro-fibrotic phenotype in human adult dermal fibroblasts by blocking TGF- β 1 induced non-canonical signaling pathways including STAT3 : implications for fibrotic diseases like scleroderma. *Int. J. Rheum. Dis.* **21**, 2128–2138 (2018).
150. Creed, S. J. *et al.* β 2-adrenoceptor signaling regulates invadopodia formation to enhance tumor cell invasion. *Breast Cancer Res.* **17**, (2015).
151. Chang, A. *et al.* β 2-Adrenoceptors on tumor cells play a critical role in stress-enhanced metastasis in a mouse model of breast cancer. *Brain Behav. Immun.* **57**, 106–115 (2016).

152. Sood, A. K. *et al.* Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.* **12**, 369–375 (2006).
153. Işeri, Ö. D. *et al.* beta-Adrenoreceptor antagonists reduce cancer cell proliferation, invasion, and migration. *Pharm. Biol.* **52**, 1374–1381 (2014).
154. Kim, T. H. *et al.* β -adrenergic signaling modulates breast cancer cell mechanical behaviors through a RhoA-ROCK-myosin II axis. *iScience* **28**, 112676 (2025).
155. Kim, S. A. *et al.* Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF), a novel up-regulated secretory protein in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* **100**, 828–836 (2009).
156. Park, H. D. *et al.* Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor promotes metastasis by regulating TLR/CXCR4 activation. *Oncogene* **30**, 201–211 (2011).
157. Lee, Y. *et al.* PAUF functions in the metastasis of human pancreatic cancer cells and upregulates CXCR4 expression. *Oncogene* **29**, 56–67 (2010).
158. Kanagawa, M. *et al.* Crystal structures of human secretory proteins ZG16p and ZG16b reveal a Jacalin-related β -prism fold. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **404**, 201–205 (2011).
159. Lee, Y. *et al.* PAUF promotes adhesiveness of pancreatic cancer cells by modulating focal adhesion kinase. *Exp. Mol. Med.* **43**, 291–297 (2011).
160. Cho, I. R. *et al.* Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF) enhances the expression of β -catenin, leading to a rapid proliferation of pancreatic cells. *Exp. Mol. Med.* **43**, 82–90 (2011).
161. Youn, S. E. *et al.* PAUF Induces Migration of Human Pancreatic Cancer Cells Exclusively via the TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 11414 (2022).
162. Kim, S. J. *et al.* Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor, a novel endothelial activator, promotes angiogenesis and vascular permeability. *Oncogene* **32**, 3638–3647 (2012).
163. Song, J. *et al.* Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor (PAUF) enhances the accumulation and functional activity of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in pancreatic cancer. *Oncotarget* **7**, 51840 (2016).
164. Kim, Y. J. *et al.* Pancreatic Adenocarcinoma Up-Regulated Factor (PAUF) Transforms Human Monocytes into Alternative M2 Macrophages with Immunosuppressive Action. *Int. J. Mol. Sci.* **25**, (2024).

165. Escudero-Paniagua, B. *et al.* PAUF/ZG16B promotes colorectal cancer progression through alterations of the mitotic functions and the Wnt/ β -catenin pathway. *Carcinogenesis* **41**, 203–213 (2020).
166. Feliu, J. *et al.* PBP1510, a novel monoclonal antibody targeting pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF): Phase 1/2a monotherapy and combination with gemcitabine in patients with advanced/metastatic pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology* **42**, e16296–e16296 (2024).
167. King, D. *et al.* First-in-human phase 1/2a study of PBP1510 (anti-PAUF mAb) in advanced/metastatic pancreatic adenocarcinoma: Safety results from early combination cohorts. *Journal of Clinical Oncology* **43**, (2025).
168. Lu, H. *et al.* Identification of ZG16B as a prognostic biomarker in breast cancer. *Open Medicine* **16**, 1 (2020).
169. Castro, V. M. *et al.* Incident user cohort study of risk for gastrointestinal bleed and stroke in individuals with major depressive disorder treated with antidepressants. *BMJ Open* **2**, (2012).
170. Hyttel, J. Comparative pharmacology of selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs). *Nord. J. Psychiatry* **47**, 5–12 (1993).
171. Jdeed, S., Lengyel, M. & Uray, I. P. Redistribution of the SWI/SNF Complex Dictates Coordinated Transcriptional Control over Epithelial-Mesenchymal Transition of Normal Breast Cells through TGF- β Signaling. *Cells* **11**, (2022).
172. Uray, I. *et al.* Identifying Synergistic Interactions Between the REXINOID and Adrenergic Signaling Pathways. *The FASEB Journal* **29**, (2015).
173. Cho, J. H., Kim, S. A., Park, S. B., Kim, H. M. & Song, S. Y. Suppression of pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) increases the sensitivity of pancreatic cancer to gemcitabine and 5FU, and inhibits the formation of pancreatic cancer stem like cells. *Oncotarget* **8**, 76398–76407 (2017).
174. Hao, Y., Baker, D. & Dijke, P. Ten. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019).
175. Yao, W. *et al.* Epithelial-mesenchymal plasticity (EMP) in wound healing: Exploring EMT mechanisms, regulatory network, and therapeutic opportunities. *Heliyon* **10**, e34269 (2024).
176. Stowers, R. S. *et al.* Extracellular Matrix Stiffening Induces a Malignant Phenotypic Transition in Breast Epithelial Cells. *Cell. Mol. Bioeng.* **10**, 114–123 (2016).

177. Mancusi, R. & Monje, M. The neuroscience of cancer. *Nature* 2023 618:7965 **618**, 467–479 (2023).
178. Hanahan, D. & Monje, M. Cancer hallmarks intersect with neuroscience in the tumor microenvironment. *Cancer Cell* **41**, 573–580 (2023).
179. Wang, J. feng, Wang, M. chuan, Jiang, L. lei & Lin, N. ming. The neuroscience in breast cancer: Current insights and clinical opportunities. *Heliyon* **11**, e42293 (2025).
180. Li, D. *et al.* High nerve density in breast cancer is associated with poor patient outcome. *FASEB Bioadv.* **4**, 391 (2022).
181. Albitre, A., Reglero, C., González-Muñoz, T. & Penela, P. The stress connection in cancer: the adrenergic fuelling of breast tumors. *Curr. Opin. Physiol.* **36**, 100720 (2023).
182. Madden, K. S., Szpunar, M. J. & Brown, E. B. β -Adrenergic receptors (β -AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high β -AR-expressing breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res. Treat.* **130**, 747–758 (2011).
183. Fjæstad, K. Y. *et al.* β -adrenergic signaling blockade attenuates metastasis through activation of cytotoxic CD4 T cells. *Nature Communications* 2025 16:1 **16**, 10063- (2025).
184. Caparica, R. *et al.* Beta-blockers in early-stage breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *ESMO Open* **6**, (2021).
185. Zheng, G., Sundquist, J., Sundquist, K. & Ji, J. Beta-blockers use and risk of breast cancer in women with hypertension. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **30**, 965–973 (2021).
186. Sharma, A. E. *et al.* The Impact of Beta Blockers on Survival in Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers (Basel)*. **17**, (2025).
187. Scott, O. W., TinTin, S., Cavadino, A. & Elwood, J. M. Beta-blocker use and breast cancer outcomes: a meta-analysis. *Breast Cancer Research and Treatment* 2024 206:3 **206**, 443–463 (2024).
188. Løfling, L. L. *et al.* β -blockers and breast cancer survival by molecular subtypes: a population-based cohort study and meta-analysis. *British Journal of Cancer* 2022 127:6 **127**, 1086–1096 (2022).
189. Scott, O. W., Tin Tin, S. & Botteri, E. Beta blocker use and breast cancer survival by subtypes: A population-based cohort study. *The Breast* **81**, 104474 (2025).

190. Vita, G., Compri, B., Matcham, F., Barbui, C. & Ostuzzi, G. Antidepressants for the treatment of depression in people with cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* **3**, (2023).
191. Belagaje, S. R., Brahmabhatt, D. & Abramoff, B. A. Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *Ischemic Stroke Therapeutics: A Comprehensive Guide* 313–321 (2023)
192. Díaz-Santana, M. V. *et al.* Depression, antidepressant use, and breast cancer incidence in the Sister Study cohort. *Breast Cancer Research* 2025 27:1 **27**, 82- (2025).
193. Wernli, K. J., Hampton, J. M., Trentham-Dietz, A. & Newcomb, P. A. Antidepressant medication use and breast cancer risk. *Pharmacoepidemiol. Drug Saf.* **18**, 284 (2009).
194. Visser, A. K. D. *et al.* Measuring serotonin synthesis: from conventional methods to PET tracers and their (pre)clinical implications. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **38**, 576 (2010).
195. Dankoski, E. C. & Mark Wightman, R. Monitoring serotonin signaling on a subsecond time scale. *Front. Integr. Neurosci.* **7**, 50419 (2013).
196. Güell, A. G., Meadows, K. E., Unwin, P. R. & MacPherson, J. V. Trace voltammetric detection of serotonin at carbon electrodes: Comparison of glassy carbon, boron doped diamond and carbon nanotube network electrodes. *Physical Chemistry Chemical Physics* **12**, 10108–10114 (2010).
197. Landis-Piowar, K. R. & Iyer, N. R. Cancer Chemoprevention: Current State of the Art. *Cancer Growth Metastasis* **7**, CGM.S11288 (2014).
198. Strupp, C. *et al.* Increased Cell Proliferation as a Key Event in Chemical Carcinogenesis: Application in an Integrated Approach for the Testing and Assessment of Non-Genotoxic Carcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 13246 (2023).
199. Matsuda, M. *et al.* Serotonin regulates mammary gland development via an autocrine-paracrine loop. *Dev. Cell* **6**, 193–203 (2004).
200. Marshall, A. M. *et al.* Serotonin Transport and Metabolism in the Mammary Gland Modulates Secretory Activation and Involution. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **95**, 837 (2009).
201. Pai, V. P., Marshall, A. M., Hernandez, L. L., Buckley, A. R. & Horseman, N. D. Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. *Breast Cancer Res.* **11**, R81 (2009).

202. Gautam, J. *et al.* Tryptophan hydroxylase 1 and 5-HT₇ receptor preferentially expressed in triple-negative breast cancer promote cancer progression through autocrine serotonin signaling. *Molecular Cancer* 2016 15:1 **15**, 75- (2016).
203. Xie, Q. E. *et al.* Identification of Serotonin as a Predictive Marker for Breast Cancer Patients. *Int. J. Gen. Med.* **14**, 1939 (2021).
204. Yang, D. & Gouaux, E. Illumination of serotonin transporter mechanism and role of the allosteric site. *Sci. Adv.* **7**, eabl3857 (2021).
205. Aljanabi, R. *et al.* Monoamine Oxidase (MAO) as a Potential Target for Anticancer Drug Design and Development. *Molecules* **26**, 6019 (2021).
206. Sáez-Freire, M. del M. *et al.* The biological age linked to oxidative stress modifies breast cancer aggressiveness. *Free Radic. Biol. Med.* **120**, 133–146 (2018).
207. Maurya, P. K. *et al.* The role of oxidative and nitrosative stress in accelerated aging and major depressive disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **65**, 134–144 (2016).
208. Ahmadimanesh, M. *et al.* Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on DNA damage in patients with depression. *J. Psychopharmacol.* **33**, 1364–1376 (2019).
209. Jorgensen, A. *et al.* Systemic DNA and RNA damage from oxidation after serotonergic treatment of unipolar depression. *Translational Psychiatry* 2022 12:1 **12**, 204- (2022).
210. Luo, J. *et al.* SRC kinase-mediated signaling pathways and targeted therapies in breast cancer. *Breast Cancer Res.* **24**, (2022).
211. Panda, V. K. *et al.* Molecular Insights on Signaling Cascades in Breast Cancer: A Comprehensive Review. *Cancers* 2025, Vol. 17, **17**, (2025).
212. Sheehan, T. P., Neve, R. L., Duman, R. S. & Russell, D. S. Antidepressant effect of the calcium-activated tyrosine kinase Pyk2 in the lateral septum. *Biol. Psychiatry* **54**, 540–551 (2003).
213. Lione, A. M., Errico, M., Lin, S. L. & Cowen, D. S. Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and Akt by human serotonin 5-HT_{1B} receptors in transfected BE(2)-C neuroblastoma cells is inhibited by RGS4. *J. Neurochem.* **75**, 934–938 (2000).
214. Della Rocca, G. J. *et al.* Serotonin 5-HT_{1A} Receptor-mediated Erk Activation Requires Calcium/Calmodulin-dependent Receptor Endocytosis. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 4749–4753 (1999).
215. Hamed, O., Joshi, R., Michi, A. N., Kooi, C. & Giembycz, M. A. β 2-Adrenoceptor Agonists Promote Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Dephosphorylation in

- Human Airway Epithelial Cells by Canonical, cAMP-Driven Signaling Independently of β -Arrestin 2. *Mol. Pharmacol.* **100**, 388–406 (2021).
216. Pai, V. P., Marshall, A. M., Hernandez, L. L., Buckley, A. R. & Horseman, N. D. Altered serotonin physiology in human breast cancers favors paradoxical growth and cell survival. *Breast Cancer Res.* **11**, R81 (2009).
 217. Herrick-Davis, K. Functional Significance of Serotonin Receptor Dimerization. *Experimental brain research. Experimentelle Hirnforschung. Experimentation cerebrale* **230**, 375 (2013).
 218. Renner, U. *et al.* Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *J. Cell Sci.* **125**, 2486–2499 (2012).
 219. Zhan, D. *et al.* Integrative dissection of 5-hydroxytryptamine receptors-related signature in the prognosis and immune microenvironment of breast cancer. *Front. Oncol.* **13**, 1147189 (2023).
 220. Zhang, W. *et al.* Systematic Analysis of Neurotransmitter Receptors in Human Breast Cancer Reveals a Strong Association With Outcome and Uncovers HTR6 as a Survival-Associated Gene Potentially Regulating the Immune Microenvironment. *Front. Immunol.* **13**, 756928 (2022).
 221. Shamay, A., Pines, M., Waksman, M. & Gertler, A. Proliferation of bovine undifferentiated mammary epithelial cells in vitro is modulated by G-proteins. *Mol. Cell. Endocrinol.* **69**, 217–226 (1990).
 222. Lyu, C. *et al.* Targeting Gi/o protein–coupled receptor signaling blocks HER2-induced breast cancer development and enhances HER2-targeted therapy. *JCI Insight* **6**, (2021).
 223. Li, Y. *et al.* The rexinoid, bexarotene, prevents the development of premalignant lesions in MMTV-erbB2 mice. *Br. J. Cancer* **98**, 1380–1388 (2008).
 224. Kong, G. *et al.* The retinoid X receptor-selective retinoid, LGD1069, down-regulates cyclooxygenase-2 expression in human breast cells through transcription factor crosstalk: implications for molecular-based chemoprevention. *Cancer Res.* **65**, 3462–3469 (2005).
 225. Litzenburger, B. C. & Brown, P. H. Advances in preventive therapy for estrogen-receptor-negative breast cancer. *Curr. Breast Cancer Rep.* **6**, 96–109 (2014).

226. Hamada, T. *et al.* Long-term efficacy and safety of bexarotene for Japanese patients with cutaneous T-cell lymphoma: The results of a phase 2 study (B-1201). *J. Dermatol.* **46**, 557–563 (2019).
227. Thomas, P. S. *et al.* Phase I Dose Escalation Study of Topical Bexarotene in Women at High Risk for Breast Cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **16**, 47 (2023).
228. Park, H. D. *et al.* Pancreatic adenocarcinoma upregulated factor promotes metastasis by regulating TLR/CXCR4 activation. *Oncogene* **30**, 201–211 (2011).
229. Cho, J. H., Kim, S. A., Park, S. B., Kim, H. M. & Song, S. Y. Suppression of pancreatic adenocarcinoma upregulated factor (PAUF) increases the sensitivity of pancreatic cancer to gemcitabine and 5FU, and inhibits the formation of pancreatic cancer stem like cells. *Oncotarget* **8**, 76398–76407 (2017).
230. Yoo, W. *et al.* Pancreatic cancer induces muscle wasting by promoting the release of pancreatic adenocarcinoma upregulated factor. *Exp. Mol. Med.* **53**, 432 (2021).
231. Lee, Y. *et al.* PAUF promotes adhesiveness of pancreatic cancer cells by modulating focal adhesion kinase. *Exp. Mol. Med.* **43**, 291 (2011).
232. Harrod, A., Lane, K. A. & Downs, J. A. The role of the SWI/SNF chromatin remodelling complex in the response to DNA double strand breaks. *DNA Repair (Amst)*. **93**, (2020).
233. Wang, J. P. & Hielscher, A. Fibronectin: How Its Aberrant Expression in Tumors May Improve Therapeutic Targeting. *J. Cancer* **8**, 674–682 (2017).
234. Miéville, A. *et al.* Fibronectin Fibers Progressively Lose Their Tension in Invasive Human Breast Carcinoma while Being Tensed in DCIS and Healthy Breast Tissue. *Advanced Science* **12**, e04351 (2025).
235. Wang, W. *et al.* The Role of Plectin Dysregulation in Cancer: Recent Advances. *Molecules* 2025, Vol. 30, **30**, (2025).
236. Nonnast, E., Mira, E. & Mañes, S. The role of laminins in cancer pathobiology: a comprehensive review. *Journal of Translational Medicine* 2025 23:1 **23**, 83- (2025).
237. Li, X., Jin, Y. & Xue, J. Unveiling Collagen's Role in Breast Cancer: Insights into Expression Patterns, Functions and Clinical Implications. *Int. J. Gen. Med.* **17**, 1773 (2024).
238. Insua-Rodríguez, J. & Oskarsson, T. The extracellular matrix in breast cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **97**, 41–55 (2016).
239. Popova, N. V. & Jücker, M. The Functional Role of Extracellular Matrix Proteins in Cancer. *Cancers (Basel)*. **14**, (2022).

240. Schwartz, M. A. Integrins and Extracellular Matrix in Mechanotransduction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a005066 (2010).
241. Brandão-Costa, R. M. *et al.* Extracellular matrix derived from high metastatic human breast cancer triggers epithelial-mesenchymal transition in epithelial breast cancer cells through $\alpha\beta3$ integrin. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
242. Jiang, M. *et al.* EMT and cancer stem cells: Drivers of therapy resistance and promising therapeutic targets. *Drug Resistance Updates* **83**, 101276 (2025).
243. Smith, B. N. & Bhowmick, N. A. Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *J. Clin. Med.* **5**, 17 (2016).
244. Li, Y. *et al.* Invasion and metastasis in cancer: molecular insights and therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2025 10:1 **10**, 57- (2025).

9. Kulcsszavak - Magyar

Kemoprevenció, Rexinoid, Monoamin, 5-HT, Extracelluláris mátrix, G-fehérje kapcsolt receptorok, Emlőrák

10. Kulcsszavak – Angol (Keywords)

Chemoprevention, Rexinoid, Monoamine, 5-HT, Extracellular Matrix, G-protein coupled receptors, Breast Cancer

11. Támogatások és Köszönetnyilvánítás

A vizsgálatokat a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal K129218 számú pályázata támogatta (Dr. Uray Iván részére). A kutatást támogatta továbbá az Európai Szociális Alap GINOP-2.3.2-15-2016-00020 MolMedEx programja, a Debreceni Egyetem Tudományos Publikációs Programja, valamint a Debreceni Egyetem Tudományos Kutatási Hídpályázata (DETKA, ÁOK, Dr. Uray Iván részére). A munkát kiegészítő támogatásban részesítette a Debreceni Egyetem Klinikai Központja (Dr. Uray Iván részére, Dr. Árkosy Péter részére). A kutatások megvalósulását továbbá az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-21-3, illetve ÚNKP-23-3 II számú Új Nemzeti Kiválóság Programja támogatta a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap forrásából (Lengyel Máté részére).

Végezetül szeretnék köszönetet mondani szüleimnek, nagyszüleimnek és testvéreimnek a folyamatos támogatásért és biztatásért, amelyet tanulmányaim során végig megkaptam. Külön köszönöm páromnak a megértést, az érzelmi támaszt és a mindennapi segítséget, amely nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre.

Hálás vagyok témavezetőmnek, Dr. Uray Ivánnak, aki nemcsak a doktori fokozat megszerzésében nyújtott szakmai iránymutatást és támogatást, hanem gondolkodásmódom formálásában és kutatói szemléletem fejlődésében is meghatározó szerepet játszott.

Köszönettel tartozom társszerzőimnek a közös publikációk során nyújtott együttműködésért. Köszönöm az Debreceni Egyetem Genomikai és Proteomikai szolgáltató laboratóriumok munkatársainak a technikai és szakmai támogatást, különösen Dr. Póliska Szilárdnak az RNS-szekvenálásban nyújtott segítségéért és Prof. Dr. Csősz Évának és Dr. Kalló Gergőnek a tömegspektrometriás analízisekben nyújtott segítségéért. Hálás vagyok minden volt és jelenlegi kollégámnak és munkacsoport-tagnak az inspiráló szakmai közegért, az együttműködésért és a mindennapi közös munkáért.

Köszönöm a disszertáció bírálóinak az alapos, építő jellegű észrevételeket és javaslatokat, amelyek hozzájárultak a munka végső formájának kialakításához és szakmai színvonalának emeléséhez.

12. Függelék

12.1 Hivatalos publikációs lista



**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/63/2026.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Lengyel Máté
Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10077908

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Lengyel, M.**, Árkosy, P., Uray, I. P.: G protein subtype preference dictates paroxetine-enhanced serotonin receptor response in non-malignant breast epithelial cells.
Biochem. Pharmacol. 244, 1-16, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2025.117584>
IF: 5.6 (2024)
2. **Lengyel, M.**, Molnár, Á., Nagy, T., Jdeed, S., Garai, I., Horváth, Z., Uray, I. P.: Zymogen granule protein 16B (ZG16B) is a druggable epigenetic target to modulate the mammary extracellular matrix.
Cancer Sci. 116 (1), 81-94, 2025.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/cas.16382>
IF: 4.3 (2024)

További közlemények

3. Vaiciuleviciute, R., Alaburda, A., Uzielienė, I., Kistamás, K., **Lengyel, M.**, Dinnyés, A., Bergaud, C., Bernotiene, E.: Biomimetic electrospun scaffolds for engineered heart tissue: from design parameters to drug testing platforms.
Front. Bioeng. Biotechnol. 14, 1-26, 2026.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2026.1711698>
IF: 4.8 (2024)





**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

4. Jdeed, S., **Lengyel, M.**, Uray, I. P.: Redistribution of the SWI/SNF Complex Dictates Coordinated Transcriptional Control over Epithelial-Mesenchymal Transition of Normal Breast Cells through TGF-[béta] Signaling.
Cells. 11 (17), 1-15, 2022.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/cells11172633>
IF: 6

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 20,7

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

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

Debrecen, 2026.02.16.



12.2 Rövidítések jegyzéke

Rövidítés	Jelentés / kiírás
5-HT	5-hydroxytryptamine, szerotonin
5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} , 5-HT _{1E} , 5-HT _{1F}	5-HT ₁ receptor altípusok
5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} , 5-HT _{2C}	5-HT ₂ receptor altípusok
5-HT ₃	5-HT ₃ receptor, ligandkapuzott ioncsatorna
5-HT ₄	5-HT ₄ receptor
5-HT _{5A}	5-HT _{5A} receptor
5-HT ₆	5-HT ₆ receptor
5-HT ₇	5-HT ₇ receptor
7TM receptor	Hét transzmembrán doménnel rendelkező receptor
ACTB	β-aktin, háztartási gén
ADRB2	β2-adrenerg receptor
Akt	Protein kinase B jelátviteli fehérje
ALDH1	Aldehyde dehydrogenase 1
AMPA	α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
ANOVA	Analysis of variance, varianciaanalízis
APC/C	Anaphase-promoting complex/cyclosome
ARID1A	AT-rich interaction domain 1A
AT	Neutralizáló antitest
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BCA	Bicinchoninic acid fehérjekvantifikálási módszer
Bex	Bexarotene
Bex + Carv	Bexarotene és carvedilol kombinációja
BHQ	Black Hole Quencher
BRCA	Breast invasive carcinoma, TCGA emlődaganat adatszett
BRCA1/2	Breast cancer gene 1/2
BRG1	Brahma-related gene 1
BSA	Bovine serum albumin
BSA-TBST	Bovine serum albumin tartalmú Tris-buffered saline Tween puffer
BWA	Burrows-Wheeler Aligner
CaCN	Calcineurin
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
Carv	Carvedilol
CB17	CB17 egértörzs
CDDO-EA	2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid ethyl amide
CDDO-MA	2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid methyl amide
CDDO-Me	2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid methyl ester
CDH1	E-cadherin, cadherin 1
CDH2	N-cadherin, cadherin 2
cDNS	Komplementer DNS
CHEK2	Checkpoint kinase 2
ChIP	Chromatin immunoprecipitation, kromatin-immunprecipitáció
ChIP-qPCR	Chromatin immunoprecipitation quantitative PCR
ChIP-seq	Chromatin immunoprecipitation sequencing
CHRM1, CHRM2, CHRM3, CHRM4	Muszkáros acetilkolin receptor altípusok
COUP-TF	Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor
COX2	Cyclooxygenase 2
CREB1	cAMP response element-binding protein 1
Ct	Cycle threshold, ciklusküszöb

Rövidítés	Jelentés / kiírás
<i>CTGF</i>	Connective tissue growth factor
<i>CXCR4</i>	C-X-C chemokine receptor type 4
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DAG	Diacyl-glycerol
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DAT	Dopamine transporter
DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
<i>DDR1/2</i>	Discoidin domain receptor 1/2
DESeq2	RNA-seq differenciális expresszióelemzésre használt bioinformatikai csomag
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMSO-EtOH	Dimethyl sulfoxide és ethanol oldószerkeverék
DNBSEQ-G400	DNBSEQ-G400 szekvenálási platform
DNS	Dezoxiribonukleinsav
<i>DRD1, DRD2, DRD3, DRD5</i>	Dopamin receptor altípusok
ECM	Extracelluláris mátrix
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMT	Epitheliális-mesenchymális tranzíció
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements
ER	Ösztrogén receptor
<i>ERBB2</i>	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
Erk 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
ESR1	Estrogen receptor 1
EtOH	Ethanol
FAK	Focal adhesion kinase
FAM	6-carboxyfluorescein fluoreszcens jelölő
FDG	Fluorodeoxyglucose
FDR	False discovery rate
<i>FNI</i>	Fibronectin 1
<i>FoxQ1</i>	Forkhead box Q1
<i>FXR</i>	Farnesoid X receptor
G1/S	G1 és S sejtciklusfázis közötti átmenet
G2/M	G2 és M sejtciklusfázis közötti átmenet
Gi, Gq, Gs	G-fehérje alegységhez kapcsolt jelátviteli útvonalak
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory adatbázis
GO	Gene Ontology, génontológia
GPCR	G-fehérje-kapcsolt receptor
GRCh37/hg19	Humán referencia genomverzió
GSEA	Gene set enrichment analysis
GTP	Guanosine triphosphate
<i>HRH1-HRH4</i>	Hisztamin receptor altípusok
H3	Hisztón H3
<i>H3K27ac</i>	Hisztón H3 lizin 27 acetiláció
HBL-100	Humán emlő epithel sejtvonal
HCC1143	Humán tripla negatív emlőtumor sejtvonal
HEK293	Humán embrionális vesesejtvonal
HER2	Humán epidermális növekedési faktor receptor 2
HISAT2	Hierarchical indexing for spliced alignment of transcripts 2
HME-hTert	Immortalizált primer humán emlő hámsejtvonal
HOECHST	DNS-kötő fluoreszcens sejtmagfesték
HTRF	Homogeneous Time-Resolved Fluorescence

Rövidítés	Jelentés / kiírás
IBIS	International Breast Cancer Intervention Study, Tyrer-Cuzick modell
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration, félmaximális gátló koncentráció
<i>IGF-1</i>	Insulin-like growth factor 1
IGV	Integrative Genomics Viewer
IP	Immunprecipitáció
IP1	Inositol-monophosphate
IP3	Inositol trisphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Ki-67	Proliferációs marker fehérje
KLF4	Krüppel-like factor 4
<i>LOX</i>	Lysyl oxidase
<i>LOXL</i>	Lysyl oxidase-like enzimek
<i>LXR</i>	Liver X receptor
<i>MAO</i>	Monoamin-oxidáz
<i>MAOA</i>	Monoamin-oxidáz A
<i>MAPK</i>	Mitogen-activated protein kinase
MCF-10A	Humán emlő epithel sejtvonal
MCF7	ER-pozitív humán emlőtumor sejtvonal
MDA-MB-231	Tripla negatív humán emlőtumor sejtvonal
MDA-MB-468	Tripla negatív humán emlőtumor sejtvonal
MEBM	Mammary Epithelial Basal Medium
MEGM	Mammary Epithelial Cell Growth Media
MET	Mesenchymális-epitheliális tranzíció
MI	Mesterséges intelligencia
<i>MMP</i>	Mátrix metalloproteináz
<i>MMP-2, MMP-9</i>	Mátrix metalloproteináz 2 és 9
MMTV- <i>ERBB2</i>	Mouse mammary tumor virus promotor által vezérelt <i>ERBB2</i> transzgén egérmodell
MOR-1	Mu opioid receptor 1
mRNS	Messenger RNS, hírvivő RNS
MSigDB	Molecular Signatures Database
Na ₃ VO ₄	Nátrium-ortovanadát
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NET	Norepinephrine transporter
<i>NF-κB</i>	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
<i>NGFIB</i>	Nerve growth factor IB
<i>NMDA</i>	N-methyl-D-aspartate receptor
<i>NRF2</i>	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
<i>NURR1</i>	Nuclear receptor related 1 protein
<i>OCT1, OCT2, OCT3</i>	Organic cation transporter 1, 2 és 3
<i>PALB2</i>	Partner and localizer of BRCA2
PAUF	Pancreatic adenocarcinoma up-regulated factor
PBS	Phosphate-buffered saline
PC	Principal component, főkomponens
PC1, PC2	Első és második főkomponens
PCR	Polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PEI	Polyethylenimine
PET/NMR	Pozitronemissziós tomográfia és nukleáris mágneses rezonancia képalkotás
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase

Rövidítés	Jelentés / kiírás
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PLC β	Phospholipase C beta
<i>PMAT</i>	Plasma membrane monoamine transporter
<i>POSTN</i>	Periostin
<i>PPAR</i>	Peroxisome proliferator-activated receptor
PR	Progeszteron receptor
PRS	Polygenic risk score, sokgénés kockázati pontszám
PVDF	Polyvinylidene fluoride
<i>PXR</i>	Pregnane X receptor
qPCR	Quantitative PCR, kvantitatív PCR
<i>RAB</i>	RAB GTPáz fehérjecsalád
<i>RAC1</i> , <i>RAC2</i>	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 és 2
<i>RAR</i>	Retinoic acid receptor
RGB	Red-green-blue színcsatornák
RhoA, RHOB, RHOC, RHOG	Rho GTPáz fehérjék
RNS	Ribonukleinsav
<i>ROCK</i>	Rho-associated protein kinase
<i>ROR</i>	Retinoic acid receptor-related orphan receptor
ROS	Reaktív oxigéngyökök
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute 1640 tápfolyadék
RT-PCR	Reverse transcription PCR
RT-qPCR	Reverse transcription quantitative PCR
<i>RXR</i>	Retinoid X receptor
SCF	Skp, Cullin, F-box containing complex
SCID	Severe combined immunodeficiency
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Standard error of the mean, standard hiba
SERT	Serotonin transporter
si <i>ARID1A</i>	ARID1A-specifikus siRNS
siLUC	Luciferáz-specifikus kontroll siRNS
siRNS	Small interfering RNS
<i>SLC29A4</i>	Solute carrier family 29 member 4, PMAT génje
<i>SLC6A2</i>	Solute carrier family 6 member 2, NET génje
<i>SLC6A3</i>	Solute carrier family 6 member 3, DAT génje
<i>SLC6A4</i>	Solute carrier family 6 member 4, SERT génje
SNRI	Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitor
Src	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
SSRI	Selective serotonin reuptake inhibitor
<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3
SWI/SNF	Switch/sucrose non-fermentable kromatin-remodelláló komplex
SYBR Green	Cianin alapú fluoreszcens DNS-festék qPCR reakciókhoz
T47D	ER-pozitív humán emlőtumor sejtvonala
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TG2	Transzglutamináz 2
TGF- β	Transforming growth factor beta
<i>TGFBR2</i>	Transforming growth factor beta receptor 2
TLR	Toll-like receptor
<i>TLR4</i>	Toll-like receptor 4
<i>TP53</i>	Tumor protein p53
<i>TPH1</i>	Tryptophan hydroxylase 1
<i>TPH2</i>	Tryptophan hydroxylase 2

Rövidítés	Jelentés / kiírás
TR	Thyroid hormone receptor
TRIzol	Fenol és guanidinium-izotiocianát alapú RNS-izoláló reagens
UCSC	University of California, Santa Cruz
VDR	Vitamin D receptor
<i>VMAT2</i>	Vesicular monoamine transporter 2
Wnt	Wingless/Integrated jelátviteli útvonal
<i>YAP/TAZ</i>	Yes-associated protein / transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
<i>ZG16B</i>	Zymogen Granule Protein 16B
β-aktin	Háztartási fehérje, ACTB gén terméke
β-arresztin	GPCR-deszenzitizációban és alternatív jelátvitelben szereplő fehérje
β-catenin	Catenin beta 1 fehérje
β-tubulin	Tubulin beta fehérje, Western blot töltési kontroll
γH2AX	Foszforilált H2AX hiszton, kettős szálú DNS-törés marker