

**A miRNS-ek szerepe a tüdő adenokarcinómában (LUAD),
valamint mikroarray adatok elemzése miRNS biomarkerek
azonosítása és molekuláris mechanizmusok feltárása
érdekében a LUAD karcinogenezisében.**

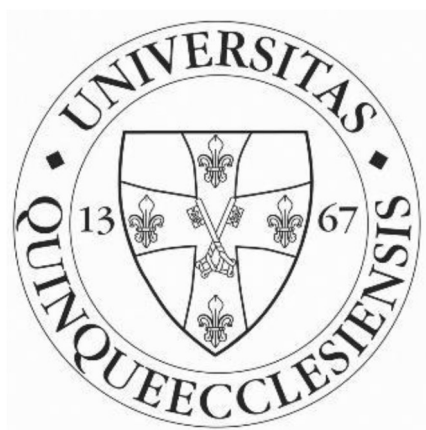
Doktori (Ph.D.) Értekezés

Yongan Song

A Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos

A Doktori Program vezetője: Prof. Dr. Kiss István

Témavezetők: Prof. Dr. Kiss István



Orvosi Népegészségügyi Intézet

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

Orvostudományi Kar, Pécsi Tudományegyetem, Pécs, Magyarország

Pécs

2025

Bevezetés

A tüdőrák az elmúlt néhány évtizedben világszerte jelentős közegészségügyi problémává vált, és a daganatos halálozások vezető oka, amely hatalmas kihívást jelent a modern onkológia számára. A daganatokhoz kapcsolódó halálozások jelentős részéért felelős világszerte, és az egyik legelterjedtebb tumorként tartják számon – évente körülbelül 2,2 millió új esetet regisztrálnak, melyek közül 1,8 millió végződik halállal. Szövettani szempontból a tüdőrák két típusra osztható: kissejtes tüdőrák (SCLC) és nem kissejtes tüdőrák (NSCLC). Ez utóbbi az összes tüdőrákok több, mint 80%-át teszi ki, és tovább osztható adenokarcinómára, laphámsejtes karcinómára és nagysejtes karcinómára. A tüdő adenokarcinóma (LUAD) a tüdőrák leggyakoribb formája, amely az esetek körülbelül 40%-áért felelős. Sajnos a legtöbb LUAD eset prognózisa továbbra is kedvezőtlen, mivel az LUAD diagnózisok mintegy kétharmada előrehaladott, inoperábilis stádiumban van, valamint a korai felismerés nehézségei és a hatékony kezelések hiánya miatt. Ezért elengedhetetlen a LUAD-hoz kapcsolódó biomarkerek és terápiás célpontok azonosítása a korai felismerés javítása és a tüdőrák célzott terápiájának elősegítése érdekében.

A mikroRNsek (miRNS) körülbelül 20-25 nukleotid hosszúságú, egyszálú, nem kódoló RNS-molekulák. A cél mRNS 3' nem transzlált régiójával (UTR) bázispárokat képezve képesek beavatkozni az mRNS transzlációjába, ami mRNS degradációhoz vagy a transzláció gátlásához vezet. Bár a miRNS-ek csupán az emberi genom 2%-át teszik ki, mégis kulcsszerepet játszanak a sejtek sorsának alakulásában. Emellett szabályozzák a gének közel egyharmadának kifejeződését, szinte minden biológiai folyamatban, beleértve az embriófejlődést, a sejtproliferációt, az apoptózist, az immunválaszokat és a tumorképződést. Egyre több bizonyíték hangsúlyozza a miRNS-ek sokoldalú szabályozó hatásait. A kutatások azt mutatják, hogy a miRNS-ek számos sejtszintű szabályozó funkcióval rendelkeznek, és több miRNS onkogénként vagy tumorsuppresszorként működik. Számos miRNS jelentős klinikai potenciált mutatott az onkológiában, különösen azok, amelyek több mRNS-hez képesek kötődni és azokat szabályozni, így ígéretes biomarkerekké válnak az onkológia területén.

A hosszú, nem kódoló RNS-ek (lncRNS-ek) 200 és 10 000 bázispár (bp) hosszúságú nem kódoló RNS-ek. Az lncRNS-ek nem transzlálódnak fehérjékké, hanem a célgének expresszióját transzkripció és poszttranszkripció szinten szabályozzák. Azonban az lncRNS-ek daganatokban betöltött egyértelmű szerepe további kutatásokat igényel. A kompetitív endogén RNS (ceRNS) hipotézis szerint az lncRNS-ek szivacszerű hatást fejthetnek ki a miRNS-ekre, és gyengíthetik azok mRNS-ekre gyakorolt hatását. Ezen túlmenően, tanulmányok kimutatták, hogy az lncRNS-ek, miRNS-ek és mRNS-ek hálózatai fontos szerepet játszanak a daganatok patogenezisében és progressziójában. Mindazonáltal a LUAD esetében csak igen ritkán találkozunk nagyobb minták vizsgálatával. Pedig a LUAD-hoz kapcsolódó miRNS-ek szűrése, valamint egy miRNS központú ceRNS hálózat felépítése rendkívül fontos a LUAD-ban szenvedő betegek korai diagnózisa és kezelése szempontjából.

Jelen PhD értekezésben először áttekintjük a miRNS-ek tüdő adenokarcinómában (LUAD) betöltött átfogó szerepét. A miRNS-ek kulcsszerepet játszanak a génszabályozásban, és a daganatkialakulásban való részvételüket széles körben tanulmányozták. Bár számos áttekintő cikk jelent meg a miRNS-ekről és a daganatokról, kifejezetten a LUAD-ra vonatkozóan még mindig nem áll rendelkezésre elegendő információ. Áttekintésünk ezt a hiányosságot pótolja azáltal, hogy átfogó összefoglalót nyújt jelenlegi ismereteinkről a LUAD progressziójában szerepet játszó miRNS-ekkel kapcsolatban. Nemcsak a miRNS-ek diagnosztikai, prognosztikai és terápiás jelentőségét emeljük ki a LUAD-ban, hanem átfogó áttekintést is nyújtunk a miRNS-ekkel foglalkozó kiterjedt kutatásokról is. Ezenkívül összeállítottunk egy függelék, amely szinte az összes, a tüdő adenokarcinóma kialakulásához és kezeléséhez kapcsolódó miRNS-t tartalmazza, megkönnyítve az ezekre vonatkozó további vizsgálatokat és a specifikus miRNS-ek és a LUAD közötti korrelációk feltárását. Ezt követően elemeztük az lncRNS-ek, miRNS-ek és mRNS-ek expresszióját LUAD esetében, a GEO adatbázisból származó génexpressziós profilok alapján. Továbbá bioinformatikai módszerekkel létrehoztunk egy LUAD-ra vonatkozó ceRNS-hálózatot, hogy új potenciális célpontokat találjunk a rákterápiához. A nagy áteresztőképességű mikroarray technológia széles körben használt eszközzé vált az

expressziós profilozásban; egyszerre több ezer gén expresszióját mérhetjük vele, és új rák biomarkereket azonosíthatunk. Ebben a tanulmányban átfogó elemzést végeztünk a miRNS, mRNS és lncRNS expresszióról a nyilvános GSE135918, GSE136043 és GSE130779 adatbázisok újraelemzésével. Azonosítottuk a LUAD mintákban a kontrollhoz képest differenciálisan expresszált miRNS-eket (DEMis), differenciálisan expresszált mRNS-eket (DEMs) és differenciálisan expresszált lncRNS-eket (DELs). Megpróbáltuk előre jelezni a DEMis és DEMs közötti interakciókat, majd funkcionális dúsítási analízist végeztünk a miRNS-gén szabályozó hálózatok és ceRNS hálózatok felépítéséhez. Átfogó bioinformatikai elemzésünk eredményeképpen azt vártuk, hogy új LUAD terápiás célpontokat és biomarkereket találunk.

A miRNS-ek szerepe a tüdő adenokarcinómában

A miRNS-ek kis, nem kódoló RNS-ek, amelyeket először 1993-ban a **Caenorhabditis elegans** tanulmányozása során azonosítottak. Gyorsan felismerésre került, hogy ezek a látszólag konzervált miRNS szekvenciák kulcsszerepet játszanak az eukarióták szabályozási folyamataiban. A miRNS-ek képesek beavatkozni az mRNS translációjába azáltal, hogy komplementer bázispárokat képeznek a cél mRNS 3' UTR-jával, ami mRNS degradációhoz vagy translációs gátláshoz vezet. A miRNS-ek körülbelül 70%-a saját miRNS-lokációkból íródik át, míg a fennmaradó részük fehérjekódoló gének intronjából származik. A legtöbb esetben a miRNS géneket a sejtmagban írja át az RNS polimeráz II (Pol II) enzim. Ez a primer miRNS (pri-miRNS) képződéséhez vezet, amely capping-en, splicing-en és poliadenilációs folyamatokon megy keresztül. Egy pri-miRNS vagy egyetlen miRNS-t, vagy két vagy több miRNS-t tartalmazó klasztert generálhat. Ezek a hosszú pri-miRNS-ek mikroprocesszor komplexum általi hasítást igényelnek, amely komplex elsősorban a DROSHA RNáz III enzimből és a DiGeorge szindróma kritikus régió 8 (DGCR8) kettős szálú RNS (dsRNS) kötőfehérjéből áll. A mikroprocesszor a dsRNS egyik szálát hasítja a pri-miRNS belsejében lévő hurok-törzs másodlagos struktúra alapján, és felszabadít egy hajtű alakú pre-miRNS-t, amely körülbelül 60-70 nukleotid hosszúságú.

Bár a mikroprocesszor alapvető komponensei, a DROSHA és a DGCR8, elengedhetetlenek szinte az összes miRNS biogeneziséhez a sejtekben, több kofaktor is szerepet játszik ebben a folyamatban. A pre-miRNS-t az 5-ös exportáló fehérje (XPO5) exportálja a sejtmagon kívülre a citoplazmába, majd a DICER1, egy RNáz III enzim dolgozza fel, amely a pre-miRNS-t mind a 5'- és 3'-végének hasításával alakítja át. A pre-miRNS miRNS-duplexekre hasad, és az egyik szála érett miRNS-sé alakul, amely az RNS-indukált csendesítő komplexumba (RISC) kerül, hogy negatív szabályozóként működjön a génexpresszióban. A másik szál végül degradálódik (1. ábra). A cél mRNS-ek miRNS-ek által indukált degradációja vagy translációs gátlása nagymértékben függ a miRNS 5'-seed szekvenciájának és az mRNS 3'-UTR elemének komplementaritásától. Továbbá a miRNS-biogenezis hibái is hozzájárulhatnak a

tumorigenezishez. Számos bizonyíték mutatja, hogy a miRNS-ek sokféle sejtszintű szabályozó szerepet töltenek be, és egyes miRNS-ek onkogénként vagy tumorszuppresszor géneként működnek. Több tanulmány igazolta, hogy az emberi daganatoknál, beleértve a LUAD-ot is, számos miRNS-t dysregulált. Ezért ezek a miRNS-ek potenciális diagnosztikus vagy prognosztikus markerekként szolgálhatnak, sőt, terápiás beavatkozásokban is szerepet játszhatnak. A miRNS-eket a daganatok klasszifikációjára is fel lehet használni, mivel a miRNS expressziós profilok a patológiai paraméterek hatékony indikátorai és megbízható biomarkerek a LUAD-ban.

Számos nyilvános miRNS adatbázis jött létre, amelyek különböző szempontok szerint összegyűjtik az annotált emberi miRNS-ek ezreiről szóló adatokat, beleértve a LUAD-hoz kapcsolódó egyre növekvő számú miRNS-t is. Növekvő érdeklődés mutatkozik a különböző testfolyadékokból származó miRNS-ek azonosítása és jellemzése iránt, mivel ezek a minták könnyen hozzáférhetők. A miRNS-ek szövetmintákból is beszerezhetők. A formalin-fixált és paraffinba ágyazott (FFPE) mintákból származó miRNS-ek nagyobb ellenállást mutatnak a degradációval szemben a mRNS-ekhez képest. Ennek következtében ezek a kórházakban tárolt minták jelentős előnyökkel bírnak a miRNS kutatásokhoz. Másrészt, bár a miRNS-ek izgalmas új célpontot jelentenek a rák kezelésében, a miRNS-ek terápiás alkalmazása kihívást jelent a specifitás hiánya miatt. Egy miRNS tipikusan egy génklasztter céloz meg, így az expresszió manipulálása nem kívánt következményekhez is vezethet.

A miRNS-ek ígéretes eszközként jelentek meg a daganatterápiában, mivel képesek több biológiai folyamat szabályozására. Számos miRNS diszregulációját figyelték meg különböző típusú rákokban, és még a szintjeik apró változásai is jelentősen befolyásolhatják a betegség kimenetelét. A LUAD kontextusában a miRNS-ek hatékony inhibitorokként működnek a génexpresszióban, hatékonyan gátolják a ráksejtek növekedését és túlélését. Továbbá, a miRNS-ek stabilitása a szérumban, plazmában és FFPE-tárolt mintákban nagyobb, mint az mRNS-eké, így ideális nem invazív biomarkerekként szolgálnak a betegség előrehaladásának nyomon követésére és altípusok osztályozására. Növekvő mennyiségű bizonyíték utal arra, hogy a miRNS-ek potenciálisan hatékonyak lehetnek a kemoterápiával indukált

gyógyszerrezisztencia ellen. Fontos azonban figyelembe venni, hogy a miRNS-alapú terápiák kiszámíthatatlan mellékhatásokat vonhatnak maguk után, mivel minden egyes miRNS számos mRNS-t célozhat meg, még a szándékolt specifikus cél-mRNS-en túl is. Ennek megfelelően csupán néhány miRNS jutott el klinikai vizsgálatokig, és szinte mindet elvetették, mielőtt a 3. fázisba értek volna. Ezen kívül a preklinikai vizsgálatok során néhány miRNS-t mind tumor szuppresszornak, mind onkogénnek találtak, ami azt jelzi, hogy mennyire fontos az a kifejeződési környezet, amelybe bevezetésre kerülnek. A daganatokkal kapcsolatos miRNS-ekhez tartozó downstream elemek azonosítása és azok megcélzása specifikusabban tervezett siRNS-ekkel ígéretesebb stratégiát jelenthet. Továbbá, az exozómákból származó miRNS-ek is nagyon ígéretesek lehetnek a LUAD diagnózisában, prognózisában és kezelésében. A LUAD-ban található exoszomális miRNS-ek további kutatása várhatóan növeli a korábban kevesebb figyelmet kapott miRNS-frakció megértését.

A kutatási eredmények klinikai gyakorlatba való hatékony átültetéséhez elengedhetetlen a miRNS biológia átfogó megértése. A kutatók olyan miRNS-jelzések azonosítására összpontosítottak, amelyek új betekintést nyújthatnak a régóta fennálló kérdésekbe. Azonban a miRNS-alapú terápiák biztonságának és hatékonyságának biztosítása érdekében szükség van a daganat helyszíneire való célzott szállításra, a ráksejtek általi hatékony felvételre és a nem szándékolt hatások minimalizálására. A miRNS-ek kimutatására vonatkozó szabványosított módszerek kidolgozása, a miRNS-ek és más genomi elemek közötti kölcsönhatások jobb megértése, valamint biokompatibilis, célzottan a tüdőléziókra irányuló szállító mechanizmusok kifejlesztése kiemelkedően fontos. Még mindig vannak akadályok, amelyeket le kell küzdeni a miRNS kutatás klinikai gyakorlatba való átültetésének útján. Azonban kitartó erőfeszítésekkel sikerülhet ezeket a kihívásokat leküzdeni, és a közeljövőben új korszakot nyithatunk a miRNS-ek átfogó alkalmazásában a LUAD-ban.

A tanulmány céljai

Egyre több kutatás mutatja, hogy a miRNS-ek részt vesznek a génszabályozásban. Számos miRNS-ről kimutatták, hogy befolyásolják a tüdőrák kialakulását és fejlődését. Jelen tanulmánynak a célja, hogy bioinformatikai elemzés segítségével új, a LUAD-hoz kapcsolódó miRNS-eket azonosítson, illetve feltárjon bizonyos molekuláris mechanizmusokat is.

A magas áteresztőképességű mikrorendszerek alkalmazása az expresszióprofilozáshoz széles körben elterjedt technológiává vált; ez lehetővé teszi több ezer gén expressziójának egyidejű mérését és új daganat-biomarkerek azonosítását. A tanulmányunkban átfogó elemzést nyújtunk a miRNS-ek, mRNS-ek és lncRNS-ek expressziójáról a GSE135918, GSE136043 és GSE130779 nyilvánosan hozzáférhető adatbázisok újraelemzésével. A kontroll-mintákhoz képest LUAD mintákban DEMi-eket, DEM-eket és DEL-eket azonosítottunk. Megpróbáltuk megjósolni a DEMi-k és a DEM-ek közötti kölcsönhatásokat, majd funkcionális gazdagítási elemzést végeztünk a miRNS-gén szabályozó hálózatok felépítésére. Átfogó bioinformatikai elemzés révén új terápiás célok és biomarkerek felfedezését várjuk a LUAD esetében.

Módszerek

1. Mikrorendszer Adatok

A génexpresszióval kapcsolatos adatbázisokat a GEO adattárból (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) szereztük be, amely egy nyilvános adatbázis, amely génexpressziós adatokat tartalmaz nagy áteresztőképességű kísérletekből. Az emberi miRNS-ek és mRNS-ek expressziós rekordjait, amelyek a tüdőrák szövetének és az azonos 5 tüdő adenokarcinómás beteghez tartozó szomszédos szövetek expressziós profiljait tartalmazzák, az NCBI GEO-ból szereztük be (GSE135918, GSE136043). A 8 tüdő-adenokarcinómás beteg lncRNS mikrorendszer adatait szintén az NCBI GEO-ból töltöttük le (GSE130779), amely ugyancsak tartalmazza a tüdőrák szöveteinek és szomszédos szöveteinek rekordját. A GEO adatbázisból származó adatok felhasználásához nincs szükség etikai bizottsági engedélyre.

2. Adat-előfeldolgozás és a differenciális expresszió szűrése

Az R platform GEOquery csomagját használtuk a miRNS, mRNS és lncRNS adatok letöltésére, majd az adatokat importáltuk az R statisztikai környezetbe. Az adatok előfeldolgozásához a limma csomagot használtuk, amely magában foglalta az expressziós mátrix, klinikai információk, platform annotációs fájlok kinyerését és a hiányzó adatokat tartalmazó rekordok törlését. A miRNS adatok esetében eltávolítottuk a nem humán miRNS-próbákat, és az adatokat log₂-re konvertáltuk. A lncRNS adatokat normalizálás és log₂ konverzió segítségével dolgoztuk fel. A platform annotációs információt a GEO adatbázisból szereztük be, és a chip-próba azonosítókat gén-szimbólumokká alakítottuk. Az expressziós mátrixot a daganatos szövetscsoport és a szomszédos nem daganatos csoport szerint osztottuk fel. A limma csomagot használtuk a génexpresszió különbségének p-értékének kiszámítására a daganatos szövetscsoport és a szomszédos nem daganatos csoport között, majd a különböző expressziójú miRNS-ek (DEMis), mRNS-ek (DEMs) és lncRNS-ek (DELs)

kiválasztására. A DEMi-k, DEM-ek és DEL-ek szűrésére a következő kritériumokat alkalmaztuk: $p\text{-érték} < 0,05$ és $\log_2 \text{fold change (FC)} > 1$. A DEMi-k, DEM-ek és DEL-ek vizualizálásához az R platformon a FactoMineR, factoextra, ggplot2, ggplotify és pheatmap csomagokat használtuk, hogy főkomponens-analízis (PCA) térképeket, vulkán térképeket és hő térképeket készítsünk.

3. Funkcionális feldúsulás elemzés

A clusterProfiler csomagot használtuk az R platformon a DEM-ek adataira vonatkozó és a Kyotoi Gén és Genom Enciklopédia (KEGG) útvonal-elemzésére. A funkcionális feldúsulás elemzésének eredményeit a tüdőrák szöveteinek molekuláris biológiai funkcióinak változásainak elemzésére használtuk.

4. A DEMi-k cél-lncRNS-einek és mRNS-einek előrejelzése

A lncRNS-ek és miRNS-ek közötti interakciót a DIANA Tools LncBase Predicted v.2 szoftverével jósoltuk meg. Az interakciós pontszám küszöbértékének 0,8-ra állításával a lncRNS-miRNS párok előrejelzett lncRNS-eit tovább szűrtük (a pontszám 0-tól 1-ig terjed), és megkaptuk a DEL-DEMi párok információját. Ezt követően a DEMi-k célzott mRNS-eit a MiRTarBase és a Targetscan adatbázisokból szereztük be. Mindkét miRNS referenciadatbázis megbízható. Ezen két adatbázis előrejelzési eredményei révén megkaptuk a DEMi-DEM párok információit.

5. A DEMi-k Validálása

A TCGA adatbázis gazdag klinikai információkat és miRNS-expresszió adatokat nyújt, hatalmas mintaméretből. Ezért a "TCGA-LUAD" adathalmazon keresztül szűrtük a GSE135918-ből nyert DEMi-ket. Az adatbázisból megszereztük a TCGA-LUAD klinikai információit és a miRNS-expresszió mennyiségi adatait tartalmazó fájlt (<https://portal.gdc.cancer.gov/>). Az R platformon a DESeq2 csomagot használtuk a daganatcsoport és a normál csoport közötti génexpresszió eltérés

p-értékének és log2 fold change értékének kiszámítására, hogy megerősítsük a GEO adatbázisból nyert DEMi-k eredményeit.

6. A ceRNA Hálózat Felépítése

A DEL-DEMi-DEM hálózatot a DEMi-k cél lncRNS-einek és mRNS-einek predikciós eredményeinek integrálásával rekonstruáltuk. A Cytoscape szoftvert használtuk a DEL-DEMi-DEM hálózat vizualizálására.

7. A DEMi-k Túlélési Elemzése

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, vajon a kiválasztott DEM-ek összefüggésben állnak-e a betegek összesített túlélésével, a TCGA LUAD adatokat használtunk. További két R csomagot, a survival-t és a survminer-t alkalmaztuk a DEM-ek összesített túlélési elemzésére. A betegeket magas és alacsony csoportokra osztottuk, és a miRNS-expresszió szintjeit a surv_categorize funkció segítségével rétegeztük az R platformon. Ezenkívül a diagram megmutatta a kockázati arányt 95%-os konfidenciaintervallummal (CI) és a p-értéket.

Eredmények

1. DEMi-k Azonosítása

Az elemzéshez a GSE135918-ból kiemeltük a miRNS adatokat. Öt tüdő adenokarcinómás beteg tüdőrákos szöveteiben és azok szomszédos szöveteiben vizsgáltuk a miRNS szintjeit. A miRNS log FC cutoff értéke 1 volt, míg a p-érték cutoff 0,05. A GSE135918-ban a hiányzó és duplikált adatok eltávolításával összesen 272 túlszabályozott és 353 alulszabályozott miRNS-t azonosítottunk. A Kiegészítő Digitális Tartalom (<http://links.lww.com/MD/H189>) egy teljes fájlt tartalmaz, amely az összes miRNS információt tartalmazza.

2. DEM-ek Azonosítása

Az mRNS adatokat a GSE136043-ból nyertük ki, és elemeztük az mRNS szintjeit tüdőrákos szövetekben és azok szomszédos szöveteiben öt tüdő adenokarcinómás betegnél. Annak érdekében, hogy pontosabban feltérképezzük a miRNS és az mRNS közötti kölcsönhatást, a miRNS és az mRNS adatok ugyanabból az öt betegmintából származtak. A miRNS-hez hasonlóan az mRNS log FC cutoff értéke 1 volt, a p-érték cutoff pedig 0,05. A GSE135918 adatokban eltávolítottuk a hiányzó és duplikált értékeket. Az elemzés eredményei azt mutatták, hogy 1659 mRNS túlszabályozott, míg 1476 mRNS alulszabályozott. Ezenkívül a teljes DEM-ek fájlt a Kiegészítő Digitális Tartalom (<http://links.lww.com/MD/H190>) tartalmazza.

3. DEL-ek Azonosítása

Az lncRNS adatokat a GSE130779-ből nyertük. Ez a tanulmány a lncRNS szintjeit vizsgálta a tüdőrákos szövetekben és azok szomszédos szöveteiben nyolc tüdő adenokarcinómás betegnél. A miRNS és az mRNS szűrési kritériumaihoz hasonlóan az lncRNS log FC cutoff értéke 1 volt, a p-érték cutoff pedig 0,05. Ezen kívül eltávolítottuk a hiányzó és duplikált értékeket az adatokból. Az R platformon a limma csomagot használtuk az összes lncRNS kifejezés szintjének normalizálására és

elemzésére. Az eredmények azt mutatták, hogy 4054 lncRNS túlszabályozott, míg 5543 lncRNS alulszabályozott. A teljes DEL-ek fájlt a Kiegészítő Digitális Tartalom (<http://links.lww.com/MD/H191>) tartalmazza.

4. A DEM-ek Funkcionális Gazdagításának Elemzése

Az R platformon a ClusterProfiler csomagot használtuk a KEGG analízisek elvégzésére a DEM-ek vonatkozásában, hogy feltárjuk a tüdő adenokarcinóma kialakulásában részt vevő lehetséges mechanizmusokat. A p-érték küszöbértékét 0,05-re állítottuk be, ami 70 KEGG jelátviteli pályát eredményezett (5. ábra). A teljes fájl a Kiegészítő Digitális Tartalom (<http://links.lww.com/MD/H192>) és Kiegészítő Digitális Tartalom (<http://links.lww.com/MD/H193>) tartalmazza, beleértve a GeneRatio, p-érték, geneID és számadatokat. Ezek közül a Wnt, PI3K-Akt és Notch jelátviteli pályák szerepet játszanak a tüdőrák fejlődésében.

5. MiRNA Szűrés

A legjelentősebb eltérő expresszióval rendelkező 50 felregulált és leregulált miRNS-t választottunk ki és igazoltuk a TCGA adatbázisban található miRNS adatokkal. Az összes klinikai információt a tüdő adenokarcinóma (TCGA-LUAD) miRNS expressziós kvantifikálásáról a következő linken töltöttük le: <https://portal.gdc.cancer.gov/>. Az eredmények azt mutatták, hogy 567 LUAD minta állt rendelkezésre, köztük 46 normál és 521 daganatos minta. A TCGA adatok összehasonlításakor a legfeljebb 50 alulregulált és 50 felülregulált miRNS-sel a következő 8 alulregulált DEMis (hsa-miR-101-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-451a, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-15b-5p, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-145-5p) és 6 felülregulált DEMis (hsa-miR-665, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-224-3p, hsa-miR-381, hsa-miR-3944-3p, hsa-miR-3652) azonosítható. Mivel ez a 14 miRNS differenciáltan expresszáldott mind a GEO, mind a TCGA adatbázisban, így magas fokú hitelességgel rendelkeznek. Annak érdekében, hogy elemezzük, vajon a 14 eltérő expressziójú miRNS kapcsolódik-e a tüdőrák kialakulásához, kiválasztottuk a Wnt

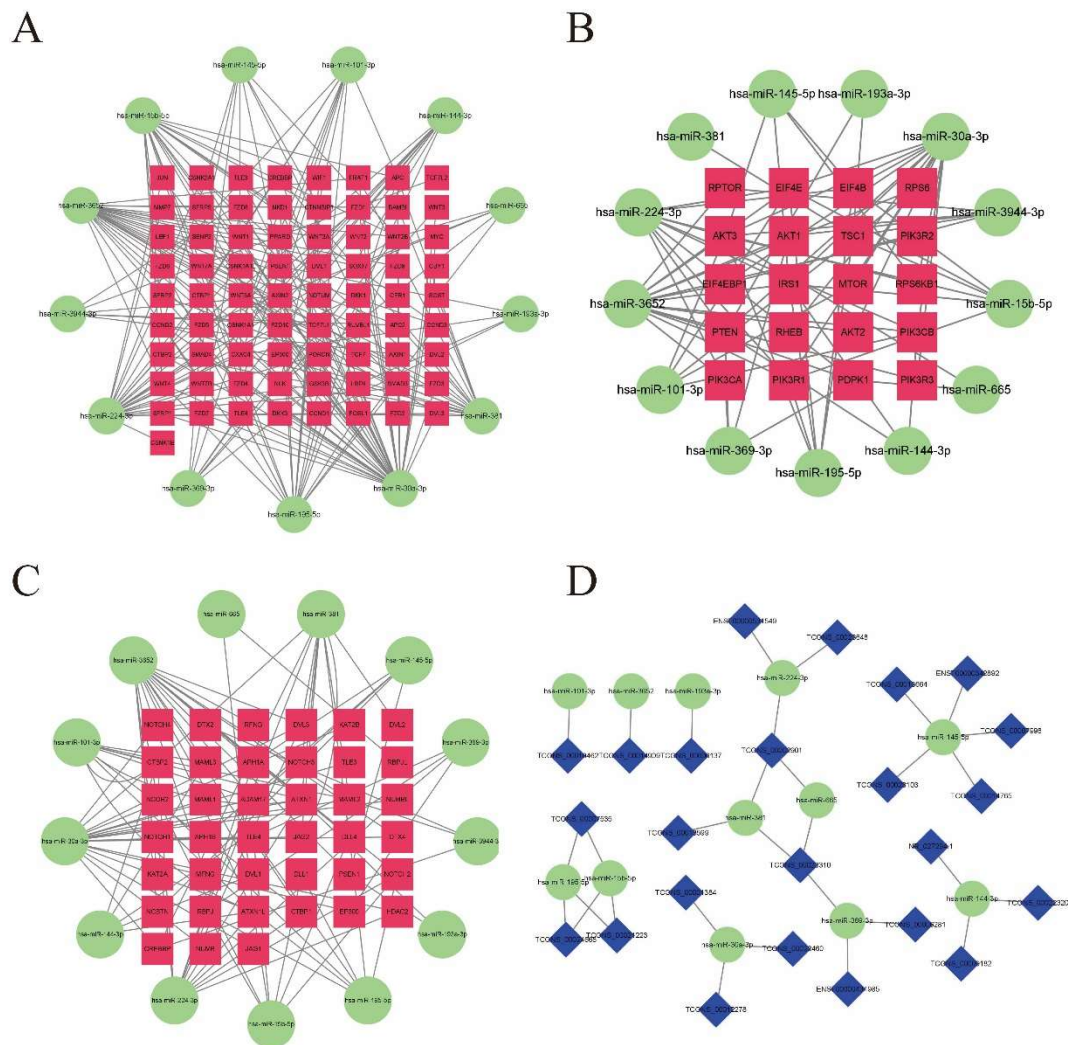
jelátviteli pályához, a PI3K-Akt jelátviteli pályához és a Notch jelátviteli pályához kapcsolódó mRNS-eket a miRNS által előre jelzett cél mRNS-ek közül, hogy felfedezzük az interakciókat a miRNS és e három jelátviteli pálya között.

6. CeRNA Hálózat Építése

A Targetscan és a MiRBase eszközöket használtuk a 14 azonosított miRNS célgéneinek előrejelzésére. Ezekből a célgénekből kiválasztottuk a kulcsfontosságú mRNS-eket a fent említett három jelátviteli pályáról. E 14 miRNS-t és a kulcsfontosságú mRNS-eket felhasználva megépítettük a miRNS-mRNS szabályozó hálózatot (lásd: 1A, 1B, 1C ábra). Ezután a LncBase Predicted v.2 eszközt, amely a DIANA Tools része, használtuk az lncRNS-ek és miRNS-ek közötti interakciók előrejelzésére. Azok az lncRNS-ek kerültek kiválasztásra, amelyek kölcsönhatásba lépnek e 14 miRNS-sel, és megépítettük az lncRNS-miRNS szabályozó hálózatot (lásd: 1D ábra).

7. Túlélési Elemzés

A TCGA adatbázist és az R csomagot használtuk a kiválasztott DEMis értékelésére. Eredményeink azt mutatták, hogy a hsa-miR-101, hsa-miR-195, hsa-miR-30a, hsa-miR-145 alacsony expressziós szintje ($p < 0,05$) rossz overall survival-t (OS) jelez a LUAD esetében. Ezzel szemben a hsa-miR-381, hsa-miR-3944 magas expressziós szintje ($p < 0,05$) szintén rossz OS-t mutatott a LUAD esetében. Ezután a Kaplan-Meier Plotter (<http://kmplot.com/>) alkalmazást használtuk az OS elemzés elvégzésére a hsa-miR-101, hsa-miR-195, hsa-miR-30a, hsa-miR-145, hsa-miR-381, hsa-miR-3944 esetében. Ugyanez az eredmény jelenik meg a Kaplan-Meier Plotterben.



1. ábra: CeRNA szabályozó hálózat a LUAD-ban.

Megbeszélés

A tanulmányunkban a GEO adatbázis felhasználásával öt tüdő adenokarcinómás páciens daganatos szöveteiből és szomszédos normál szöveteiből származó miRNS- és mRNS-mikroarray adatokat elemeztünk. Azáltal, hogy a miRNS- és mRNS-adatokat ugyanazoktól a betegektől választottuk ki, célunk a miRNS-ek és a tüdőrák közötti kapcsolat jobb elemzése és előrejelzése volt. A miRNS- és mRNS- kifejeződési profilok integrált elemzése összesen 625 különböző mértékben kifejeződött miRNS-t (DEMi) tárt fel, beleértve 272 felfelé szabályozott és 353 lefelé szabályozott miRNS-t. Ezenkívül 3135 különböző mértékben kifejeződött mRNS-t (DEMs) is azonosítottunk, amelyből 1659 túlszabályozott és 1476 alulszabályozott mRNS volt. Ezek az azonosított mRNS-ek és miRNS-ek jelentős szerepet játszanak 70 jelátviteli útvonalban. Különösen a Wnt jelátviteli útvonal, a PI3K-Akt jelátviteli útvonal és a Notch jelátviteli útvonal szerepe áll kapcsolatban a tüdőrák fejlődésével és progressziójával. Ezen útvonalak megértése az általunk kiválasztott öt tüdőrákos páciens kontextusában mélyebb betekintést nyújthat a LUAD mögötti mechanizmusokba. Továbbá megvizsgáltuk az 50 legnagyobb mértékben túl- és alulszabályozott miRNS-t, és validáltuk őket a TCGA-LUAD adatbázis használatával. Ez a validálás 14 miRNS-t tárt fel, amelyeket a TCGA-LUAD adatbázisban is különböző mértékben kifejezettek, beleértve 8 alulszabályozott és 6 túlszabályozott miRNS-t. E 14 miRNS jelenléte mindkét adathalmazban arra utal, hogy kulcsszerepet játszhatnak a LUAD patogenezisében, és potenciálisan értékes biomarkerek lehetnek a betegségben. Összegzésként megállapításaink hangsúlyozzák a specifikus miRNS-ek és azok szabályozó szerepeinek fontosságát a tüdő adenokarcinómában. E miRNS-ek további funkcionális vizsgálatai tisztázhatják működési mechanizmusukat és hozzájárulásukat a tüdőrák biológiájához, így utat nyithatnak új terápiás stratégiák és diagnosztikai eszközök számára a LUAD kezelésében.

Ezután a Targetscan és a MiRBase adatbázisokat használtuk az említett 14 miRNS célgéneinek előrejelzésére. Három, a daganatkialakulásban releváns jelátviteli útvonalat (Wnt, PI3K-Akt és Notch) választottunk ki, és megvizsgáltuk az ezeken a

pályákon részt vevő fehérjéket, amelyek potenciális céljai lehetnek a fent említett miRNS-eknek.

A 8 lefelé szabályozott miRNS közül a hsa-miR-30a-3p célgénei gazdagok a Wnt jelátviteli útvonalban, beleértve a WNT, FZD, DVL, LEF, CCND, PLC és más családhoz tartozó mRNS-eket. E gének magas expressziója aktiválhatja a Wnt jelátviteli útvonalat, elősegítve a tüdő adenokarcinóma kialakulását. A hsa-miR-30a-3p alacsony expressziója növelheti e mRNS-ek expresszióját, ezáltal elősegítve a Wnt jelátviteli útvonal aktiválódását. Ezen kívül a FZD4 és DVL1 a hsa-miR-144-3p célgénjei. A hsa-miR-195-5p és hsa-miR-15b-5p célgénei közé tartozik a WNT2B, WNT3A, WNT4, WNT7A, FZD4, FZD6, CCND1, CCND2 és CCND3. A hsa-miR-145-5p célgénjei közé tartozik a WNT2B, FZD4 és CCND2. Ezek a gének pozitívan szabályozzák a Wnt jelátviteli útvonalat. Ezután elemeztük a túlszabályozott miRNS-eket. A hsa-miR-665 célgénei között szerepel a SOST, SOX17 és NLK. A hsa-miR-369 célgénei a NKD1, GSK3B és TLE4. A hsa-miR-224 célgénei közé tartozik a DKK1, SFRP1, SFRP2, CXXC4, GSK3B, CTBP1, CTBP2. A hsa-miR-381 célgénei között szerepel a SOST, DKK3, SFRP2, CXXC4, CTBP2 és NLK. A hsa-miR-3652 célgénei a SFRP5, NOTUM, NKD1, AXIN1, APC2, CTNNBIP1, SOX17, CTBP1. Ezek a mRNS-ek negatívan szabályozzák a Wnt jelátviteli útvonalat. E miRNS-ek magas expressziója csökkentheti e célgének kifejeződését, aktiválva a Wnt jelátviteli útvonalat.

A miRNS-ek (8 alulszabályozott és 6 túlszabályozott miRNS) és a PI3K-Akt jelátviteli útvonal közötti kapcsolatot is elemeztük. A hsa-miR-30a-3p képes célba venni a PI3K, AKT, MTOR és más fontos géneket a PI3K-Akt jelátviteli útvonalban. A 8 alulszabályozott miRNS közül a hsa-miR-30a-3p-nek van a legnagyobb számú célgénje a PI3K-Akt jelátviteli útvonalban. A hsa-miR-101-3p célgénjei közé tartozik a PIK3CB, AKT3 és MTOR. A hsa-miR-144-3p célgénjei az IRS1 és a PIK3CB. A hsa-miR-15b-5p és hsa-miR-195-5p célgénjei az IRS1, PIK3R1 és AKT3. A hsa-miR-145-5p célgénjei között szerepel az IRS1 és AKT3. E gének aktiválhatják a PI3K-Akt jelátviteli útvonalat, és a fenti miRNS-ek alacsony expressziója a gének felfelé szabályozódását eredményezheti. A 6 túlszabályozott miRNS esetében számos

kulcsfontosságú daganatellenes gént elemeztünk. A PTEN a hsa-miR-224-3p és a hsa-miR-369-3p célgéne. A hsa-miR-3652 célgénjei közé tartozik a TP53, MAGI és PTEN. A MAGI és TSC1 a hsa-miR-3944 célgénjei. E miRNS-ek túlszabályozódása a TP53, MAGI, TSC1 és PTEN expressziójának elvesztéséhez vezethet.

Végül elemeztük a miRNS és a Notch jelátviteli útvonal közötti kapcsolatot. A DLL1, DLL4, NOTCH2 és RBPJ a hsa-miR-15b-5p és hsa-miR-195-5p célgénjei. E két miRNS alacsony expressziója a Notch jelátviteli útvonal aktiválódásához vezethet.

Ezek a 14 miRNS szerepet játszhat a LUAD patogenezisében, és potenciálisan biomarkerként szolgálhatnak a rosszindulatú daganat számára. A 8 alacsonyabb expressziójú miRNS közül mindegyikről közölték már, hogy csökkent kifejeződést mutat rákban vagy daganatgátló hatású. Különösen a hsa-miR-101-3p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-144-3p, hsa-miR-193a-3p és hsa-miR-145-5p lettek daganatgátlóként azonosítva a tüdőrákban. Tanulmányunk tovább erősítette ezen miRNS-ek szerepét a tüdő adenokarcinómában, és új, megbízható molekuláris mechanizmusokat tart fel a hatásuk magyarázatára. A hsa-miR-30a különösen figyelemre méltó volt, mivel alacsony kifejeződés mértéke szoros összefüggésben állt a rossz túlélési arányokkal (OS) LUAD esetén ($p < 0.001$). A hsa-miR-30a-3p gátolhatja a tüdőrák megjelenését és progresszióját a Wnt és Akt jelátviteli útvonalakon keresztül, így ígéretes biomarker lehet LUAD esetén. Bár a hsa-miR-451a és hsa-miR-15b-5p gátló szerepet játszanak a daganatokban, e két miRNS-el kapcsolatban a tüdő adenokarcinóma kontextusában korlátozott számú kutatás áll rendelkezésre. Ezek potenciálisan új daganatmarkerekké válhatnak a betegség számára. A 6 fokozottan kifejeződő miRNS közül a hsa-miR-665, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-224-3p és hsa-miR-381 emelkedett kifejeződést mutatnak a rákban. A hsa-miR-665, hsa-miR-224-3p és hsa-miR-381 daganatkeltőként funkcionálnak a tüdőrákban. Tanulmányunk tovább erősítette e miRNS-ek szerepét a tüdő adenokarcinómában, és további potenciális molekuláris mechanizmusokat írt le. Bár a hsa-miR-369-3p daganatkeltőként már azonosítva lett, a tüdő-adenokarcinómában betöltött szerepéről eddig nem végeztek kutatást. A Wnt jelátviteli úttal való szoros kapcsolata azonban azt jelzi, hogy kulcsfontosságú gén lehet ezen a területen. Ezenkívül eredményeink az

elsők, amelyek a hsa-miR-3944 és hsa-miR-3652 magas expressziós szintjeit találták LUAD-ban, és egyúttal megjósolták célgénjeiket. Különösen a hsa-miR-3944 magas kifejeződési szintje áll összefüggésben a rossz túlélési arányokkal. Jelenleg nincs kutatás a hsa-miR-3944 rákos kontextusban, ami jelzi, hogy ez új biomarker lehet a tüdő adenokarcinóma számára. Ez a kutatás értékes referenciát nyújt a miRNS-hez kapcsolódó biomarkerek szűréséhez a tüdőrák diagnózisában és kezelésében.

A doktori disszertációm új megállapításai

1 Átfogó áttekintés: Áttekintésünk jelentős hiányt pótol a szakirodalomban, amely a miRNS-ek szerepét tárgyalja a tüdő adenokarcinómában (LUAD), átfogó szintézist nyújtva a LUAD progressziójában érintett miRNS-ek aktuális kutatásairól.

2 Kulcsfontosságú miRNS-ek azonosítása: Azonosítottunk 14 miRNS-t, amelyek kapcsolódnak a tüdő adenokarcinómához, és mélyebben megvizsgáltuk a LUAD karcinogenezisének molekuláris mechanizmusait. Ezenkívül felfedeztük, hogy ezek közül 7 miRNS a rossz túlélési arányhoz (OS) is kapcsolódik LUAD esetében.

3 Kísérleti validáció: A 14 azonosított miRNS közül 9-nél kísérletileg igazoltak a tüdőrák patogenezisében játszott szerepükben. Tanulmányunk nemcsak megerősíti ezeket a megállapításokat, hanem új molekuláris mechanizmusokat is feltár az érintett miRNS-ek daganatokkal kapcsolatos szerepében.

4 Kevésbé miRNS-ek elemzése: A 14 azonosított miRNS közül háromról már korábban leírták daganatokkal való kapcsolatát. Ezeket a miRNS-eket azonban ritkán tanulmányozták tüdő adenokarcinómában. Ezt a három miRNS-t potenciális biomarkerként elemeztük LUAD-ra, és megvizsgáltuk lehetséges molekuláris mechanizmusait.

5 Új biomarkerek: Eredményeink első alkalommal számolnak be arról, hogy a hsa-miR-3944 és hsa-miR-3652 magas expressziót mutatott LUAD esetén. A hsa-miR-3944 magas szintje a rossz OS-hez is kapcsolódott. A hsa-miR-3944 és hsa-miR-3652 új biomarkerként szolgálhatnak LUAD esetén.

6 Átalakító potenciál: Tanulmányunkban feltárt miRNS-ek jelentős potenciállal bírnak a tüdőrák kezelésének területén, olyan meglátásokat kínálva, amelyek katalizálhatják új terápiák és a korai stádiumú betegség biomarkereinek kifejlesztését.

Publikációk listája

Doktori disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

1 Song Y, Kelava L, Kiss I. MiRNAs in Lung Adenocarcinoma: Role, Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 27;24(17):13302. doi: 10.3390/ijms241713302. PMID: 37686110. (IF=5.6, Q1)

2 Song Y, Kelava L, Zhang L, Kiss I. Microarray data analysis to identify miRNA biomarkers and construct the lncRNA-miRNA-mRNA network in lung adenocarcinoma. *Medicine (Baltimore).* 2022 Sep 9;101(36):e30393. doi: 10.1097/MD.00000000000030393. PMID: 36086747. (IF=1.817, Q3)

Egyéb publikációk:

Zhang L, Pozsgai É, **Song Y**, Macharia J, Alfatafta H, Zheng J, Li Z, Liu H, Kiss I. The relationship between single nucleotide polymorphisms and skin cancer susceptibility: A systematic review and network meta-analysis. *Front Oncol.* 2023 Feb 15;13:1094309. doi: 10.3389/fonc.2023.1094309. PMID: 36874118. (IF=4.7, Q2)

Köszönetnyilvánítás

Ahogy az idő gyorsan telik, az öt éves doktori képzés hamarosan a végéhez érkezik, és csupán egy pillanatnak tűnik. Ez alatt az időszak alatt számos élményt szereztem és felbecsülhetetlen tudásra tettem szert. Szeretném ezt szívből megköszönni kiváló PhD mentoromnak, Kiss István professzornak. Öt évvel ezelőtt Kiss István professzor kedvesen felajánlotta nekem a lehetőséget, hogy megkezdhessem a doktori képzést, ezzel irányítva engem a doktori tanulmányok mélyreható útján. Kiss István professzor, mint mentor, a melegség és a tisztelet megtestesítője. Emellett a tudományos kutatás szenvedélyes híve, különösen az intellektuális képességek fejlesztésében, kihívások elé állításában és finomításában. Doktori tanulmányaim során Kiss István professzor tudása és a tudományos szigor iránti elkötelezettsége rendkívüli mértékben gazdagította tanulási élményemet. Doktori képzésem alatt folyamatosan támogatta az ötleteimet, és felbecsülhetetlen útmutatást nyújtott. Az akadémiai kereteken túl Kiss István professzor életvezetési leckéket is adott, segítve ezzel a személyes fejlődés útjának kijelölésében. Amikor visszatekintek erre az élethelyzetre, rendkívül szerencsésnek érzem magam, hogy Kiss István professzor mentorom volt.

Szeretném kifejezni hálámat a tanszék munkatársainak: dr. Gyöngyi Zoltánnak, Varga Csaba professzornak, dr. Kiss (Orsós) Zsuzsannának, Csörge Tímeának, Zhang Lu doktornak és más kollégáimnak. Hálás vagyok a segítségükért és az együtt eltöltött kellemes emlékekért a laboratóriumi munka során. Az öt évem alatt Magyarországon nyújtott türelmes támogatásuk felbecsülhetetlen volt. Akár a tanulás, a munka, vagy az élet bonyolult útvesztőjében való navigálás során, lelkesedésük mindig magabiztosságot és életem iránti szeretetet öntött belém egy idegen országban.

Végül szeretném kifejezni hálámat a családomnak: szüleimnek, akik belém ültették az emberiséget, a tiszteletet, a kemény munkát és a szerénység értékeit; drága nővéremnek, fiútestvéreimnek és legközelebbi barátaimnak, akik úgy fogadtak el, ahogy vagyok.