

Szegedi Tudományegyetem, Szent-Györgyi Albert Orvostudományi Kar
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

Egy újonnan kifejlesztett transzgenikus egérmáj platform lehetőségei a hepatocelluláris karcinóma vizsgálatában és a PARP-gátlószer alapú terápia perspektívái

Ph.D. Tézisfüzet

Kopasz Anna Georgina

Témavezetők:

Dr. Mátés Lajos,

Dr. Timinszky Gyula



Szeged

2025

Publikációs lista:

A Ph.D. értekezés alapját képező publikációk:

Kopasz AG, Pusztai DZ*, Karkas R, Hudoba L, Abdullah KS, Imre G, Pankotai-Bodó G, Migh E, Nagy A, Kriston A, Germán P, Drubi AB, Molnár A, Fekete I, Dani VÉ, Ocsovszki I, Puskás, LG, Horváth P, Sükösd F, Mátés L. (2022) *A versatile transposon-based technology to generate loss- and gain-of-function phenotypes in the mouse liver.* **BMC Biology**

D1, IF= 5.4

Mamar H, Fajka-Boja R*, Mórocz M, Jurado EP, Zentout S, Mihut A, **Kopasz AG**, Mérey M, Smith R, Sharma A, Lakin N, Bowman A, Haracska L, Huet S, Timinszky G. (2024) *The loss of DNA polymerase epsilon accessory subunits POLE3-POLE4 leads to BRCA1-independent PARP inhibitor sensitivity.* **Nucleic Acids Research**

D1, IF= 13.1

Kumulatív IF= 18.5

A Ph.D. értekezés témájában készített további publikációk, amelyek nem kerülnek felhasználásra ezen fokozatszerzési eljárás során:

Imre G, Takács B*, Czipa E, Drubi AB, Jaksa G, Latinovics D, Nagy A, Karkas R, Hudoba L, Vásárhelyi BM, Pankotai-Bodó G, Blastyák A, Hegedűs Z, Germán P, Bálint B, Ahmed Abdullah KS, **Kopasz AG**, Kovács A, Nagy LG, Sükösd F, Pintér L, Rüllicke T, Barta E, Nagy I, Haracska L, Mátés L. (2023) *Prolonged activity of the transposase helper may raise safety concerns during DNA transposon-based gene therapy.* **Mol Ther Methods Clin Dev.**

Q1, IF=4.6

Baretić D, Missouri S*, Patel K, Martinez M, Coste F, Zhu K, Smith R, **Kopasz AG**, Lu Y, Bigot N, Chapuis C, Riou R, Đukić N, Goffinont S, Pressoir V, Patačko S, Timinszky G, Delarue M, Castaing B, Ahel D, Mikoč A, Huet S#, Ahel I#, Suskiewicz MJ#. (2025) *Filament formation and NAD processing by noncanonical human FAM118 sirtuins.* accepted in **Nature Structural & Molecular Biology**

D1, IF= 10.1

Szabadalmak listája:

Mátés L, **Kopasz AG**, Karkas R, Ahmed Abdullah KS, Mátés-Nagy A, Imre G, Fekete I, Horváth P, Sükösd F. Versatile vector system for directed gene expression modifications. Patent, (2023) International Application Number: PCT/HU2023/050013, **inventor as 25%**

Mátés L, Karkas R, Ahmed Abdullah KS, Mátés-Nagy A, Imre G, **Kopasz AG**, Fekete I, Horváth P, Sükösd F. Measurement of somatic Ll retrotransposition activity. Patent, (2023) International Application Number: PCT/HU2023/050014, **inventor as 5%**

1. Bevezetés

A rák multifaktoriális betegség, amely magas morbiditással és mortalitással jár. A tumorok progresszióját genetikai eltérések felhalmozódása okozza, átlagosan 2–8 „driver” mutáció szükséges a tumor iniciációhoz.

2000-ben a rák többlépcsős kialakulásának hat „fémjegye” (Hallmarks of Cancer) került leírásra. 2011-re a lista négy további tulajdonsággal bővült, majd 2022-re új „fémjegydimenziók” jelentek meg, amelyek a tumorigenezis új aspektusaira irányították a figyelmet. A „driver” génkombinációk nagy száma, az egyes ismertetőjegyek dominanciájának stádiumfüggése, valamint a nem mutációs tényezők óriási változatossága mind a személyre szabott daganatterápia fontosságát hangsúlyozzák.

A kemoterápiás szerek erősen mutagén citotoxikus ágensek, amelyek nemcsak a gyorsan osztódó ráksejteket pusztítják el, hanem az egészséges, osztódó sejtekben is mutációkat okoznak. Ez súlyos mellékhatásokhoz és újonnan kialakuló daganatok megjelenéséhez vezethet. Ezért egyre nagyobb az igény új, célzott daganatterápiák kifejlesztésére, amelyek javíthatják a hagyományos megközelítések hatékonyságát, sőt ki is válthatják azokat.

A májrák a hatodik leggyakoribb és világszerte a harmadik legtöbb halálozásért felelős daganattípus. Az elsődleges májtumzorok mintegy 80%-át hepatocelluláris karcinómaként (HCC) osztályozzák. A jelenlegi kezelésekkel szembeni rezisztencia és a diagnózist követő alacsony 5 éves túlélési ráta a HCC-t az egészségügyi ellátás legsürgetőbb problémái közé emeli, és új terápiás megközelítések kidolgozását sürgeti.

A PARP-gátlók a célzott daganatterápiák új ígéretes ágensei, amelyek a tumorsejtek genetikai instabilitását használják ki. Sem a homológ rekombináció (HR) deficiencia, sem a PARP1 aktivitás hiánya nem halálos önmagában, azonban ezek együttes jelenléte esetén a sejthalál elkerülhetetlen, ezt nevezzük szintetikus letalitásnak. A HR-deficiencián felül egyre nagyobb az igény új szintetikus letális interaktorok azonosítására és jellemzésére, hogy a jelenlegi terápia hatékonyabbá váljon és a mellékhatások mérséklődjenek.

Bár a klinikai gyakorlatban nincs még példa a PARP-gátlókra épülő szintetikus letális HCC kezelésében való alkalmazására, több ígéretes preklinikai tanulmány támaszkodik a HCC egyedi genetikai eltéréseire. Többek között kimutatták a PARP1 szint megnövekedését HCC-ben, amely összhangban áll a TCGA adatbázis adataival. A HCC kialakulásában szerepet játszó több kulcsfontosságú jelátviteli útvonal együttes célzása megakadályozhatja, hogy a tumorsejtek „kibújjanak” a kezelés alól. Ily módon a PARP-gátlók más célzott kezelésekkel kombinálva szinergisztikus citotoxicitást válthatnak ki, és csökkenthetik a kiújulás kockázatát.

Korábban CRISPR-Cas9-alapú knockout screen-t végeztünk az Olaparib PARP-gátlószer alkalmazásával, hogy azonosítsunk olyan target géneket, amelyek hiánya érzékenyvé teszi a sejteket a PARP-gátlószerekre. Ebben a szűrésben a POLE4 a harmadik legjobb jelöltként szerepelt a PARP1 szintetikus letális interaktoraként. Más screen-ek is kimutatták, hogy a POLE4 hiánya a PARP-gátlószerek jelenlétében szintetikus letalitást okoz. Emellett a közelmúltban azt is igazolták, hogy a PolE komplex valamennyi tagja overexpresszálódik HCC-ben, amely rontja a betegek túlélését. Ezek az eredmények összességében rámutatnak a PolE komplex biológiai jelentőségére HCC-ben, és valamennyi alegységet új prognosztikai markerként vetnek fel.

A tumorigenezist előidéző, illetve a kezelések szelektív toxicitását fokozó genetikai eltérések azonosításához két fő forrás áll rendelkezésre: humán tumorszövetek és *in vitro* vagy *in vivo* screen-ek. A legnagyobb kihívást a tumorigenezis motorjául szolgáló „driver” mutációk felismerése és elkülönítése jelenti a jóval gyakoribb „passenger” mutációktól. Az elmúlt évtizedekben a transzgenikus egerek a rákkutatás meghatározó eszközeivé váltak. Egyre nagyobb az igény olyan transzgenikus egérmodellek kifejlesztésére, amelyek képesek a sporadikus daganatkialakulást modellezni, ugyanakkor jelentős hátrány, hogy ezen törzsek előállítása rendkívül időigényes és költséges. A „driver” mutációk több mint 90%-a kizárólag szomatikus sejtekben fordul elő, ezért a szomatikus transzgenézis a tumor iniciáció modellezésének legrelevánsabb módja. A csíravonal-módosított egérmodellekkel összehasonlítva a szomatikusan transzgenikus modellek létrehozása gyorsabb és költséghatékonyabb.

A „driver” gének plazmid DNS-ről tranziensen is expresszálhatók, illetve genomi integrációval stabilan is bevezethetők. Több transzkripciós kazetta egyidejű, ugyanazon sejt genomjába történő integrálására a virális vektorok és a DNS transzpozonok egyaránt alkalmasak. A virális vektorokkal szemben a DNS transzpozonok számos előnyt kínálnak úgy, mint a nagyobb cargo-kapacitás, az alacsony immunogenicitás és a stabil transzgén expresszió, amelyek által hatékony, nem-virális alternatívát nyújtanak a transzgének stabil kifejeztetésére.

A máj nagy regenerációs potenciállal bír, amely megkönnyíti a transzgenikus májmodellek kialakítását. A *Fah* gén stabil bejuttatásával *Fah* knockout egerek májába, majd az NTBC megvonásával a hepatociták teljes populációja 2–3 hónap alatt lecserélődik transzgenikus hepatocitákra. Az elmúlt 15 évben több HCC egérmáj-modell is létrehozásra került *Fah*-deficiens hepatociták hidrodinamikai transzfekciójával. Ugyanakkor egyetlen „driver” gén ektopikus expressziója általában nem elegendő a tumorigenezis kiváltásához. Azonban ez a

korlát áthidalható *Fah* KO egerekben a hiperaktív transzpozázok és a *Fah* gén bevitele által kiváltott májregeneráció kombinálásával.

2. Célkitűzés

Doktori értekezésemben a daganatbiológia két, egymástól eltérő aspektusára összpontosítottam.

Az **1. kísérletsorozatban** arra törekedtünk, hogy a jelenleg alkalmazott PARP-gátlószer alapú terápiákat hatékonyabbá tegyük. Ennek érdekében célunk volt a PARP1 és POLE4 közötti szintetikus letalitás mögöttes molekuláris mechanizmusának feltárása.

A **2. kísérletsorozatban** bővíteni kívántuk azon *in vivo* kísérleti rendszerek repertoárját, amelyek alkalmasak az új „driver” gének validálására. Ezért célunk egy transzpozon-alapú rendszer kialakítása volt, amellyel egyetlen kísérleti állatban bármely tumormodell létrehozható. Az általunk vizsgált onkogén expresszióját össze kívántuk kapcsolni egy tumorsuppresszort csendesítő mesterséges mikroRNS expressziójával, amihez a toxikus mellékhatások elkerülése érdekében egy erős, endogén, kétirányú promótert kívántunk használni.

Első lépésként egy *in vivo* kiegyensúlyozottan kétirányú promótert szerettünk volna azonosítani. Ezt követően célunk az volt, hogy a kétirányú promótert felhasználva optimalizáljuk az RNS-interferencia-alapú géncsengesítést egérmódelünkben. Végül be akartuk mutatni, hogyan demonstrálható a daganatképződés rendszerünkben hRas^{G12V}-t túltermelő, p53-csengesített hepatocitákat hordozó egerek létrehozásával.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Sejtkultúra

A HeLa sejteket DMEM tápoldatban tenyésztettem, amelyet 10% FBS-sel és 1% HyClone Penicillin-Streptomycin 100x oldattal egészítettem ki. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂-szint mellett tartottam. A vad típusú HeLa sejtvonal STR-profilozáson esett át, amelynek eredménye a Cellosaurus sejtvonal-adatbázissal összevetve 100%-os egyezést mutatott a HeLa-val. A *POLE4* KO sejtvonalakat a jelen kísérleteink során CRISPR/Cas9-alapú génszerkesztéssel hoztuk létre.

3.2. Sejt túlélési vizsgálatok

5 x 10⁴ *POLE4* KO és vad típusú sejtet ültettem ki 96-lyukú lemezekre. Ezt követően a sejteket 0–8 mM közötti HU-koncentrációval kezeltem 24 órán át, majd egy mosási lépést követően a

sejteket egy hétig FBS-sel és Penicillin–Streptomycin-nel kiegészített DMEM-ben inkubáltam. Ezután eltávolítottam a felülúszót, és a sejteket 25 µg/ml resazurinnal (Leibovitz L-15-ben oldva) inkubáltam a resorufin mérése előtti 30 percben. A resorufin fluoreszcenciáját a BioTek Synergy H1 mikrolemez-olvasó 530/590 nm-es szűrőbeállításával detektáltam.

3.3. Plazmidok klónozása

Az állatkísérletekhez egy T2 típusú transzpozont terveztünk, amely tartalmazta a HADHA/B promótert, egy polilinkert NotI, BamHI, SpeI, KpnI, MluI, NheI, XhoI és PacI hasítóhelyekkel a promóter HADHA-oldalán, valamint az mCherry kódoló szekvenciát, amelyet a T2A peptiden keresztül kapcsolunk a Fah kódoló szekvenciához. Az mCherry kódoló szekvenciáját megszakítja a humán eukarióta transzlációs elongációs faktor 1 alfa 1 (*EEF1A1*) gén első intronja, amely az intronikus mikroRNS-expressziót biztosítja. Az újonnan tervezett transzpozont a GeneScript szintetizálta, amit pUC57 plazmidvektorba klónoztunk. Egér teljes májszövetből izolált RNS felhasználásával készült cDNS-t használtunk a *hRas* amplifikálására, a G12V mutációt pedig helyspecifikus mutagenézissel hoztuk létre. A GFP és a *hRas* kódoló szekvenciáit a BamHI/PacI hasítóhelyekre illesztettem be. A mikroRNS-eket AgeI/XbaI vagy SacI/SalI restrikciós enzimekkel klónoztam.

3.4. Kísérleti állatok és mintagyűjtés

Az egereket a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont (Szeged, Magyarország) Központi Állatházában tartottuk és tenyésztettük. Az egérkísérleteket a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Állatkísérleti Etikai Bizottságának protokolljai szerint végeztük (jóváhagyási szám: XVI./801/2018). A Fah KO egereket 8 mg/ml NTBC-n tartottuk a farokvéna oltás napjáig, amikor a testsúlyuk 10%-ának megfelelő térfogatú Ringer-oldatban adtuk be az egyenként 50 µg SB transzpozon és 4 µg SB100X transzpozáz plazmid keverékét 6-8 hetes állatokba. Ezt követően 5 hét vagy 5 hónap elteltével eutanáziát hajtottunk végre, a májakon pedig sztereomikroszkópos vizsgálatokat végeztünk. Ezután RNS-izoláláshoz 50 mg májszövetet 2 ml TRI Reagensben, immunoblothoz pedig 2 ml RIPA pufferben homogenizáltunk. A fennmaradó májszöveteket lízispufferben (150 ml Tris–HCl, 0,2% SDS, 5 mM EDTA, 300 µg/ml ProteinaseK) emésztettük DNS-izolálás és a transzpozon-kópiaszám meghatározása céljából. Immunhisztokémiai festéshez a májakat éjszakán át 4% paraformaldehidben fixáltuk.

3.5. Nukleinsav izolálás és kvantitatív PCR

Először RNS-t izoláltam TRI Reagensben homogenizált májszövetből a gyártó utasításai szerint. Ezt követően az RNS mintákból a genomi DNS szennyeződést DNase I enzimmel eltávolítottam, majd cDNS-t szintetizáltam. A genomi DNS-t klasszikus fenol/kloroform extrakciós módszerrel nyertem ki a lizátumokból. A qPCR reakciókat triplikátumokban, SYBR Green SuperMix felhasználásával állítottam össze, a gyártó utasításai szerint.

3.6. Immunblot

Minden homogenizált májmintát 3 x 10 másodpercig szonikáltam, majd 13 000 g-n centrifugáltam 15 percig, 4 °C-on. Az egyes minták felülúszójának 80-80 µg fehérjetartalmát 10%-os SDS–poliakrilamid gélen elválasztottam, majd 0,2 µm pórusméretű nitrocellulóz membránra transzferáltam. A transzfer minőségének ellenőrzésére a membránokat Ponceau-val megfestettük, ezt követően a membránokat 5% TBST-ben (1X TBS, 0,1% Tween 20) oldott tejporban blokkoltam 1 órán át szobahőmérsékleten. A membránokat anti-GFP és anti-GAPDH elsődleges antitestekkel 2 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam. 3 x 10 perc mosást követően a membránokat HRP-konjugált, anti-nyúl másodlagos antitesttel 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltam. Valamennyi antitestet 5% BSA-ban, TBST-ben hígítottam. A GFP és GAPDH jeleket az ECL Prime Western Blotting Detection Reagent segítségével tettem láthatóvá, és ECL Hyperfilm-en hívtam elő.

3.7. Immunhisztokémia

A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott transzgenikus májak középső lebenyéből 5 µm vastag metszeteket készítettünk, amelyeket 56 °C-on egy éjszakán át melegítettünk/paraffinmentesítettünk. A paraffinmentesítést, a rehidratálást és az epitóp-feltárást PT Link készülékben végeztük. A mintákat anti-glypican-3 és anti-alfa-1-fetoprotein elsődleges antitestekkel egy éjszakán át, vagy anti-FAH antitesttel 120 percig inkubáltuk. Az elsődleges antitestek után 30 perces, HRP-konjugált nyúl elleni másodlagos antitesttel történő festés következett. A jelölést az EnVision FLEX DAB+ kromogén rendszerrel vizualizáltuk, majd a metszeteket 5 percig hematoxilin–eozinnal festettük, ezt követően a mintákat fedő medium-mal fedtük. A tárgylemezeket Panoramic Digital Slide Scannerrel digitalizáltuk, a képeket pedig a BIAS szoftverrel elemeztük.

3.8. Sztereomikroszkópos képalkotás

A transzgenikus májak eltávolítása után a szerveket kétszer mostuk 1xPBS-ben, hogy a maradék vért eltávolítsuk. A felvételeket 100 W-os higanylámpával és a GFP és mCherry fluoreszcencia detektálásához alkalmas filterekkel felszerelt Olympus SZX12 Fluorescence Stereozoom mikroszkóppal készítettük.

3.9. Fluoreszcens képalkotás

10^4 HeLa wt/POLE4 KO sejtet ültettem ki fluorokarbon fólia aljú 96-lyukú sejtenyésző edényekre. 24 óra elteltével Olaparib ($10\ \mu\text{M}$) és hydroxyurea ($2\ \text{mM}$) kezelést végeztem újabb 24 órán át, majd a sejteket 1xPBS-sel mostam, és $-20\ ^\circ\text{C}$ -on, jéghideg metanollal 15 percig fixáltam és permeabilizáltam. A fixált sejteket ezután vagy kezeletlenül hagytam 1xPBS-ben, vagy RNase H enzimmel kezeltem 2,5 órán át $37\ ^\circ\text{C}$ -on. Ezt követően a sejteket háromszor mostam 1xPBS-ben, majd 3% BSA 0,1% TritonX-100 oldatban blokkoltam 45 percig szobahőmérsékleten. Az S9.6 elsődleges ellenanyaggal történő inkubáció egy éjszakán át, $4\ ^\circ\text{C}$ -on zajlott, amit másnap háromszori mosás követett. Ezután a mintákat 1 órán át inkubáltam anti-egér másodlagos ellenanyaggal, majd a sejtmagokat 10 percig DAPI-val festettem. A Z-stacket a VisiScope szoftverrel Spinning Disk konfokális mikroszkópon $40\times/0,6$ objektívvel készítettem. A képalkotást 405 és 561 nm-es dióda lézerekkel és Andor Zyla 4.2 PLUS kamerával végeztem. A maximális intenzitású projekciók elkészítése után a Z-stack-eket egy CellProfiler pipeline-nal elemeztük.

3.10. Statisztika

A statisztikai tesztek minden kísérlet legalább 3 biológiai ismételtsén végeztük a GraphPad Prism szoftver segítségével. Az ábrákat a BioRender segítségével készítettem.

4. Eredmények

4.1. Az első kísérletsorozat eredményei

4.1.1. A PARP-gátlás transzkripció-replikációs katasztrófát okoz az R-loop-ok felhalmozódása miatt a POLE4 hiányakor

A kísérleti adataim alapján HU (hidroxiurea) kezelést követően a POLE4 KO sejtek életképessége szignifikánsan alacsonyabb volt a vad típusú sejtekéhez képest, ami a POLE4 KO sejtek érzékenységét jelzi replikációs stressz alatt. Továbbá, mind a HU, mind a PARPi kezelések fokozott R-loop felhalmozódást eredményeztek a POLE4 hiányában. Eredményeim azt mutatják, hogy a PARP-gátlás rontotta az R-loop-ok eltávolítását és csökkentette a

replikációs villák sebességét, amelyek együttesen transzkripció-replikációs katasztrófát eredményeztek, és erre vezethető vissza a PARPi kezelés magas toxicitása is POLE4 KO sejtekben.

4.2. A második kísérletsorozat eredményei

4.2.1. A *HADHA/B* kétirányú promóter *in vivo* alkalmazása

Annak vizsgálatára, hogy a *HADHA/B* kétirányú promóter megőrzi-e kiegyensúlyozott kétirányú aktivitását *in vivo*, egy új Sleeping Beauty transzpozon vektort hoztunk létre T2 típusú ITR-ekkel, amelyben a *HADHA/B* promóter két, ellentétes DNS szálak által kódolt transzkripciós egység expresszióját hajtja. Ebben az elrendezésben a promóter A oldala biztosítja az mCherry-T2A-Fah transzkriptum kifejeződését, míg a B oldalt egy polilinker követi, ahová a vizsgálni kívánt onkogén illeszthető be. Kísérleti rendszerünkben a *Fah* szelekciós markergénként szolgál, erős pozitív szelekciós nyomást biztosítva, míg az mCherry fluoreszcens marker, amely lehetővé teszi mind a *Fah*-alapú regeneráció, mind a potenciális tumorképződés, valamint a HCC esetleges metasztázisainak nyomon követését nem-invazív képalkotással. A transzpozon plazmidokat a transzpozázt kódoló helper plazmiddal kombinálva *Fah* KO egerekbe juttattuk, és 5 hónappal később a transzgenikus májakat begyűjtöttük.

Mind a transzgenikus szervek sztereomikroszkópos vizsgálata, mind az egérmáj-homogenizátumokon végzett RT-qPCR mérések egyértelműen jelezték, hogy a *HADHA/B* promóter *in vivo* is megőrizte kiegyensúlyozott aktivitását. Ez különösen fontos, mivel a kapcsolt transzkripciós egységek összehasonlítható expressziós szintje elengedhetetlen a kellően erős onkogén expresszióhoz, és ezáltal a tumorigenezis indukciójához, valamint a mCherry-T2A-Fah stabil, a májregenerációhoz elegendően magas szintű kifejeződéséhez.

4.2.2. A *p53* tumorsuppresszor csendesítése szomatikusan transzgenikus egérmodellünkben

A *p53* expresszióját egyetlen, *p53*-at csendesítő mikroRNS alkalmazásával 47%-kal, míg két különböző *p53* pri-mikroRNS hairpin használatával 68%-kal sikerült szignifikánsan csökkentenünk. A *HADHA/B* promóter mindkét oldaláról származó transzgén-expresszió enyhe, de nem szignifikáns csökkenést mutatott az expresszált mikroRNS-ek számának növelésével. A transzgén expresszió szintje alapján feltételezhető, hogy kevesebb processzált mesterséges mikroRNS mellett alacsonyabb szinten transzgént expresszáló sejtek szelekciós előnyre tettek szert a májregeneráció során. Ezt az elképzelést az is alátámasztotta, hogy a

transzpozon-kópiaszám csökkenő tendenciát mutatott több pri-mikroRNS hairpin alkalmazásakor.

4.2.3. *hRas*^{G12V} onkogént overexpresszáló transzgenikus májak létrehozása

A *p53* csendesített, *hRas*^{G12V}-t overexpresszáló májakban az endogén *p53* szintjének 58%-os csökkenését tudtam kimutatni. Emellett a „driver” konstrukciót hordozó májakban a *Fah* expressziójának enyhe, de nem szignifikáns csökkenése volt észlelhető, míg a *HADHA/B* promóter B oldala által biztosított *hRas*^{G12V} transzkriptum szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a kontroll májakban mért GFP szintjénél, ami az upregulált Ras/Raf/MAPK útvonal kedvezőtlen hatásaira utal. Kísérleteinkben a korai HCC-k Gpc3-pozitívnak bizonyultak, míg a kontroll májak nem fejezték ki a Gpc3 tumormarkert.

4.2.4. A hepatocelluláris karcinóma hosszú távú paramétereinek jellemzése

Annak érdekében, hogy daganatképződést mutassunk ki egy egyébként nem tumoros környezetben, a *hRas*^{G12V}-t és *p53* mikroRNS-t hordozó „driver” konstrukciót egy olyan terápiás konstrukcióval kevertük, amely elősegíti a májregenerációt, de nem idéz elő tumorképződést. Az állatok oltását követő 5 hónap elteltével hipervaszkuarizált, előrehaladott májdaganatok alakultak ki. A tumorok hematoxilin-eozin festése során több, a HCC-re jellemző hisztopatológiai jegy volt megfigyelhető úgy, mint a tumorsejtekben történő lipidfelhalmozódás. Ezenfelül a májdaganatok immunhisztokémiai festése magas Gpc3-szintet és intenzív Afp-expressziót mutatott a kontroll, regenerált májakhoz képest, ami előrehaladott HCC kialakulására utal.

5. Diskusszió

A 2. kísérletsorozatban sikeresen karakterizáltam a *HADHA/B* kétirányú promótert *in vivo*, amely kiegyensúlyozott kétirányú aktivitást mutatott. A virális elemeket is hordozó mesterséges promóterek robusztus génexpressziót biztosítanak, azonban használatuknak hátrányai is vannak, például a rendellenesen magas expressziós szint okozta toxicitás, illetve a promóter metilációjának nagy valószínűsége, ami a transzgén expresszió meredek csökkenéséhez vagy a transzkripció kazetta teljes leállásához vezethet. A *HADHA/B* endogén promóter alkalmazásával a toxicitás elkerülhető, és mozaicizmus nélkül tapasztaltunk stabil transzgén expressziót. Egy ilyen sokoldalú biotechnológiai eszköz nemcsak a rákkutatásban, hanem génterápiában is értékes lehet, ahol terápiás fehérjék együttes, kiegyensúlyozott expressziójára van szükség.

Az U6-promóter által hajtott, génexpresszió *in vivo* csendesítésére széles körben alkalmazott shRNS-alapú géncsendesítés okozta toxicitás elkerüléséhez sikeresen optimalizáltuk a mesterséges mikroRNS-alapú géncsendesítést. Az optimalizálás során kulcsfontosságú volt elérni a mikroRNS-t hordozó transzkriptumok megfelelő mennyiségét, amelyek érés után az RNS-indukált csendesítő komplexbe (RISC) töltődnek a hatékony géncsendesítés érdekében, ugyanakkor nem okoznak nemkívánatos mellékhatásokat a kis RNS útvonalak túltelítésével. Ezért állatmodellünkben introni mikroRNS expressziót alkalmaztunk, amelynél a mikroRNS a transzgén kifejeződéssel párhuzamosan processzálódik anélkül, hogy gátolná a transzlációt.

Az RT-qPCR méréseim azt mutatták, hogy a *HADHA/B* promóter által hajtott mCherry-T2A-Fah és GFP expresszió megközelítőleg kilencszerese volt az *Rpl27* háztartási génről történő expresszióknak. Ez az expressziós szint elég magas ahhoz, hogy *in vivo* hatékony géncsendesítést biztosítson, de nem túl magas ahhoz, hogy megterhelje a kis RNS útvonalakat, szemben az U6 promóter által vezérelt, Pol-III mediálta expresszióval.

Kísérleteink egyértelmű különbséget mutatnak a mikroRNS-ek hatékonyságában a GFP (96%-os csendesítés) és a *p53* (egyetlen mikroRNS-sel 47%-os csendesítés) csendesítése között. Ennek oka a transzgenézis által érintett sejtpopulációval magyarázható. A GFP expressziója és csendesítése csak a transzgenikus sejtek populációját érintette, amelyek a máj sejteinek megközelítőleg felét jelentő hepatociták voltak. Ezzel szemben a *p53* mikroRNS-t csak a transzgenikus hepatociták hordozták, ugyanakkor a máj összes sejtje expresszálja a *p53*-at, és az RT-qPCR-t teljes máj homogenizátumokon végeztem. Ennek megfelelően, a hepatociták arányával történő korrekció a *p53* mikroRNS hatékonyságát a GFP mikroRNS szintjére emeli, ami igazolja rendszerünk konzisztens működését.

A hatékony géncsendesítés ellenére nem észleltünk daganatképződésre utaló jeleket a transzgenikus májakban, amely megfeleltethető az irodalmi adatoknak, mivel ismert, hogy mind a *p53* heterozigóta, mind a génkiütött egerek többnyire malignus limfómát fejlesztenek, de HCC-t nem.

A *HADHA/B* promóterrel létrehozott kétirányú transzkripció egységek alkalmazásával sikerült minden célsejtben egyidejűleg módosítanunk az összes vizsgált „driver” gén expresszióját, potenciális tumorindító góccokká alakítva azokat. Emellett a célsejtek számának maximalizálására a hiperaktív SB100X transzpozázt alkalmaztuk. Következésképpen transzgenikus egérmáj-modellünkben a tumoriniciáció nagyságrendekkel több sejtből indulhat meg, mint bármely korábbi modellben, ezáltal rendszerünket minden eddiginél alkalmasabbá téve a kis penetranciájú „driver” mutációk validálására.

A *hRas*^{G12V} overexpressziójával és a *p53* csendesítésével tumormodellt hoztunk létre, mivel mind a *Ras* onkogén aktivációja, mind a *p53* deregulációja számos rák „fémjegy” (Hallmarks of Cancer) kialakulásához hozzájárul, így ez a driver kombináció alkalmas arra, hogy megmutassa, a HCC egyes jellemzői miként jelennek meg a tumor kialakulása során.

Sikeresen igazoltuk a kontrollálatlan sejtosztódás megjelenését azáltal, hogy szignifikánsan több Fah-pozitív sejtet detektáltunk a *hRas*G12V mutáns izoforma jelenlétében 5 héttel az oltás után. Sikerült csendesítenünk a *p53*-at, amely a G1/S sejtciklus ellenőrző pont fő koordinátora, elkerülve ezzel az onkogén-indukálta szeneszenciát (OIS). Az OIS elkerülése megteremtette az alapot a két „driver” funkcionális szinergiájához. Továbbá a *p53* csendesítése által a tumorsejteket a rezisztensekké váltak sejthalállal szemben, és a kevert „driver” és terápiás transzpozonok együttes használata az injekciót követő 5 hónapra előrehaladott tumorok kialakulásához vezetett. Mind a konstitutívan aktív *hRas* overexpressziója, mind a *p53* funkcióvesztése a VEGF upregulációjához és az angiogenezis elősegítéséhez vezet, amit a tumorokon megjelenő elágazó, sérülékeny erek is bizonyítottak. Az előrehaladott HCC tumorok hematoxin-eozin festésén abnormalis kromoszómaszegregációt mutató tumorsejteket láthattunk, ami a genominstabilitás egyértelmű jele volt. Emellett a festésen egészséges májszövetbe infiltrálódó tumorsejtek is láthatóak, ami a metasztázisra való képesség egyértelmű bizonyítéka.

A fent felsorolt előnyöket figyelembe véve állatmodellünk alkalmas lehet gyógyszerjelöltek-molekulák *in vivo* hatékonyságának tesztelésére eltérő genetikai háttérű tumorokban, valamint más daganatellenes szerekkel kombinálva is.

Nemrégiben leírták, hogy a HCC-betegek több mint 80%-ának HR-deficiens tumora van. Ezenfelül a HBx virális fehérje HR deficienciát okoz, és öt HCC esetből négyben expresszálódik, mivel a HBV-fertőzés a HCC kialakulásának leggyakoribb oka. Ennek megfelelően egyre nagyobb az igény a szintetikus letalitáson alapuló PARP1-terápia hatékonyságának vizsgálatára a HCC kezelésében.

Az 1. kísérletsorozatunkban jelentős lépést tettem a POLE4 molekuláris szerepének megértésében a PARP-gátlók iránti érzékenység vonatkozásában. A kísérleti adataim alapján mind a PARP1, mind a POLE4 részt vesz az R-loop-ok feloldásában, de eltérő útvonalakon, ami megmagyarázza a PARPi-érzékenységet, a POLE4 hiányában. Ez a POLE4-et a PARP-gátlókon alapuló daganatterápiák ígéretes célpontjai közé emeli. Korábban a POLE4-et potenciális biomarkerként írták le HCC-ben.

Kísérleti rendszerünk így alkalmas lehet a PARPi-érzékenység/rezisztencia mögöttes molekuláris mechanizmusainak feltárására HCC-ben, különböző genetikai háttereken.

6. Az új eredmények összefoglalása

- Bemutattuk, hogy a POLE4 hiánya esetén az R-loop-ok számának megnövekedése hozzájárul a sejtek Olaparib érzékenységéhez.
- Sikeresen jellemeztük a *HADHA/B* kétirányú promóter kiegyensúlyozott aktivitását *in vivo*.
- A *HADHA/B* kétirányú promótert új kontextusban alkalmaztuk az *in vivo* szomatikus transzgenézis során.
- Az *EEF1A1* intronból expresszált mesterséges mikroRNS-ek alkalmazásával megoldottuk az *in vivo* géncsendesítés széles körben ismert toxicitási problémáit.
- Rendszerünk használhatóságát tumorbiológiai szempontból is bemutattuk: nagy áteresztőképességű platformot kínálunk a „driver” mutációk validálására, valamint több tumormodell párhuzamos, gyors és hatékony létrehozására.