

**LINE-1 retrotranszpozonok a karcinogenezisben: A humán
méhnyak karcinogenezis vizsgálata és egy innovatív
transzgenikus egérmodell kifejlesztése a szomatikus LINE-1
aktivitás mérésére**

A Ph.D. disszertáció rövid összefoglalása

Dr. Karkas Réka

Témavezető: Mátés Lajos, Ph.D.



**HUN
REN**



Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola Szent-Györgyi Albert

Orvostudományi Kar

Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2025

PUBLIKÁCIÓK LISTÁJA

A PhD disszertáció alapjául szolgáló közlemények:

I. Karkas Réka, Khaloon Sadiq Ahmed Abdullah*, Kaizer László, Ürmös Ádám, Tiszlavicz Lilla, Pankotai Tibor, Nagy István, Mátés Lajos, Sükösd Farkas:
LINE-1 ORF1p is a Promising Biomarker in Cervical Intraepithelial Neoplasia Degree Assessment **International. Journal of Gynecological Pathology (2024)** DOI: 10.1097/PGP.0000000000001035 (Q2)

II. Kopasz Anna Georgina, Pusztai Dávid Zsolt, Karkas Réka, Hudoba Liza, Khaldoon Sadiq Ahmed Abdullah, Imre Gergely, Pankotai-Bodó Gabriella, Migh Ede, Nagy Andrea, Kriston András, Germán Péter, Bakné Drubi Andrea, Molnár Anna, Fekete Ildikó, Dani Éva Virág, Ocsovszki Imre, Puskás László Géza, Horváth Péter, Sükösd Farkas, Mátés Lajos. *A versatile transposon-based technology to generate loss- and gain-of-function phenotypes in the mouse liver* **BMC BIOLOGY (2022)** 20: 74, 17 p. DOI: 10.1186/s12915-022-01262-x (D1)

III. Mátés Lajos, Karkas Réka, Sadiq Ahmed Abdullah Khaldoon, Mátés-Nagy Andrea, Imre Gergely, Kopasz Anna Georgina, Fekete Ildikó, Horváth Péter, Sükösd Farkas
Measurement of somatic Ll retrotransposition activity
Szabadalom (2023) Nemzetközi bejelentés száma: PCT/HU2023/050014

A PhD képzés ideje alatt megjelent további publikációk:

IV. Imre Gergely, Takács Bertalan, Czipa Erik, Bakné Drubi Andrea, Jaksa Gábor, Latinovics Dóra, Nagy Andrea, Karkas Réka, Hudoba Liza, Vásárhelyi Márk Bálint, Pankotai-Bodó Gabriella, Blastyák András, Hegedűs Zoltán, Germán Péter, Bálint Balázs, Khaldoon Sadiq Ahmed Abdullah, Kopasz Anna Georgina, Kovács Anita, G. Nagy László, Sükösd Farkas, Mátés Lajos *Prolonged activity of the transposase helper may raise safety concerns during DNA transposon-based gene therapy.* **Molecular Therapy Methods Clin. Dev. (2023)** 29 pp. 145-159. , 15 p. DOI: 10.1016/j.omtm.2023.03.003 (Q1)

V. Mátés Lajos, Kopasz Anna Georgina, Karkas Réka, Khaloon Sadiq Ahmed Abdullah, Mátés-Nagy Andrea, Imre Gergely, Fekete Ildikó, Horváth Péter, Sükösd Farkas: *Versatile vector system for directed gene expression modifications*
Szabadalom (2023) Nemzetközi bejelentés száma: I: PCT/HU2023/050013

1 BEVEZETÉS

Az egykor "hulladék" (*junk*) DNS-nek tekintett transzpozábilis elemek (TE-k) jelentőségét sokáig igen alulértékelték. Magas kópiaszámuk és repetitív jellegük mai napig egyedülálló technikai kihívásokat jelent a vizsgálatuk során, hiszen az emberi genom közel felét (~45%-át) alkotják. A genomika technológiai fejlődésének és a humán mobilom iránti növekvő érdeklődésnek köszönhetően azonban jelentős szerepük igazolódott a genom evolúciójának, diverzitásának fenntartásában, valamint genetikai betegségek kóroki faktoraiként.

A LINE-1 retrotranszpozonok az egyetlen autonóm, máig aktív transzpozábilis elemek a humán genomban. Körülbelül 70 millió évvel ezelőtt kerültek az emlősök őseinek genomjába, és azóta sikeresen együtt fejlődtek velünk. Az általuk kódolt ORF1 RNS-kötő fehérje és az ORF2 endonukleáz és reverz-transzkriptáz fehérje nélkülözhetetlenek a "másolás és beillesztés" típusú transzpozíciós ciklusban. A LINE-1 elemek ma az emberi genom 17%-át teszik ki, összesen mintegy 500 000 kópiaszámmal, amelyek közül 100-150 jelenleg is képes retrotranszpozícióra. A LINE-1 retrotranszpozonok szerepet játszanak a genomikus evolúcióban, a különböző genomi lokuszokba történő beilleszkedésük elősegíti a genetikai diverzitást. Az új LINE-1 inszerciók megzavarhatják a génfunkciót, megváltoztathatják a génexpressziót, génduplikációk jöhetnek létre, exonok shuffling és az alternatív splicing, vagy akár nagyobb genomi átrendeződések alakulhatnak ki aktivitásuk révén. A csíravonal sejtekben történő retrotranszpozíciós események öröklődő genomi változásokat eredményezhetnek, hozzájárulva az evolúcióhoz. A szabályozatlan szomatikus retrotranszpozíció pedig genomi instabilitást eredményezhet, ami potenciálisan rákhoz vezethet. A genomi integritás fenntartása érdekében többféle védelmi mechanizmus szabályozza a LINE-1 aktivitását a transzpozíciós ciklus különböző szakaszaiban. Ha ezek a mechanizmusok sérülnek, a LINE-1 aktiváló tumor evolúciót indíthat el. A környezeti expozíciók, például gyógyszerek, UV sugárzás, vegyi anyagok károsíthatják ezeket a mechanizmusokat, ami a LINE-1 aktivációjához vezethet. Epidemiológiai vizsgálatok arra utalnak, hogy a környezeti tényezők jelentősebb szerepet játszanak a sporadikus rákos megbetegedésekben, mint a genetikai tényezők. E téma vizsgálata mindeddig jelentős nehézségekbe ütközött. A LINE-1 retrotranszpozíciós események detektálása mindmáig jelentős kihívást jelent. Különböző stratégiák léteznek, azonban a LINE-1 retrotranszpozíció *in vivo* kontextusban történő vizsgálata továbbra is problematikus. Az ORFeus riporter

rendszert a LINE-1 retrotranspozíciós események kimutatására szolgáló specifikus eszközként fejlesztették ki. A rendszer egy szintetikus LINE-1 elemet használ, amely egy EGFP riportert génhez kapcsolódik, amelyet az optimalizált LINE-1 szekvencia 3' UTR-ébe illesztettek be, de a LINE-1-el ellentétes irányban. Egy intronikus szekvencia *sense* irányban van beillesztve a riportergén megszakítására. Az intron eltávolításához a LINE-1 RNS-nek *splicingon* kell átesnie. Ezt követően, ha a riportert reverz transzkripción esik át, integrálódik a genomba, és *antisense* expresszió következik be, a fluoreszcens riportert kifejeződése detektálható. A retrotranspozíción átesett riportert erős és tartós EGFP-expressziót mutat az érintett sejtekben és annak minden utódsejtjében. A szomatikus L1-aktivitás tanulmányozására kézenfekvő megoldás laboratóriumi tumorsejtvonalak használata, de ez nem feltétlenül reprezentálja teljes mértékben az *in vivo* körülményeket, mivel a hosszú ideig tenyésztett tumorsejtvonalakban gyakran csak részben működnek azok a védelmi mechanizmusok, amelyek normális esetben gátolják a L1- aktivitást. Másik stratégia a hagyományos csíravonal transzgenikus egerek használata. Ezt a megközelítést azonban korlátozza a korai embrionális retrotranspozíció, amely a riportergén minden utódsejtben történő, kiterjedt expressziójához vezet, ami megnehezíti a csíravonalbeli és a szomatikus retrotranspozíció megkülönböztetését.

A szomatikus L1 retrotranspozíció fiziológiásabb környezetben történő tanulmányozására egy ORFeus riportert hordozó, szomatikusan transzgenikus egérmodell kifejlesztését láttuk szükségesnek, melyhez DNS transzpozon alapú, terápiás génbevitellel kapcsolt, szomatikus transzgenezis módszerünket használtuk fel.

2 A DOLGOZAT CÉLJAI

A rákkutatásban elért jelentős előrelépések ellenére a sporadikus tumorok kialakulásának pontos okainak megértése továbbra is jelentős kihívást jelent. A dolgozat a karcinogenezis egy kevésbé feltárt területére összpontosít: a LINE-1 retrotranspozonok részvételére a rák kialakulásában, az aktivitásukat befolyásoló tényezők felderítése által.

Jelen dolgozatban a következő célokat tűztük ki:

- i) A LINE-1 ORF1 fehérje expressziójának vizsgálata humán méhnyak szövettani mintákban a méhnyakrák kialakulásának különböző szakaszaiban, valamint biomarkerként történő használatának beállítása egy új kiértékelési rendszer felállításával, amely a humán méhnyakhám LINE-1 ORF1p immunfestését értékeli.

ii) Egy új technológiai platform kifejlesztése, amely alkalmas a szomatikus retrotranszpozíció nyomon követésére, egy szomatikusan transzgenikus egérmodell létrehozásával.

iii) Különböző vegyi anyagok nem konvencionális genotoxikus hatásainak vizsgálata a szomatikusan transzgenikus, LINE-1 riporterhordozó egér hepatocitáira gyakorolt hatás elemzésével, a jelenleg rendelkezésre álló toxikológiai eszköztár bővítése érdekében.

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Humán szövetminták: a szövetminták 2018 és 2022 között érkeztek be a Szegedi Tudományegyetem, SZAKK Patológiai Intézetébe. A betegek életkora 22 és 83 év között volt (átlagéletkor 52 év). A vizsgálatot az Intézményi Tudományos és Kutatási Etikai Bizottság hagyta jóvá (Ref: BM/3049/2023). Az FFPE-mintákat szöveti mikrochipek (TMAk) létrehozásához használtuk: CIN I (n = 20), CIN II (n = 46), CIN III (n = 14) és méhnyakrák (n = 32), valamint kontrollként 31 nem diszplázias méhnyakmintát (normál, n = 24, atrófia, n = 7) vizsgáltunk. A daganatmintákat TNM stádium (méret, nyirokcsomó érintettség és az áttét státusz szempontjából értékeltük).

3.2. Állatok gondozása és fenntartása: A transzgenikus egértörzset a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont Központi Állatházában tenyésztettük, negyedévente ellenőrizve kórokozómentes státuszukat. Az egereket 12 órás világos/sötét ciklusban, 22 °C-on tartottuk, *ad libitum* hozzáféréssel táplálékhoz és vízhez. Minden eljárás az Intézeti Állatgondozási és Állatfelhasználási Bizottság által jóváhagyott protokollokat követte (etikai engedély száma: XVI./801/2018). Vizsgálatainkhoz Fah mutáns törzsből származó egyedeket használtunk (C57BL/6N^{-Fahtm1(NCOM)Mfgc/Biat}), a Fah^{-/-} genotípusú egerek ivóvizéhez Orfadin®-t adagoltunk.

3.3. Immunhisztokémia: Az immunfestést a *Bond Max Autostainer Bond Polymer Detection System* segítségével végeztük. A humán méhnyak FFPE mintákhoz használt antitestek közé tartozott az anti-LINE-1 ORF1p, az anti-p16 és az anti-Ki67 antitestek.

Az egereket 3 hónappal a génbevitelt követően elaltattuk. A májszövet mintákat egy éjszakán át 4%-os formalinban fixáltuk, paraffinba ágyaztuk, és 5 mm-es metszeteket készítettünk. Az EnVision FLEX Mini Kit-et (DAKO) használtuk az IHC protokoll végrehajtásához, az antigén feltárás a PT Link (DAKO) segítségével történt. Az elsődleges antitesteként: nyúl poliklonális

anti-FAH, nyúl poliklonális anti-mCherry, nyúl monoklonális anti-LINE-1 ORF1p antitesteket használtunk, majd poliklonális kecske anti-nyúl-HRP másodlagos antitestet alkalmaztunk, majd hematoxinin magfestést, dehidrációt és fedést követően Panoramic Digital Slide Scanner (3D Histech) segítségével szkenneltük be az elkészült metszeteket.

3.4. Plazmidkonstrukciók létrehozása: A *pbiLiv-miR* vektort egy pUC57 plazmidba (GeneScript) klónoztuk. A plazmid tartalmazza a humán hidroxil-acil-CoA-dehidrogenáz trifunkciós multienzimkomplex alfa (HADHA) és béta (HADHB) alegységeinek kétirányú promóterét. A kétirányú promóter HADHA oldala hajtja az mCherry fluoreszcens marker gén expresszióját, amelyet a humán eukarióta transzlációs elongációs faktor 1 alfa 1 (*EEF1A1*) első intronja szakít meg. Az mCherry-gént egy T2A peptid köti össze az egér fumaril-aceto-acetát-dehidrogenáz (*Fah*) CDS-ével a bicisztronikus expresszió biztosítása érdekében, majd egy bGH poliadenilációs jel zárja le az expressziós egységet. A kétirányú promóter HADHB oldalát egy multiklónozó hely (MCS) és egy bGH poliadenilációs jel követi. A kazettát az SB transzpozon invertált terminális ismétlődései (ITR) szegélyezik. A *pbiLiv-miR-Luc* konstrukciót úgy hoztuk létre, hogy a pGL3-Basic plazmidból (Promega) PCR segítségével amplifikáltuk a szentjánosbogár-luciferáz gént (*Luc*), és beillesztettük a *pbiLiv-miR* multiklónozó helyének (MCS) *NheI/PacI* helyére. A *pbiLiv-miR-mORFeus* változatok előállításához a következő expressziós egységeket illesztettük be az MCS-be a HADHA/B promóter B oldalán: TF-monomerek, ORF1 kódoló szekvencia, 3'UTR, hsvTK polyA, EGFP (fordított orientációban), megszakítva a hGamma Globin intronnal, CMV promóterrel és SV40 polyA-val. A nagyobb cargo kapacitás elérése érdekében az SB ITR-eket a PiggyBac transzpozon rendszer ITR-jeivel helyettesítettük. A génbevitel során hiperaktív PiggyBac transzpozitázzal (hyPBase) együtt injektáltuk őket.

3.5. Hidrodinamikai farokvénás injektálás: A plazmidokat a NucleoBond Xtra Maxi Plus EF Kit segítségével állítottuk elő. A 6-8 hetes egerek 4 µg transzpozáz-tartalmú plazmidot (SB100 vagy hyPBase) és 50 µg transzpozon-tartalmú plazmidot kaptak steril Ringer-oldatban hígítva. A testsúlyuk 10%-ának megfelelő térfogatú elegyet 5-8 másodperc alatt injektáltuk a farokvénába a hidrodinamikusan hatás elérése érdekében.

3.6. A LINE-1 induktor vegyületek adagolása: A hidrodinamikusan injektálást és az NTBC megvonást követően a vizsgált vegyületeket 3 hónapon keresztül hetente 2 alkalommal intraperitoneálisan adagoltuk, míg a kontrollcsoport vívíányagot kapott.

3.7. Sztereomikroszkópos képalkotás: Az egérmájakat Olympus SZX12 fluoreszcens sztereozoom mikroszkóppal vizsgáltuk. A mikroszkóp 100 W-os higanylámpával és az EGFP és mCherry fluoreszcencia szelektív gerjesztésére szolgáló filterkészlettel rendelkezett.

3.8. *In vivo* biolumineszcencia képalkotás: A biolumineszcens képalkotást IVIS Lumina III műszerrel végeztük. Az egereknek 150 mg/kg luciferáz-szubsztrátot adtunk be intraperitoneálisan, majd a RAS-4 Rodent Anesthesia System (PerkinElmer) segítségével altattuk el őket. A képalkotást 10 perccel a szubsztrát injekció beadása után kezdtük meg, a kibocsátott fotonokat 1 és 10 másodperc expozíciós idővel rögzítve. A Living Image szoftverrel (PerkinElmer) meghatároztuk az átlagos fotonfluxus intenzitást egy meghatározott, kör alakú régió belül, amelyet másodpercenkénti foton/cm²/steradiánban (p/s/cm²/sr) fejeztünk ki.

3.9. Májperfúzió és hepatociták izolálása: Az egereket elaltattuk és a *vena cava superioron* keresztül perfundáltuk; a hepatocitákat többlépcsős kollagenázos perfúziós segítségével izoláltuk. A sejteket szűrtük, centrifugáltuk és számoltuk, életképességüket tripánkéék festéssel ellenőriztük.

3.10. Az EGFP-pozitív hepatociták FACS-alapú mérése: Az izolált hepatociták EGFP-fluoreszcenciáját BD FACS Aria™ Fusion áramlási citométerrel elemeztük.

3.11. qPCR az intron nélküli ORFeus-kópiák kimutatására: a qPCR-elemzés a splicingon átesett, intron nélküli EGFP exon-exon csomópontokat célozta meg. A reakciókat három ismétlésben végeztük, az adatokat a Rotor-Gene Q szoftver segítségével elemeztük.

3.12. Adatvizualizáció és statisztika: Az adatok vizualizálása az R és a GraphPad Prism programok segítségével történt. A statisztikai elemzések során alkalmazott módszerek között szerepelt a Fisher-féle egzakt teszt, a Pearson-féle khi-négyzet teszt, valamint a Welch-féle t-próba. A statisztikai szignifikancia meghatározására a $P < 0,05$ küszöbértéket használtuk.

4 EREDMÉNYEK

4.1 A LINE-1 ORF1 fehérje expressziójának vizsgálata humán FFPE mintákon

Az utóbbi években a LINE-1 ORF1p különböző ráktípusokban figyelmet kapott biomarkerként, hiszen olyan rosszindulatú daganatokban mutatották ki széleskörű kifejeződését, mint az emlő-, petefészek-, húgyhólyag-, nyelöcső- és hasnyálmirigy-rák. A tanulmányok arra utalnak, hogy a LINE-1 aktiváció már a tumor kialakulásának korai

szakaszában képes bekövetkezni, ahogyan az a Barrett-nyelőcsőben is megfigyelhető. Ennek a jelenségnek további feltárása érdekében több száz tumormintát vizsgáltunk TMA-technológiával, és megfigyeltük, hogy az ORF1p expressziója a tumor progressziójával fokozódik.

Elsőként vizsgáltuk az ORF1p expresszióját a méhnyak rákelőző állapotokban, intraepithelialis neoplasiában (CIN) és méhnyakrákban 143 méhnyakminta átfogó elemzésével. Az ORF1p pozitivitás mértékét a CIN grádusával hoztuk összefüggésbe. Ennek számszerűsítésére egy értékelési rendszert dolgoztunk ki, amely a *Remmele és Stegner* által kidolgozott Immunreaktivitási Skála (IRS) módosított változatán alapul. A végső IRS-pontszámot a festődés intenzitásának és a hám érintettségének mértékének szorzataként kaptuk.

Az ORF1p immunpozitivitás a diszpláziás és neoplasztikus (CIN és invazív rák) minták túlnyomó többségében [110/112 (98,2%)] kimutatható volt, míg a normál méhnyakminták 19/24 (79,2%) esetében teljesen hiányzott az ORF1p expressziója. Az ORF1p expressziós mintázata a CIN fokozatok előrehaladtával fokozatosan növekvő kiterjedést és intenzitást mutatott. A CIN I enyhe ORF1p-expressziót mutatott a méhnyakhám alsó egy vagy kétharmadában [14/16 (87,5%)], míg a CIN II mérsékelt vagy erős ORF1p-expressziót mutatott az alsó kétharmadra kiterjedően [29/46 (63,0%)]. Kifejezett transzepitheliális ORF1p immunpozitivitás jellemezte a CIN III eseteket [13/14 (92,8%)] és a méhnyakrákot [30/32 (93,8%)].

4.2 A szomatikus LINE-1 retrotranszpozíciós aktivitás mérése egerekben

A LINE-1 retrotranszpozíció mérése transzgenikus egerekben kihívást jelent az ORFeus riporter rendszer korai aktiválódása miatt a csíravonalban és az embrionális szövetekben. Ez a korai aktiváció a teljes szomatikus kifejlődés előtt széleskörű expressziót okoz, ami a hagyományos transzgenikus egérmodelleket alkalmatlanná teszi erre a célra.

Ennek megoldására egy megbízható szomatikus transzgenézis platformot fejlesztettünk ki az I. típusú tirozinémia preklinikai egérmodelljének felhasználásával. Ez a modell lehetővé teszi a stabil szomatikus génexpressziót csíravonalat érintő transzgenézis nélkül. A Fah-gént a 2-5. exon deléciójával hoztuk létre a Fah^{-/-} genotípust (C57BL/6N-Fah^{tm1(NCOM)Mfgr/Biat}), ami kezelés nélkül májelégtelenséghez vezet. Ennek megelőzésére a kezelés megkezdéséig nitisinont (NTBC) adagoltunk az egereknek az akut toxicitás elkerülése érdekében.

A génbevitel során a terápiás plazmidkonstrukciót hidrodinamikai farokvéna injektálással juttattuk be. A hepatocita genomba történő stabil integrációt az SB100 transzpozáz tette lehetővé. A géncsendesítés leküzdése érdekében a *Fah* és a kívánt transzgénünket a kétirányú HADHA/B promóter segítségével kapcsoltuk össze, biztosítva a FAH-t expresszáló sejtek pozitív szelekcióját. Célunk az volt, hogy a *Fah*^{-/-} hepatociták *Fah*^{+/+} sejtekkel való helyettesítésével multinoduláris repopulációval tartós transzgén-expressziót érjünk el, kihasználva a korrigált, FAH-t expresszáló sejtek növekedési előnyét. Ez a rendszer lehetővé tette számunkra, hogy stabilan expresszáljuk és nyomon kövessük a transzgéneket, például szentjánosbogár luciferázt (Luc). Biolumineszcens képalkotással igazoltuk a *Fah* KO egerekben a Luc tartós expresszióját, míg a vad típusú kontrollokban az expresszió idővel jelentősen csökkent. A WT egerekben 3 hónap alatt az átlagos biolumineszcencia-intenzitás szinte kimutathatatlan szintre csökkent (387-szeres csökkenés), míg a *Fah* KO egerekben a kezdeti szinthez képest 61-szeres növekedést tudtunk kimutatni.

Az így fejlesztett genomikai technológiai eszköztárunk lehetővé tette, hogy a létrehozzunk egy rendszert, amellyel képesek vagyunk a szomatikus LINE-1 retrotranspozíció aktivitásának mérésére egerek transzgenikus májsejtjeiben. A fent leírt vektorrendszert úgy módosítottuk, hogy a HADHA/B kétirányú promóter B oldalára beillesztettük az ORFeus riporter elemet. Ezt *pbiLiv-miR-mORFeusnak* neveztük el, és a LINE-1 riporterelemet tartósan expresszáló transzgenikus májak létrehozására használtunk. Az expressziós kazetta genomikus integrációjának megkönnyítése érdekében PiggyBac transzpozon ITR-ekre és hiperaktív transzpozázra (hyPBase) váltottunk, amely alkalmas ennek a nagyméretű (~10 kilobázis hosszú) expressziós egységnek a transzpozíciójának katalizálására.

A *pbiLiv-miR-mORFeus* plazmidot a hyPBase segítő plazmiddal együtt *Fah*^{-/-} egerekbe injektáltuk, majd felfüggesztettük az NTBC adagolását. Azok a sejtek, amelyekben megtörtént az expresszió egység kromoszomális integrációja, a FAH expresszióval járó szelektív növekedési előny miatt képesek voltak a tirozinémiás szövet rekolonizációjára. 3 hónap alatt a hepatociták szinte teljes populációja kifejezte az ORFeus riportert. A FAH és az ORF1p expresszió tartós jelenlétét a kezelt *Fah*^{-/-} májakban a génbevitel után 3 hónappal IHC-vel igazoltuk.

4.3 A LINE-1 retrotranszpozíciós aktivitás értékelése kémiai indukció hatására

A szomatikus LINE-1 aktivitásmérő rendszerünk validálása érdekében olyan exogén tényezőkkel, gyógyszerekkel, élelmiszerekben található vegyi anyagokkal exponáltuk a riportert hordozó transzgenikus egereket, amelyek LINE-1 aktivitást befolyásoló képességére rendelkezésre álltak irodalmi adatok.

3 hónapos gyógyszeradagolás után sztereomikroszkópos makrovizualizációt követően kiszámítottuk az EGFP-pozitív májsejt-kolóniák számát az expozíción átesett egerekben a nem kezelt kontrollkhoz képest. A fluoreszcens sztereomikroszkópos felvételek az EGFP-pozitív sejtkolóniák sűrűségének jelentős növekedését mutatták a FICZ (6-formilindolo[3,2-b]karbazol) kezelésben részesült állatok májában, ami arra utal, hogy a FICZ a szomatikus sejtekben LINE-1 retrotranszpozíciós aktivitást indukál. Az ORFeus riporter expressziója a kezeletlen kontrollcsoportban is okozott befejezett retrotranszpozíciós eseményeket, amit az EGFP-pozitív hepatociták kisszámú jelenléte bizonyít.

A retrotranszpozíción átesett EGFP-pozitív sejtek további számszerűsítése érdekében többlépcsős kollagenázos perfúziót végeztünk a hepatociták izolálása érdekében. A FACS-elemzés a Decitabinnal kezelt egerekben a kezeletlen kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb arányban mutattunk ki EGFP-pozitív sejteket, ami megerősítette a fokozott retrotranszpozíciós aktivitást. Emellett az intron nélküli EGFP-szekvenciákat célzó qPCR-analízis is alátámasztotta ezeket a megállapításokat, és a retrotranszpozíció megnövekedett szintjét mutatta ki a kezelt csoportban. Ezek a módszerek együttesen igazolták, hogy a Decitabin fokozza a LINE-1 retrotranszpozíciót.

5 MEGBESZÉLÉS

A LINE-1 elemek autonóm retrotranszpozonok, aktivitásuk szorosan összefonódik a genomi instabilitással. Az utóbbi években a LINE-1 aktivitás vizsgálata jelentős lendületet vett, nemcsak mint potenciális biomarker, hanem a tumorigenezisben betöltött szerepének feltárásának révén is. A dolgozat a LINE-1 biológiájának több fontos aspektusát tekinti át. Elsőként, bemutattuk, hogy a LINE-1 által expresszált ORF1p fehérje már a karcinogenezis korai stádiumában kifejeződik, a méhnyak karcinogenezis folyamatának példájával illusztrálva annak jelentőségét. Ezt követően, bemutattunk egy innovatív szomatikus transzgenézis platformot, amely állatmodellt biztosít a szomatikus LINE-1 aktivitás vizsgálatához. Ez az újszerű megközelítés értékes eszköz lehet nagyobb skálán végzett

toxikológiai és karcinogenezis vizsgálatok számára.

Az ORF1p, mint pán-tumor biomarker, nem csupán immunhisztokémiai alapú markerként bizonyul hasznosnak, hanem recens tanulmányok demonstrálták a szérumból és más testnedvekből való kimutathatóságát. Ez arra utal, hogy jelentős potenciál rejlik benne a nem-invazív rákszűrés területén, a korai felismeréstől a betegség monitorozásáig. Emellett a LINE-1 terápiás célpontként is ígéretes, mivel az ORF1p normális szövetekből hiányzik, ám bőségesen expresszálódik diszplázias elváltozásokban. Egy specifikus ORF1 gátlószer kifejlesztése jelentős előrelépést jelenthet a molekuláris onkológia és a precíziós orvoslás területén, különösen figyelembe véve, hogy már létező megközelítésként a LINE-1 ORF2 aktivitásának gátlása megvalósítható; többek között 3TC-vel (*lamivudin*), egy HIV-ellenes nukleozid reverz transzkriptáz inhibitorral (NRTI). A szer alkalmazása terápiás hatékonyságot mutatott áttétes vastagbélrák esetében egy 2. fázisú klinikai vizsgálatban.

Ma már ismert tény, hogy a *de novo* szomatikus LINE-1 inszerciók olyan tumorindukáló eseményeket hozhatnak létre, amelyek felelősek olyan sporadikus rákos esetekért, amelyeknek nincs ismert etiológiai faktora. Feltételezésünk szerint számos környezeti tényező befolyásolhatja a LINE-1 aktivitást. A LINE-1 aktivitásának kimutatására irányuló érzékenyebb és specifikusabb módszerek kifejlesztése nemcsak a genotoxicitás mélyebb megértéséhez járulhat hozzá, hanem segíthet azonosítani azokat a környezeti expozíciókat is, amelyek potenciálisan aktiválhatják a LINE-1 elemeket. Ezáltal ezek az új módszerek hozzájárulhatnak a környezeti rákkeltő tényezők által jelentett kockázatok pontosabb azonosításához.

A *Fah*^{-/-} egerekbe történő, transzpozon alapú génbeviteli rendszer felhasználásával hosszú távú és fiziológiás génexpressziót értünk el szinte a teljes májszövetben. Technológiánk a meglévő módszereket frissítette a hiperaktív SB100 transzpozáz használatával a hatékonyabb kromoszómális integrációk érdekében. Szelekciós markerhez kötött, tag-mentes fehérjeexpressziót tudtunk elérni, melyben a HADHA/B kétirányú promótert használata lehetővé tette a kiegyensúlyozott génexpressziót. Ez a beállítás lehetővé teszi a markerhez kapcsolt natív vagy mutáns fehérjék expresszióját, közel 1/1 transzkript arányt elérve, ami döntő fontosságú például fehérje komplexek előállításához. Ez a platform lehetővé tette számunkra, hogy a szintetikus LINE-1 riporter elemet, az ORFeus-t a promóter egyik oldalára illesszük be, miközben a *Fah-t*, mint pozitív szelekciós markergént a promóter másik oldalán tartjuk, ami lehetővé teszi a sikeresen transzfektált sejtek szelekcióját. Ez a konfiguráció biztosítja, hogy a LINE-1 riporter expressziója szorosan kapcsolódik a transzgén integrációjához és aktivitásához, lehetővé téve a LINE-1 aktivitás *in vivo* nyomon követését.

A vektor *Fah* KO egerekbe történő bevitele lehetővé teszi a LINE-1 retrotranszpozíciós események értékelését. Az ORFeus elem által kódolt retrotranszpozíciós riporterfehérje (EGFP) csak sikeres retrotranszpozíció esetén fejeződik ki, így közvetlenül leolvasható a LINE-1 aktivitása. A kísérleti állatonként rendelkezésre álló közel 100 millió hepatocita reprezentatív sejtkészletet biztosít a funkcionális teszteléshez. Ez a nagyszámú vizsgálható sejt lehetővé teszi bármilyen külső faktor a LINE-1 aktivitásra gyakorolt hatásának, mint potenciális genotoxikus hatásnak értékelését. Egérmodellünk értékes eszközként szolgálhat a toxikológiában az indirekt mutagének genotoxikus potenciáljának értékelésére a LINE-1 retrotranszpozíciók aktiválásán keresztül, ezáltal új környezeti kockázati tényezők azonosítására.

Fontos kiemelni, hogy a tanulmány egérmodellre támaszkodik, ami a fajspecifikus különbségek miatt korlátokat jelent. Többek között a metabolikus ráta, az immunrendszer működése, a hormonális szabályozás és a gyógyszer anyagcsere eltéréseket mutat az ember és a laboratóriumi egér között. Az ellenőrzött környezet, amelyben a laboratóriumi egereket tartjuk, nem reprodukálja a rendkívül változatos és összetett emberi környezetét. Tényezők, mint az étrend, a stressz, alvásmennyiség, kórokozóknak- vagy egyéb expozíciónak való kitettség sokrétűen befolyásolják a betegség kialakulását és lefolyását, ami az eredmények extrapolálásakor gondos mérlegelést igényel. Másrészt viszont, a LINE-1 elemek alapvető biológiája nagymértékben konzervatív, így lényegesen nem különbözik az egerek és az emberek között. Mindkét fajban minimális LINE-1 aktivitás figyelhető meg a csíravonalban, a szomatikus aktivitás pedig fiziológiás körülmények között jellemzően szupresszált. A tumorigenezis során azonban a LINE-1 aktivitás derepresszálódik a szomatikus sejtekben. A LINE-1 aktivitás celluláris szabályozásának mechanizmusai közősek mindkét fajban. Ezen felül az emberi és egér LINE-1 fehérjék funkcionális felcserélhetőséget mutatnak. Mindezek ismeretében a LINE-1 aktivitás mérésére alkalmas egérxoxikológiai módszerünket ugyanolyan relevánsnak tekintjük, mint a hagyományos rágcáló toxikológiai vizsgálatokat.

Összességében, a tanulmány bizonyítja a szomatikusan transzgenikus egérmodellben alkalmazott ORFeus riporterrendszer hatékonyságát a szomatikus *de novo* LINE-1 retrotranszpozíciós események kimutatására, és rávilágít egyes anyagok eddig kéllően fel nem térképezett genotoxikus hatására. Ezek az eredmények alapot adhatnak olyan további kutatásához, amelyek feltárják, hogyan befolyásolják a környezeti tényezők a genomi stabilitást és milyen mechanizmusok vezetnek a sporadikus rák kialakulásához.

6 KÖVETKEZTETÉSEK

Eredményeink rávilágítanak a szomatikus LINE-1 aktivitás potenciálisan széleskörű jelenlétére és a sporadikus rákok kialakulásában betöltött szerepére. Kvantitatív bizonyítékokat mutattunk be, a méhnyak rákelőző állapotainak magasabb szövettani besorolása együtt járt a LINE-1 ORF1 fehérje expressziójának progresszív növekedésével.

A kifejlesztett *in vivo* technológiai platform új megközelítést jelent a vegyi anyagok genotoxikus hatásainak értékelésére, amelyek hagyományos módszerekkel nem mutathatók ki. A LINE-1 retrotranszpozíciós aktivitás szomatikus sejtekben történő mérésének képessége új dimenziót biztosít annak megértéséhez, hogy a környezeti tényezők hogyan járulnak hozzá a rák kialakulásához.

A doktori értekezés legfontosabb új megállapításai:

1, A dolgozat bemutatta a LINE-1 ORF1 fehérjét, mint a méhnyak intraepiteliális neoplázia (CIN) kimutatására szolgáló új biomarkert. Az ORF1p expressziója összefüggést mutatott a diszplázia súlyosságával, fokozatosan növekvő kiterjedést és intenzitást mutatva a CIN előrehaladottabb fokozataiban és invazív méhnyakrákban.

2, Az ORF1p használatának klinikai előnye, hogy képes megbízhatóan megkülönböztetni a normális méhnyakhámot a CIN I elváltozásoktól. Ez értékes markerré teszi az ORF1p-t a korai stádiumú diagnózisban és a méhnyakrák progressziójának nyomon követésében.

3, A LINE-1 retrotranszpozíciós aktivitás *in vivo* mérésére kifejlesztettük az első szomatikusan transzgenikus egérmodellt a *pbiLiv-miR-mORFeus* plazmid létrehozásával, amelyet a hyPBase transzpozázzal együtt hidrodinamikusan injektáltunk *Fah* knockout egereknek. Ez a megközelítés sikeresen áthidalja a korábbi modellek korlátait, amelyeket a LINE-1 csíravonalbeli aktiválása limitált.

4, A megalkotott egérmodell a környezeti vegyi anyagok LINE-1 aktivitásra gyakorolt hatásának mérésére használható. A tesztelt anyagok közül a decitabin és a FICZ fokozták a retrotranszpozíciós aktivitást szomatikus sejtekben, ezáltal indirekt genotoxikus kockázatot jelenthetnek.

7 TÁMOGATÓK

A dolgozatban említett projekteket részben a Magyar Tudományos Akadémia Lendület II. programja (LP2015-5/2015), a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap GINOP (GINOP-2.3.2-15-2016-00024) és a 2021-1.1.1.4- GYORSÍTÓSÁV-2022-00018 projektje támogatta. K.R.-t a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alap forrásából a Nemzeti Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP Új Nemzeti Kiválósági Programja támogatta.

8 RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

CIN cervikális intraepithelialis

neoplázia

DNS dezoxiribonukleinsav

EGFP zöld fluoreszcens fehérje

FACS fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás

FAH fumaryl-acetoacetát hidroláz

FICZ 6-Formylindolo[3,2-

b] karbazol

FFPE formalin-fixált, paraffinba ágyazott

minta

HADHA hidroxil-acil-CoA dehidrogenáz

trifunkcionális multienzim komplex alfa

alegysége

HADHB hidroxil-acil-CoA-dehidrogenáz

háromfunkciós multienzim komplex béta

alegysége

hyPBase hiperaktív piggyBac transzpozáz

IHC immunhisztokémia

IRS immunreaktivitási skála

LINE-1 (L1) *Long interspersed nuclear*

element-1, (hosszú megszakított nukleáris

elemek)

LTR hosszú terminális ismétlődés

NRTI nukleozid reverz transzkriptáz

inhibitor

NTBC *Nitisinone*

ORF nyitott leolvasási keret

qPCR kvantitatív polimeráz

láncreakció

SB *Sleeping Beauty* (transzpozon

rendszer)

SB100 hiperaktív

SleepingBeauty transzpozáz

TE transzpozázilis genetikai elem

TMA szöveti mikrochip

TPRT célhely iniciálta reverz

transzkripció

TT1 I. típusú tirozinémia

3TC *Lamivudin*

WT vad típus

9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném hálámat kifejezni azoknak az embernek, akik hozzájárultak a PhD éveim alatt az előrehaladásomhoz. Mindenekelőtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, **Mátés Lajosnak** és társának szakmában- és életben egyaránt; **Mátés-Nagy Andreának**, útmutatásokat és szakértelmeket lehetővé tette a tudományos fejlődésemet. Köszönöm, hogy 2014-ben, elsőéves orvostanhallgatóként, mentort keresve befogadtatok a laborba, és a kutatói pálya felé orientáltatok. Ezek az évek alatt remek emberekkel dolgozhattam együtt a labor kötelékében. Köszönöm, **Hudoba Liza**, hogy a szárnyaid alá vettél, és megtanítottál a kutatás csínjára-bínjára, miközben barátoddá válhattam. **Blastyák András** - az ötleteid végtelen tárháza, a kreativitásod, fáradhatatlan kíváncsiságod és a „benchwork” iránti szereteted nagy hatással volt rám. Külön köszönet illeti **Imre Gergelyt**; mindig ott voltál, és segíteni tudtuk egymást a stresszes időkben. Közös humorérzékünk (*délután 4 körül*) a legnehezebb napokat is feldobta. Szeretném megköszönni **Fekete Ildikó** közreműködését, akinek a laborban nyújtott technikai segítsége és tapasztalata sokat adott a kísérleteink sikeréhez. A labort igazi "fészekké" varázsoltad, egy helylé, ahová mindig jó volt visszatérni. Köszönetemet szeretném kifejezni **Kopasz Anna Georginának**, **Pusztai Dávidnak**, **Bakné Drubi Andreának**, **Fehérné Juhász Erzsébetnek** és **Khaldoon Sadiqnak** a közös munka során nyújtott támogatásukért. Szeretném megköszönni a labor új tagjainak, **May Rayanak**, **Töröcsik Kittinek**, **Szalmási Katinkának**, **Verebi Olíviának** és **Kocsis Dominik Sándornak**, hogy továbbviszik munkánkat. Az elkötelezettségetek és lelkesedéseitek biztosítja, hogy kutatásaink a jövőben is folytatódhassanak. Hálás vagyok továbbá az SZBK **Központi Állatház** munkatársainak az egértörzsünk lelkiismeretes gondozásáért, amellyel megfelelő környezetet biztosítanak állatkísérleteinkhez. Szeretnék köszönetet mondani a szegedi **Pathológiai Intézet** munkatársainak: **Pankotai-Bodó Gabriellának**, **Csikós Ivettnek**, **Bankó Saroltának**, **Ürmös Ádámnak**, **Kun Tibornak**, **Balogh Beátának**, **Daru Krisztiánnak** és **Dezső Mihálynak**, a dolgozatom nem jöhetett volna létre a segítő közreműködések nélkül. Kiemelkedően hálás vagyok **Sükösd Farkasnak**, hiszen *“nem az út a fontos, hanem akivel megteszed”*. Köszönetet szeretnék mondani **Czibula Ágnesnek**, **Szüts Dávidnak** és **Villányi Zoltánnak**, hogy konstruktív visszajelzést adtak a dolgozatomról. Szeretném megköszönni a **Multidiszciplináris Doktori Iskolának** és a **Szegedi Biológiai Kutatóközpontnak**, különösen a **Genetikai Intézetnek**, hogy szellemi műhelyként biztosított háttérrel a kutatáshoz. Végül, de nem utolsósorban, szeretnék köszönetet mondani a mindig támogató és stabil háttérrel biztosító **családomnak** és csodálatos **barátaimnak**. A támogatásokat a világot jelentette számomra.