

Szegedi Tudományegyetem

Természettudományi és Informatikai Kar

Biokémiai és Molekuláris Biológiai Tanszék

és

HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Genetika Intézet, Tumor Genom Kutatócsoport

37. OTDK Biológia Szekció helyi TDK forduló

L1 retrotranszpozonok szerepének vizsgálata karcinogenezisben *in vivo*
modellrendszer segítségével

Vecsernyés Kitti

Molekuláris Biológia Msc. Szak II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Mátés Lajos

Csoportvezető, Tudományos főmunkatárs

Belső konzulens:

Dr. Huliák Ildikó

Szeged

2024.

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések listája	4
2	Bevezető	5
2.1	Genotoxikus anyagok, tumorgenezis	5
2.1.1	Genotoxinok mechanizmusának térképezésére eddig használt módszerek	6
2.1.2	Genotoxicitási vizsgálatok korlátai	7
2.2	Transzpozonok, retrotranszpozonok	8
2.3	L1 retrotranszpozonok áttekintése	9
2.3.1	Az L1 elemek szabályozása csírasejtekben	11
2.3.2	Szomatikus L1 események	12
2.3.3	Szomatikus retrotranszpozíció detektálására alkalmas modellrendszer	14
2.4	L1 elemek szomatikus működésének szabályozása	16
2.5	L1 retrotranszpozíciók monitorozására alkalmas esszék	17
2.5.1	<i>In vitro</i> esszék	18
2.5.2	<i>In vivo</i> esszék	18
2.6	Laborunkban használatos <i>in vitro</i> és <i>in vivo</i> technikák	20
2.7	Lipid nanopartikulumok áttekintés	21
2.8	mRNS LNP-k áttekintése	21
2.8.1	Felépítésük	22
2.8.2	Működési elvük	23
2.8.3	ALC-0315 mRNS-LNP	24
3	Célkitűzés	25
4	Anyagok és módszerek	26
4.1	Állatok gondozása és tartása	26

4.2	L1 monitorozására tervezett ORFeus riporter	26
4.3	A plazmidok előkészítése és hidrodinamikai farokvéna injektálás.....	26
4.4	A retrotranszpozíciót feltehetően indukáló vegyületek adagolása	26
4.5	Sztereomikroszkópos képalkotás.....	27
4.6	A szomatikus L1 retrotranszpozíciós aktivitás mérése <i>in vivo</i>	27
4.7	Létrehozott Lipid Nanopartikulum	27
4.8	Az mRNS-LNP bejuttatása, kimutatása	27
4.9	Adatok statisztikai kiértékelése, és vizualizációja.....	28
5	Eredmények.....	29
5.1	A kemikáliákkal történő kezelések eredményei	29
5.2	<i>In vivo</i> mCherry szenzitív immunhisztokémia	31
6	Jövőbeli tervek.....	35
7	Diszkusszió.....	36
8	Köszönetnyilvánítás	37
9	Irodalomjegyzék	38

1 Rövidítések listája

AhR - aryl-hidrogén receptor

Alu - *Arthrobacter luteus* restrikciós endonukleáza

amiR – kis RNS molekulák

ChIP - kromatin immunprecipitáció

DMSO - Dimethyl Sulfoxide

DNS – dezoxiribonukleinsav

DOPE – 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-foszfoetanolamin

DSPC - 1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfocholin

EGFP/GFP- zöld fluoreszcens fehérje

EMMA - Európai Egér Mutáns Archívum/
European Mouse Mutant Archive

FAH - Fumaril acetoacetát hidroláz

FICZ - (6-formilindolo[3,2-b]karbazol)

G418 – Neomicin

IHC - Immunhisztokémia

ISG - interferon-stimulált gének

L1 – LINE-1, Long Interspersed Nuclear Elements/ Hosszú megszakított nukleáris elemek

LNP - lipid nanopartikulumok

LTR - hosszú terminális ismétlődések

MelQx - (2-amino-3,8-dimetil-imidazo[4,5-f]quinoxalin)

mRNS – messenger/ hírvivő RNS

Nem-LTR - nem rendelkezik hosszú terminális ismétlődéssel

NTBC - Orfadin® Nitisinone

ORF – nyílt leolvasási keret

ORF1p – Nyílt leolvasási keret 1 fehérje

ORF2p - Nyílt leolvasási keret 2 fehérje

PCR – Polimeráz Lánc Reakció

PEG – polietilénglikol

piRNS - Piwi-interaktáló RNS

RISC - RNS-indukált csendesítési komplexet

RNApolIII - RNS polimeráz II

RNP – ribonukleoprotein részecske

RNS – ribonukleinsav

SB - Sleeping Beauty, Transzpozon rendszer

SB100 - Hiperaktív Sleeping Beauty Transpozáz

SINE - Short Interspersed Nuclear Elements/
Rövid megszakított nukleáris elemek

siRNS – kis interferáló RNS

TPRT - célzott primeres reverz transzkripció

2 Bevezető

A rák, mint súlyos egészségügyi probléma, egyre nagyobb figyelmet kap világszerte. Az Európai Unióban és Magyarországon is a vezető halálokok között szerepel. Ennek hátterében komplex biológiai folyamatok állnak, amelyek során a sejtek genetikai állománya olyan mértékben megváltozik, hogy a sejtek kontrollálatlan szaporodásra és a környező szövetekbe való behatolásra képesek lesznek.[1]

A rák kialakulásának alapja a sejtek genetikai állományában bekövetkező változásokban keresendő. Ezek a változások lehetnek öröklöttek vagy a környezeti hatások, például a dohányzás, a sugárzás vagy bizonyos vegyi anyagok hatására alakulhatnak ki. A legfontosabb genetikai változások az onkogének aktiválódása és a tumorszupresszor gének inaktiválódása. Az onkogének a sejtnövekedést serkentik, míg a tumorszupresszor gének gátolják. Amikor ezekben a génekben mutációk lépnek fel, a sejtek kontrollálatlan szaporodásnak indulhatnak.

Az epigenetika is fontos szerepet játszik a rák kialakulásában. Az epigenetikai változások nem a DNS szekvenciájának megváltozását jelentik, hanem a gének kifejeződését befolyásoló mechanizmusok változását. Ilyen például a DNS metilációja, amely egyes gének csendesítéséhez vezethet.

A rák genetikai alapjainak megértése alapvető fontosságú a betegség megelőzésében, diagnosztizálásában és kezelésében. A genetikai vizsgálatok segítségével azonosíthatók azok a személyek, akiknél fokozott a rák kialakulásának kockázata. Emellett a rákos sejtek genetikai profiljának ismeretében személyre szabott kezelési tervek állíthatók össze. A célzott terápiáknak köszönhetően olyan gyógyszerek fejleszthetők, amelyek a rákos sejtek specifikus molekuláris eltéréseit támadják meg, így csökkentve a mellékhatásokat és növelve a kezelés hatékonyságát.[2]

2.1 Genotoxikus anyagok, tumorigenezis

A genotoxikus anyagok olyan vegyületek, amelyek képesek károsítani a sejt genetikai anyagát, a DNS-t. Ez a károsodás különböző formában jelentkezhet: DNS-szálak törése, bázispárosodási hibák, vagy a DNS szerkezetének megváltozása. A genotoxikus hatások súlyossága és következményei széles skálán mozoghatnak, a sejthaláltól a rák kialakulásáig.

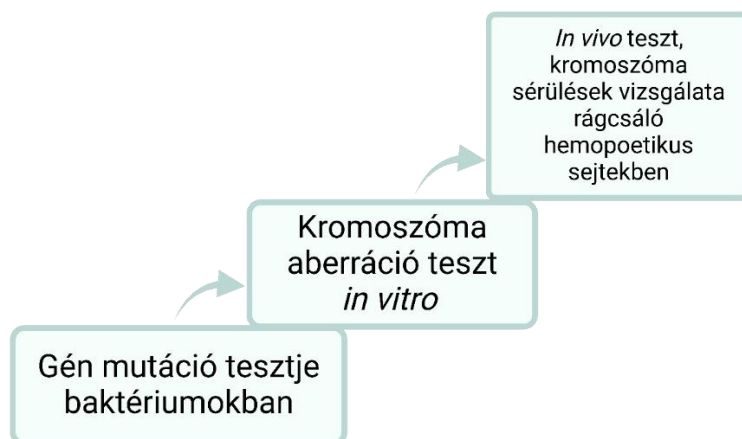
Ezek az anyagok széles körben elterjedtek a környezetünkben és az iparban. Találkozhatunk velük a mindennapi életben is, például a dohányfüstben, bizonyos élelmiszerekben, vagy egyes ipari anyagokban. A genotoxikus anyagok lehetnek fizikai ágensek, mint például az ionizáló sugárzás vagy az ultraibolya sugárzás, kémiai anyagok, mint a benzol vagy a formaldehid, vagy biológiai ágensek, mint egyes vírusok vagy baktériumok.

A genotoxikus anyagok különböző mechanizmusokkal károsítják a DNS-t. Egyes anyagok közvetlenül lépnek kölcsönhatásba a DNS-sel, míg mások a szervezetben lebomolva alakítanak ki károsító anyagokat. A károsodás következtében a sejtek működése felborulhat, ami mutációkhoz, fejlődési rendellenességekhez, sejthalálhoz vagy kontrollálatlan sejtszaporodáshoz, azaz rák kialakulásához vezethet.[3]

A genotoxikus anyagok az emberre és a környezetre egyaránt jelentős veszélyt jelentenek. A genotoxicitás vizsgálatok és a kockázatbecslés kulcsfontosságúak a káros hatások megelőzésében. [4]

2.1.1 Genotoxinok mechanizmusának térképezésére eddig használt módszerek

A genotoxikus anyagok kockázatának felmérése során fokozatosan növekvő komplexitású biológiai rendszereket alkalmaznak. Az egyszerűbb, baktériumokon alapuló vizsgálatok után sejtkultúrákon végzett *in vitro* tesztek következnek. Az *in vitro* vizsgálatok eredményei alapján döntés születhet arról, hogy szükséges-e további, *in vivo* állatkísérleteket végezni az anyagok hatásmechanizmusának teljesebb megértése érdekében.



1. Ábra: Genotoxicitási vizsgálatok általános sorrendje [3]

<i>In Vitro</i> vizsgálatok		<i>In Vivo</i> vizsgálatok	
Bakteriális tesztek	Az egyik leggyakrabban használt módszer. Bakteriális törzseket alkalmaznak, amelyek érzékenyek a mutációkra. Ha a vizsgált anyag mutagén, akkor képes lesz növelni a mutáns baktériumok számát. Pl. Ames-teszt	Egér-mikronukleusz teszt	Az egér csontvelőjében lévő vörösvérsejtekben kialakuló mikronukleuszok számát vizsgálják. A mikronukleuszok a kromoszómátörések vagy a nem megfelelő kromoszóma-eloszlás következményei lehetnek.
Élesztő genetikai tesztek	Az élesztő sejtek egyszerűségük és genetikai manipulálhatóságuk miatt alkalmasak a genotoxikus hatások vizsgálatára.	Egér-spermatogén sejt kromoszóma aberráció teszt	Az egér ivarsejtjeiben bekövetkező kromoszóma elváltozásokat vizsgálják.
Emlősejt-mutáció tesztek	Egér vagy emberi eredetű sejtvonalakat használnak. Ezek a tesztek lehetővé teszik a különböző típusú DNS-károsodások kimutatását.	Egér-domináns letális mutáció teszt	Az egér utódai között a halálozási arányt vizsgálják, amely a szülői ivarsejtekben bekövetkezett mutációkra utalhat.
Kromoszóma aberráció tesztek	A vizsgált anyag hatására bekövetkező kromoszóma elváltozásokat vizsgálják.		
DNS-károsodás vizsgálatok	A Comet assay egy érzékeny módszer a DNS-szálak törésének és egyéb károsodások kimutatására.		

Táblázat 1: *In vitro* és *in vivo* genotoxicitási vizsgálatok [4]

2.1.2 Genotoxicitási vizsgálatok korlátai

A genotoxikus vizsgálatok eredményei fontos szerepet játszanak a vegyi anyagok kockázatbecslésében. A kapott adatok alapján meghatározható, hogy egy adott anyag milyen mértékben jelent veszélyt az emberi egészségre és a környezetre. [5]

A genotoxikus anyagok azonosítására és kockázatbecslésére szolgáló vizsgálatok megbízhatósága több tényezőtől függ. Egyrészt, a különböző vizsgálatok érzékenysége és specificitása eltérő lehet, így előfordulhat, hogy egy adott anyag csak bizonyos vizsgálatokban mutat pozitív eredményt. Másrészt, az állatokon végzett vizsgálatok eredményeit nem mindig lehet egyértelműen az emberre extrapolálni, mivel az állatok és az emberek anyagcseréje, valamint biológiai reakciói eltérőek lehetnek. További kihívást jelent, hogy a genotoxikus vizsgálatok gyakran költségesek és

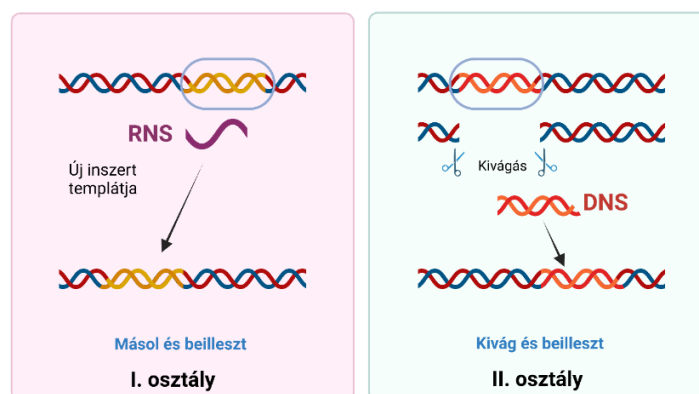
időigényesek, ami korlátozhatja azok széles körű alkalmazását. A rákkeltő anyagok specifikus mechanizmusuk alapján történő besorolása szintén kihívást jelent.

A jövőbeli irányok célja, hogy túlmutassanak az egyszerű állati és sejtmodellek alkalmazásán, és egy rendszerbiológiai megközelítés felé haladjanak, amely integrálja az omikai adatokat, az emberi specifikus modelleket és a számítási eszközöket. A különböző célokat és végpontokat tartalmazó tesztrendszerek standardizálása elengedhetetlen a genotoxikus vegyületek pontos azonosításához. [3]

2.2 Transzpozonok, retrotranszpozonok

Az emberi genom milliónyi ismétlődő szekvenciát rejt magában, amelyek a teljes genetikai állományunk jelentős részét teszik ki. A transzpozázibilis elemek, vagyis az "ugráló gének" a genomon belül képesek helyet változtatni. Ez a mozgás jelentős hatással van a genom szerkezetére és működésére, sőt, a genetikai sokféleség kialakulásában is fontos szerepet játszanak.

A transzpozázibilis elemek két fő csoportba sorolhatók: DNS transzpozonok és retrotranszpozonok. A DNS transzpozonok közvetlenül DNS formában mozognak a genomon belül, míg a retrotranszpozonok egy RNS köztiterméken keresztül másolódnak.[6]



2. Ábra: Mobilis elemek két fő osztályra oszthatók: I. osztályú (másol és beilleszt), és a II. osztályú (kivág és beilleszt) elemekre, melyek a replikálódó mechanizmusuk alapján RNS vagy DNS köztiterméken keresztül történik. [7]

A retrotranszpozonoknak két fő csoportja van, az LTR (hosszú terminális ismétlődések) és Nem-LTR (nem rendelkezik LTR-rel) típusúak. A nem-LTR retrotranszpozonok között a LINE-ok és SINE-ok a legjelentősebb csoportok.

A LINE-ok (Long Interspersed Nuclear Elements) olyan autonóm elemek, amelyek önmagukban képesek mozogni. Az L1 a legaktívabb LINE az emberi genomban. A SINE-ok (Short Interspersed Nuclear Elements) nem autonóm elemek, a mozgásukhoz LINE-ok által kódolt fehérjékre van szükségük.[7]

2.3 L1 retrotranszpozonok áttekintése

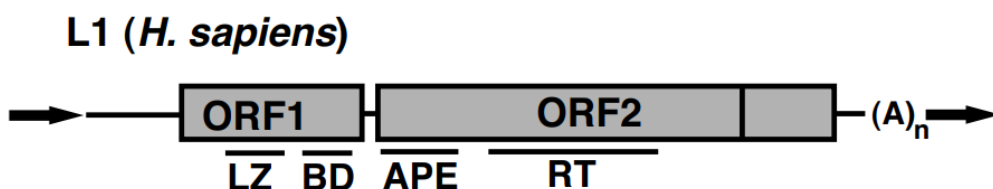
Az emberben jelenleg is aktív autonóm (önreplikáló) elemek családja a Long Interspersed Element-1 (LINE-1, vagy L1) néven ismert. Az L1 elemek a nem-LTR retrotranszpozonok kategóriájába tartoznak, amelyek RNS intermediáron keresztül reverz transzkripciójával replikálódnak. Az L1 alacsony szinten expresszálódik az ivarsejtekben, és általában elnémul a szomatikus sejtekben. [8]

Az L1 elemek megközelítőleg a genom egyhatodát teszik ki. A teljes hosszúságú, retrotranszpozícióra képes L1-ek hossza ~6 kb, és a következő szerkezeti elemekből állnak:

- 5' UTR (nem transzlálódó régió): Ez a régió egy belső RNS polimeráz II promotert tartalmaz, amely a transzkripciót irányítja az elem 5' végétől. A 5' UTR cisz-hatású kötőhelyeket is tartalmaz számos transzkripció faktor számára. Az 5' UTR vég egy erős antiszensz promotert (L1 ASP) is tartalmaz. Az L1 ASP-ből történő transzkripció kiméra transzkriptumokhoz vezethet, amelyek az L1 elemek 5' UTR szakasz egy részét és az L1 5' végét szegélyező genomiális szekvenciákat tartalmazzák. Feltételezések szerint ezek a kiméra transzkriptumok vagy a génszabályozásban játszanak szerepet, vagy kettős szálú L1 RNS-ek képződését segítik elő, amelyek az RNS-interferencia alapú mechanizmusok révén szabályozzák az L1 retrotranszpozíciót.[9]
- Két ORF (nyitott leolvasási keret):
 - ORF1: A humán ORF1 egy ~40 kDa fehérjét (ORF1p) kódol, amely szükséges az L1 retrotranszpozícióhoz. Az ORF1p egy amino-terminális doménnel rendelkezik, amely lehetővé teszi az ORF1p trimer képződését. A fehérje tartalmaz egy

központi elhelyezkedő RNS-felismerő motívumot (leucin-zip (LZ domént)) és egy bázikus karboxi-terminális domént (BD). Strukturális és biokémiai elemzések arra utalnak, hogy az RNS-felismerő motívum és a karboxi-terminális domének kritikus szerepet játszanak az ORF1p nukleinsavakhoz való kötődésében. Végül, az ORF1p nukleinsav-chaperon aktivitással rendelkezik, ami fontos lehet az L1 integrációjához.[9]

- ORF2: Az ORF2 egy ~150 kDa fehérjét (ORF2p) kódol, amely endonukleáz és reverz transzkriptáz aktivitással rendelkezik, amelyek elengedhetetlenek az L1 retrotranszpozícióhoz. Az ORF2 N-terminális apurinikus/apirimidinikus endonukleázt (APE), egy centrális RT domént és egy C-terminális cisztein-hisztidin gazdag domént tartalmaz, amelynek funkciója nem ismert, de szükséges a retrotranszpozícióhoz.[9]
- 3' UTR: Ez a régió egy poli(A) farokkal végződik.[9]



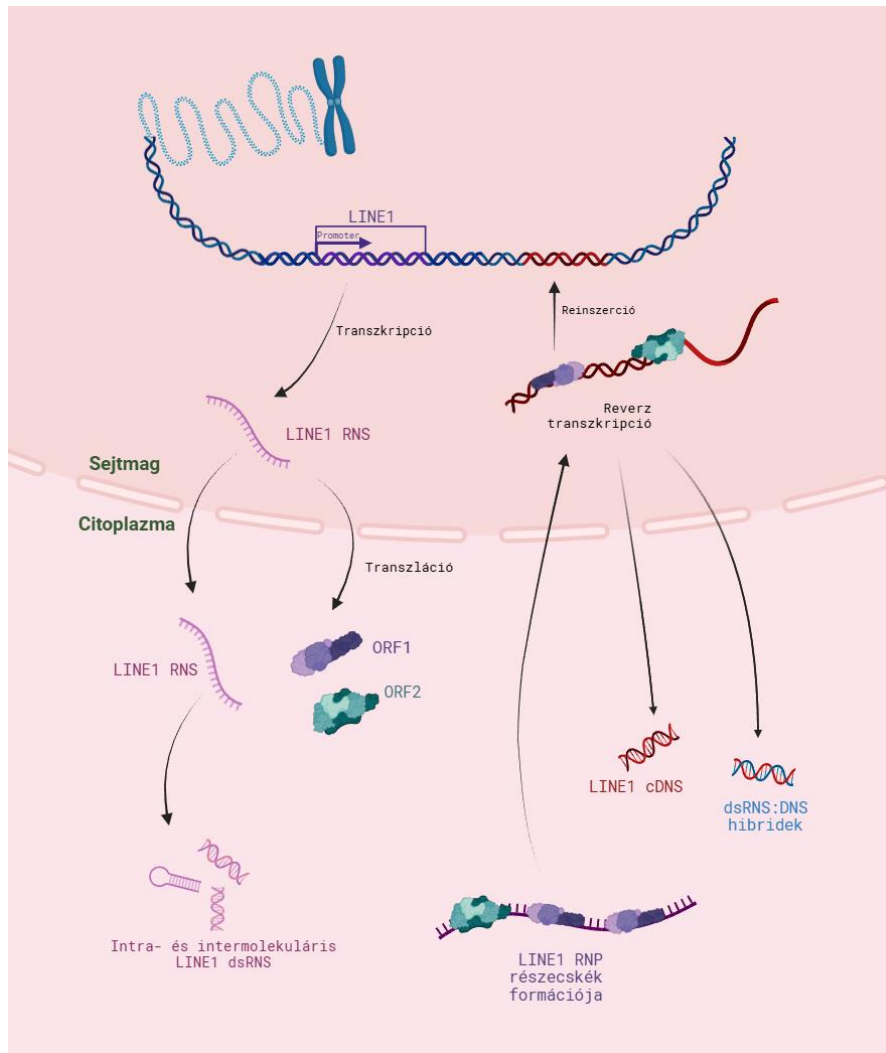
3. Ábra: Emberi L1 elemek felépítése[10]

Az L1-ek autonóm elemek, vagyis saját fehérjéjépezetet kódolnak a reverz transzkripcióhoz és a genomba való beépüléshez. Egy L1 elem mozgásának lépései, amely az 5' végen csonkolt inszerciót eredményez:

1. Transzkripció a sejtmagban és az RNS exportja a sejtplazmába
2. Transzláció és ribonukleoprotein (RNP) komplex képződése a sejtplazmában
3. Az RNS reverz transzkripciója ORF2p által közvetített célzott primeres reverz transzkripció (TPRT) révén
4. A kettős szálú inszert felbontása

Az L1 transzkripciót az RNS polimeráz II (RNAPolII) szabályozza, és a CpG-gazdag belső promóter metiláltsági állapota is befolyásolja. Az ORF1p az L1 RNP komplexek fő alkotóeleme. Úgy gondolják, hogy az ORF2p nukleáris importra van szüksége a sejtmagba való bejutáshoz. Az ORF2p

endonukleáz aktivitással rendelkezik, amely hasítja a DNS-t egy inszerciós helyen, és 3'-OH csoportot hagy maga után. Ez viszont primerként szolgál a reverz transzkripció reakcióhoz, amelyet az ORF2p egy különálló doménja közvetít. A köztitermék felbontása valószínűleg a gazdasejt DNS-javító fehérjeinek bevonásával történik. [11]



4. Ábra: L1 elemek reinszerciójának lépései

2.3.1 Az L1 elemek szabályozása csírasejtekben

A csírasejtekben az L1 aktivitás szabályozása különösen fontos, mivel az itt bekövetkező L1 inszerciók öröklődhetnek az utódokban.

A DNS metiláció az egyik fő epigenetikai szabályozási mechanizmus a genomban, amely fontos szerepet játszik az L1 elemek elnyomásában. Az egerekben a legmagasabb metilációs szintet a

zigóta kialakulásakor figyelik meg, majd az első rövid távú csökkenés a metilációs DNS szintben a 8-sejtes embrió stádiumában következik be. A preimplantációs embrió stádiumában az egerekben a különböző retrotranszpozonok, különösen az L1 magas expressziós szintjét figyelték meg, amelynek csúcsexpressziója a 2-sejtes embrió stádiumára esik. A 2-sejtes embrió stádiumában a DPPA2 és DPPA4 paralog transzkripció faktorok stimulálják az aktív L1 családok (L1Md_T és L1Md_A) expresszióját egerekben.[12]

Az egér hím csírasejtekben az L1 elemek elnyomásának egyik legjobban tanulmányozott mechanizmusa a Piwi-piRNS jelátviteli útvonal. A piRNS-ek kis, nem kódoló RNS-ek, amelyek specifikusan kötődnek a PIWI fehérjecsald Argonaute proteinjeihez. A piRNS-PIWI komplex közvetlenül kölcsönhatásba léphet az újonnan keletkezett L1 RNS másolatokkal, és lebontja azokat. A piRNS-PIWI komplex a DNS metilációját is kiváltja. Az egér embrionális hím csírasejtekben ez a komplex a Miwi2-piRNS. A piRNS/PIWI jelátviteli útvonal szükséges a H3K9me3 hiszton represszív módosításainak magas szintjének fenntartásához az L1 régiókban. A piRNS útvonal számos génjének károsodása az L1 retrotranszpozonok aktiválódásával, a sejt kialakulás károsodásával és a meddőséggel jár együtt.[12]

Az L1 elemek aktivitásának szabályozásában számos egyéb tényező is szerepet játszik az egér embrionális fejlődése során. A Tex19.1 faktor, amelynek magas az expressziós szintje az embrionális pluripotens sejtekben, a placentában és a herékben, specifikus az egerekre és a patkányokra, és nem található meg az emberekben. A Tex19.1 kölcsönhatásba léphet az L1-ORF1-gyel, és stimulálhatja mind a poliubikvitinilációt, mind az UBE2A/UBR2 által közvetített proteaszóma-függő L1 degradációt a placentában és az embrionális őssejtekben. [12]

2.3.2 Szomatikus L1 események

A szomatikus L1 események az élő szervezetekben az L1 retrotranszpozonok aktivitására utalnak a testi sejtekben. Az L1 elemek autonóm mobilis genetikai elemek, amelyek szomatikus mozaikosságot hozhatnak létre a szervezet különböző szöveteiben. Aktivitásukat számos tényező szigorúan szabályozza mind a testi, mind az ivarsejtekben, az ontogenezis minden szakaszában.

Bizonyos rendellenes állapotok azonban fokozott L1-expresszióhoz és L1-retrotranszpozícióhoz vezethetnek mind az ivarsejtekben, mind a szomatikus sejtekben. Az L1 retrotranszposzonok jelentős szerepet játszottak az emlős genomok evolúciójában, mind genom expanzióban, mind pedig a génkifejeződés szabályozásában. Az L1-ek integrációja génekbe számos betegség patogenezésében szerepet játszhat. [8]

Ennek a patológiás L1-expresszióknak a potenciális jelentősége az utóbbi években egyre nyilvánvalóbbá vált. A szomatikus sejtekben az L1-expresszió aktiválása különféle neurológiai rendellenességekkel, öregedéssel és rákos megbetegedésekkel jár. Jelenleg pontosan még nem tudjuk, hogy az L1 milyen szerepet játszik ezekben a rendellenességekben. [7]

Az L1 aktivitásának megváltozását számos betegségben figyelték meg, többek között:

- Neuropszichiátriai betegségek: pl. skizofrénia, Rett-szindróma, autizmus
- Autoimmun betegségek: pl. idiopátiás tüdőfibrózis
- Rák különböző formái: pl. gyomorrák, hólyagrák, tüdőrák

A megváltozott L1 aktivitás néhány patológia esetén epigenetikai változásokhoz és a repressziójukban részt vevő gének hibáihoz kapcsolódik. [12]

Az L1 retrotranszpozíciók normális agyi funkciókban is szerepet játszhatnak, azonban bizonyos neuropszichológiai rendellenességekben, köztük a Rett-szindrómában, az autizmusban és az Louis-Bar-szindrómában (ataxia telangiectasia) fokozott aktivitásuk figyelhető meg. Az L1 aktivitás növekedésének genetikai hátterét leginkább a Rett-szindróma és a Louis-Bar-szindróma esetében vizsgálták, és a MECP2 illetve az ATM gének mutációihoz kötötték. Ezek a gének az L1 elemek transzkripcióját és mobilitását szabályozzák. Bár a skizofrénia és a súlyos depresszió esetében is vannak bizonyítékok az L1 elemek szerepére, az L1 aktivitás változásának pontos okai és mechanizmusai további kutatásokat igényelnek. Az L1 szabályozásának vizsgálata szomatikus sejtekben még korai stádiumban van, és további kutatások szükségesek az L1 elemek szerepének teljesebb megértéséhez különböző betegségek patogenezésében. [12]

2.3.3 Szomatikus retrotranszpozíció detektálására alkalmas modellrendszer

Az L1 retrotranszpozíciós aktivitás mérésére transzgenikus egérmodellek alkalmazása kihívást jelent az ORFeus riporter rendszer leszármazási nyomonkövető jellegének és a veleszületett és korai embrionális L1 aktivitásnak köszönhetően.

Az ORFeus riporter rendszerek, melyek mesterségesen módosított LINE-1 elemek egy riporter gént (általában EGFP) hordoznak, amelynek expressziója lehetővé teszi a retrotranszpozíciós események kimutatását és kvantitatív mérését. Az ORFeus konstrukciókban a riporter gén általában az antiszensz irányban helyezkedik el a LINE-1 elem 3'UTR régiójában, és egy intron megszakítja. A LINE-1 RNS splicingje és a retrotranszpozíció után a riporter gén expressziója jelzi a sikeres eseményt. [13]

Az ORFeus riporter csíravonal-transzgenikus használata korai riporter aktiválódást okozna, ami széles körű EGFP expresszióhoz vezetne az egész állatban, még a teljes kifejlődése előtt. Ennek eredményeként a csíravonal-transzgenikus egérmodellek alkalmazása mérési rendszer létrehozására nem lehetséges.

Ennek a korlátozásnak a leküzdéséhez először egy megbízható szomatikus transzgenezis platformra volt szükségünk, amely stabil transzgén expressziót biztosít, miközben elkerüli a csíravonalba történő átvitelt. Sikeresen létrehoztunk egy ilyen rendszert az I-es típusú tirozinémia egérmodelljének felhasználásával. Ezt a megközelítést alkalmazva szomatikus L1 riporter transzgenikus májakat generáltunk egerekben, amelyek lehetővé tették számunkra, hogy a különböző kemikáliákat hatékonyan teszteljük kontrollált szomatikus környezetben.[14]

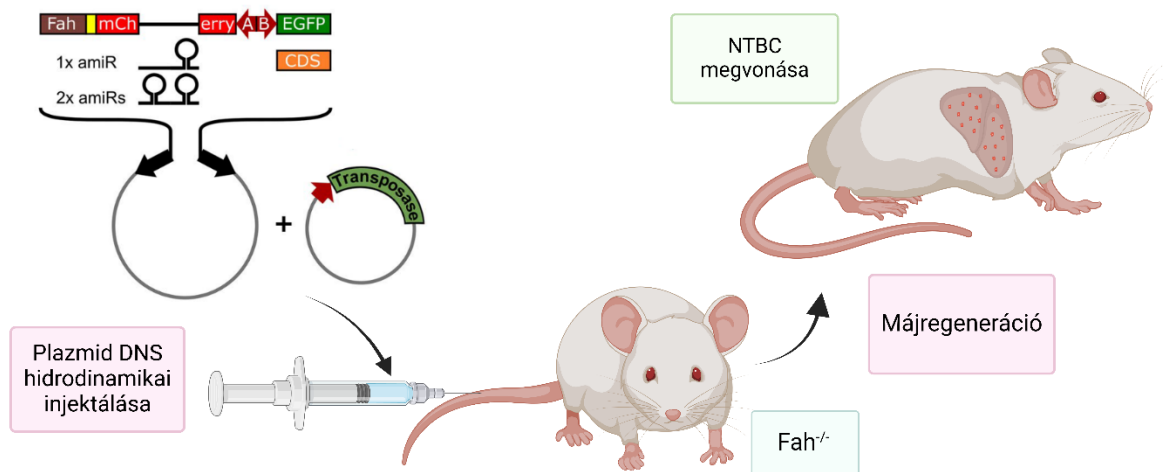
A Sleeping Beauty (SB) transzpozon rendszer egy rendkívül hatékony eszköz a génterápia területén. Ennek a rendszernek köszönhetően géneket lehet stabilan beilleszteni az állati modellek genomjába. A jelen tanulmányban az SB rendszert egy Fah-hiányos egérmodellben alkalmaztuk, amely az 1-es típusú tirozinémia humán betegségének állatmodellje.[15]

A Fah-hiányos (I. típusú tirozinémiában szenvedő) egerek májsejtjei nem képesek a Fah enzimet termelni, ami az aminosav-anyagcsere zavarához vezet. Kihasnálva ezt a hiányosságot, egy olyan stratégiát dolgoztunk ki, amely lehetővé teszi a génhiányos sejtek kiválasztását és szaporítását. A

Sleeping Beauty DNS transzpozon rendszer lehetővé teszi a transzgén stabil beillesztését a kromoszómába. Az alkalmazott konstrukcióban a beépített gén mellett egy szelekciós marker gén (Fah) is található, amelyet egy bidirekcionális HADHA/B promóter szabályoz. Ez a promóter biztosítja, hogy mindkét gén egyenlő arányban fejeződjön ki.[14]

A Fah gén expressziójának köszönhetően azok a májsejtek, amelyekbe sikeresen beépült a transzgén, képesek a Fah enzimet termelni és túlélni. A többi, Fah-hiányos sejt elpusztul, így a transzgenikus sejtek szelektálódnak. A máj nagyfokú regenerációs képességének köszönhetően ezek a sejtek képesek repopulálni az egész májat. Az így létrejött transzgenikus májban a Fah gén hosszú távon is stabilan expresszálódik.[14]

Az általunk kifejlesztett rendszer számos előnnyel rendelkezik. Az SB transzpozon rendszer lehetővé teszi a gének hatékony és biztonságos beillesztését a genomba. A hidrodinamikus injekció egy egyszerű és hatékony módszer a génterápiás vektorok bejuttatására a májba. A bidirekcionális promóter biztosítja, hogy a transzgén és a szelekciós marker gén egyenlő arányban expresszálódjon. Az intronikus amiR elemek pedig lehetővé teszik, hogy az adott gént célzó kisRNS-ek ne zavarják a többi gén működését.



5.Ábra: Transzpozon alapú génbejuttatás sematikus felépítése[14]

A transzpozon-alapú technológiánk egy rendkívül hatékony eszközt biztosít az egér májsejtjeinek genetikai módosításához. A módszernek köszönhetően a bejuttatott gének stabilan beépülnek a

sejt genomjába, és hosszú távon nagy mennyiségben termelődnek a kívánt fehérjék. Emellett a technológia lehetővé teszi, hogy kis RNS molekulák (amiR) segítségével specifikus gének működését gátoljuk. A módszer sokoldalúságának köszönhetően számos kutatási kérdésre adhat választ. [14]

2.4 L1 elemek szomatikus működésének szabályozása

Az L1 elemek retrotranszpozíciója számos betegség kialakulásában játszhat szerepet, ezért fontos megérteni, hogy milyen mechanizmusok szabályozzák az L1 elemek aktivitását. A szomatikus sejtekben az L1 elemek általában el vannak nyomva, ezt több mechanizmus is biztosítja. Ilyenek a DNS-metiláció, a kromatin szerkezetének megváltozása és az RNS-interferencia.

A legtöbb normál szomatikus szövetben az L1-et DNS-metiláció és specifikus hisztonmódosítások represszálják. Számos tényező ismert, amelyek szabályozzák a kromatin hozzáférhetőségét az L1 régiókban a szomatikus szövetekben, beleértve a MEPC2, KAP2, sirtuineket és a NuRD komplexet. Az L1 metilációs profiljának változásait gyakran megfigyelik a rák különböző formáiban. Az alkohol, a dohányzás és a kábítószeres megváltoztathatják a metilációs profilt és aktiválhatják az L1-et.[12]

Számos celluláris tényező vesz részt az L1 transzkriptumok poszt-transzkripció szintű korlátozásában és degradációjában. Ezen tényezők némelyike specifikusan az L1-re hat, például az RNS-interferencia mechanizmusok révén, míg mások hatása az interferon által indukált védelemhez kapcsolódik, amely a különböző idegen nukleinsavakra és diszpergált ismétlődésekre adott válaszként alakul ki. [12]

Az RNS-interferencia, és azon belül a miR-128 mikroRNS kulcsfontosságú szerepet játszik a szomatikus sejtekben található L1 retrotranszpozónok aktivitásának féken tartásában. A miR-128, az Argonaute (Ago) fehérjével együttműködve, egy RNS-indukált csendesítési komplexet (RISC) alkot, amely képes specifikusan felismerni és inaktíválni az L1 elemeket.[12]

A miR-128 több mechanizmus révén gátolja az L1-ek aktivitását. Egyrészt, közvetlenül képes kötődni az L1 mRNS-hez, mégpedig az ORF2 régióban, ami az L1 fehérjék egyikét kódolja. Ez a kötődés a transzkriptum lebomlásához vezet, így megakadályozza az L1 fehérjék szintézisét. Másrészt, a miR-128 képes gátolni azokat a sejtfaktorokat, amelyek az L1 RNP-t (ribonukleoprotein

részecskét) a citoplazmából a sejtmagba szállítják. Ezek a faktorok közé tartozik a transzportin-1 (TNPO1) és a hnRNPA1 fehérje. Azáltal, hogy gátolja ezeknek a fehérjéknek a működését, a miR-128 megakadályozza, hogy az L1 RNP elérje a sejtmagot, ahol a transzpozíció megtörténne. [12]

Az interferonok kulcsszerepet játszanak a veleszületett immunválaszban, és számos vírussal szemben hatékonyak. Aktiválják a JAK-STAT jelátviteli útvonalat, ami az interferon-stimulált gének (ISG-k) expressziójának növekedéséhez vezet. Az ISG-k különböző funkciókkal rendelkeznek, beleértve a vírusreplikáció gátlását, a sejtpusztulás indukcióját és az adaptív immunválasz modulálását. Számos ISG-t azonosítottak, amelyekről kimutatták, hogy gátolják az L1 retrotranszpozíciót, beleértve a MOV10-et, a ZAP-ot, a SAMHD1-et, és a TRIM25-alfát.[12]

A DNS-metiláció során metilcsoportok kapcsolódnak a DNS-hez, ami gátolja a gének expresszióját, így az L1 elemek átírását is. A kromatin szerkezete is befolyásolja az L1 aktivitást: a sűrű, tömör kromatin struktúra megakadályozza, hogy a transzkripció faktorok hozzáférjenek az L1 promóteréhez.

Bár az L1 elemek általában inaktívak, bizonyos betegségekben, például rákban, neurodegeneratív betegségekben és pszichiátriai rendellenességekben fokozott aktivitást mutathatnak. Az L1 aktivációhoz vezető tényezők között szerepel a környezeti hatások, például az alkohol, a dohányzás és a kábítószer, valamint bizonyos genetikai mutációk.[12]

Az L1 elemek szabályozásának zavarai számos betegség kialakulásához vezethetnek. Például a rákban az L1 elemek aktiválódása genom instabilitáshoz és a tumor progressziójához járulhat hozzá. Neurodegeneratív betegségekben, mint például az Alzheimer-kór és a Parkinson-kór, az L1 elemek aktiválódása szerepet játszhat a neuronok pusztulásában. Az L1 elemek működésének jobb megértése segíthet új terápiák kifejlesztésében különböző betegségek kezelésére.[12]

2.5 L1 retrotranszpozíciók monitorozására alkalmas esszék

Az L1 retrotranszpozíciók vizsgálatára számos módszer áll rendelkezésre. A megfelelő esszé kiválasztása a vizsgált kérdés jellegétől és a rendelkezésre álló erőforrásoktól függ. Ezek az esszék elengedhetetlenek ahhoz, hogy megértsük az L1 elemek biológiai szerepét és a genom stabilitására gyakorolt hatásukat.

A PCR-alapú módszerek gyorsabb és érzékenyebb alternatívát kínálnak. A kvantitatív PCR segítségével mérhetjük az L1 RNS mennyiségét, ami az L1 aktivitás korai jele. A digitális PCR pedig pontosan meghatározza, hogy hány L1 kópia található egy mintában.[7]

Közvetett módszerek révén pedig az L1 aktivitás szabályozásának mechanizmusait vizsgálhatjuk. A biszulfid szekvenálás segítségével megállapíthatjuk, hogy az L1 promóter régiói metiláltak-e, ami általában gátolja az aktivitást. A kromatin immunprecipitáció (ChIP) segítségével azonosíthatjuk azokat a fehérjéket, amelyek az L1-hez kötődnek és szabályozzák annak működését. Az RNS szekvenálás pedig globális képet ad az L1 expresszióról különböző sejttípusokban és körülmények között. Végül, a genomszintű szekvenálás segítségével azonosíthatjuk azokat az új helyeket, ahová az L1 elemek beépültek.[7]

2.5.1 *In vitro* esszék

A kutatók különböző humán sejtvonalakon (K562, HeLa, HeLa-M2) és élesztőben (*Saccharomyces cerevisiae*) végeztek nagy áteresztőképességű genetikai szűréseket, hogy azonosítsák azokat a géneket, amelyek befolyásolják az L1 elemek retrotranszpozícióját. A CRISPR/Cas9 és siRNA technológiák segítségével több száz potenciális gazdafaktort azonosítottak, amelyeknek egy része mindkét sejttípusban hasonló hatást mutatott.

Az eredmények azt sugallják, hogy az L1 retrotranszpozíció egy komplex folyamat, amely számos sejtbeli faktor kölcsönhatásának eredménye. Az azonosított faktorok között szerepelnek az ESCRT komplex fehérjéi, amelyek fontos szerepet játszanak a membrán vezikulák képződésében és a fehérjék sorrendezésében.[7]

2.5.2 *In vivo* esszék

Az L1 retrotranszpozíció tanulmányozása során a kutatók eddig elsősorban sejtkultúrákon végzett kísérletekre támaszkodtak. Ezek a kísérletek értékes információkat szolgáltatnak az L1-ek működéséről, azonban a sejtkultúrák nem teljesen tükrözik az élő szervezet komplex biológiai környezetét. Ennek következtében a sejtkultúrában kapott eredményeket nem mindig lehet egyértelműen általánosítani az egész szervezetre.[7]

Az L1-ek működése szomatikus és csíravonalbeli sejtekben eltérő lehet. A sejt kultúrákban általában gyorsan osztódó sejteket vizsgálnak, míg a csíravonalbeli sejtekben más körülmények között zajlik az L1-ek szaporodása.[7]

Az L1-ek működésének teljesebb megértéséhez elengedhetetlen az állati szervezeteken végzett kísérletek. A modellorganizmusok, mint például az egerek, lehetővé teszik, hogy az L1-ek működését egy összetettebb biológiai rendszerben tanulmányozzuk.

Azonban az élő állatokban a szomatikus L1 aktivitás vizsgálata számos kihívással jár. A meglévő egér modellekben nehéz megkülönböztetni a szomatikus és a korai embrionális retrotranspozíciós eseményeket. Emellett a kémiai karcinogénnel indukált tumorigenezis során tapasztalt L1 aktivitás inkább a globális genom demetiláció következménye lehet, mintsem a tényleges retrotranspozíció eredménye.[16]

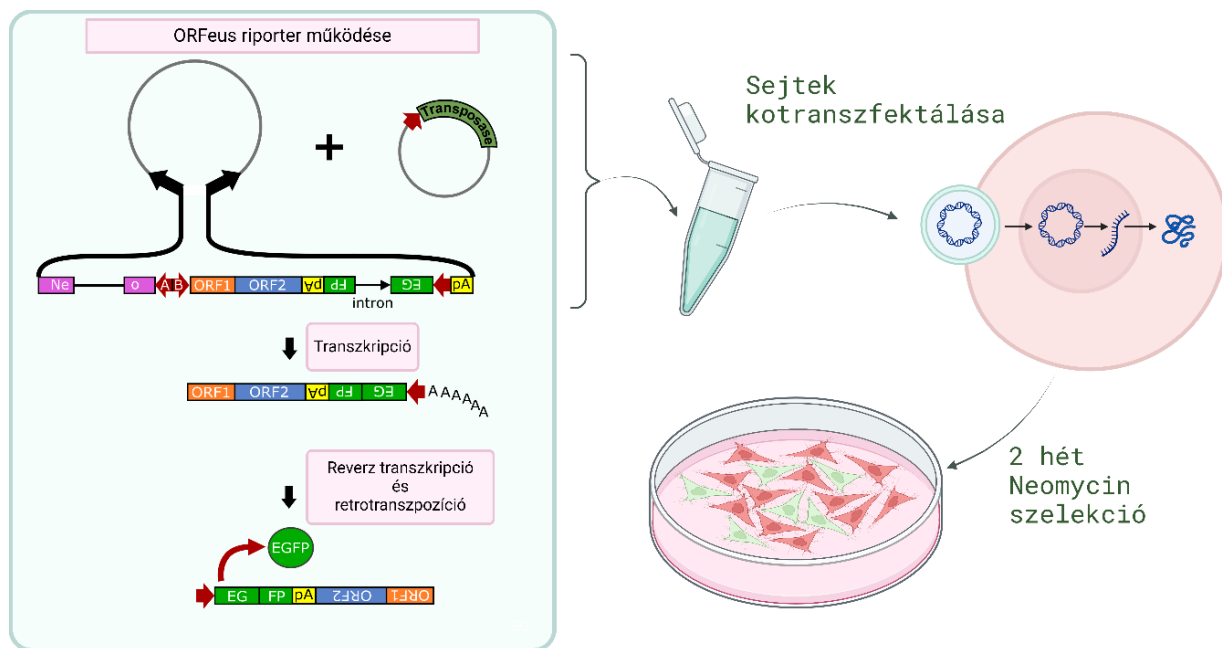
A szomatikus L1 aktivitás pontos vizsgálatához szomatikusan transzgenikus egerek kifejlesztése szükséges. Egy ilyen modell lehetővé tenné, hogy az L1-ek működését közvetlenül az élő állat szöveteiben tanulmányozzák, és így pontosabb képet kapjunk arról, hogy milyen szerepet játszanak ezek az elemek a betegségek kialakulásában és az evolúcióban. [7]

Bár létezik egy egérmodell, amelyet az L1 elemek tanulmányozására fejlesztettek ki, ez a modell számos korláttal rendelkezik. Az egerekben az emberi eredetű ORFeus nevű L1 elemet vizsgálták, de a kísérletek során kapott eredmények értelmezése nehézkesnek bizonyult. A használt jelölőmolekulák (például az EGFP) jelenléte nem mindig jelenti az L1 elem tényleges mozgását a genomban, és a megfigyelt változások oka lehet korábbi fejlődési esemény is. [16]

Az eddigi eredmények alapján egyértelmű, hogy a szomatikus sejtekben zajló L1 aktivitás pontos megértéséhez új, speciálisan tervezett egérmodellekre van szükség. Ezek a modellek lehetővé tennék, hogy a kutatók közvetlenül vizsgálják az L1 elemek mozgását és működését élő szervezetekben, és így pontosabb képet kapjanak erről a komplex biológiai folyamatról.[16][17]

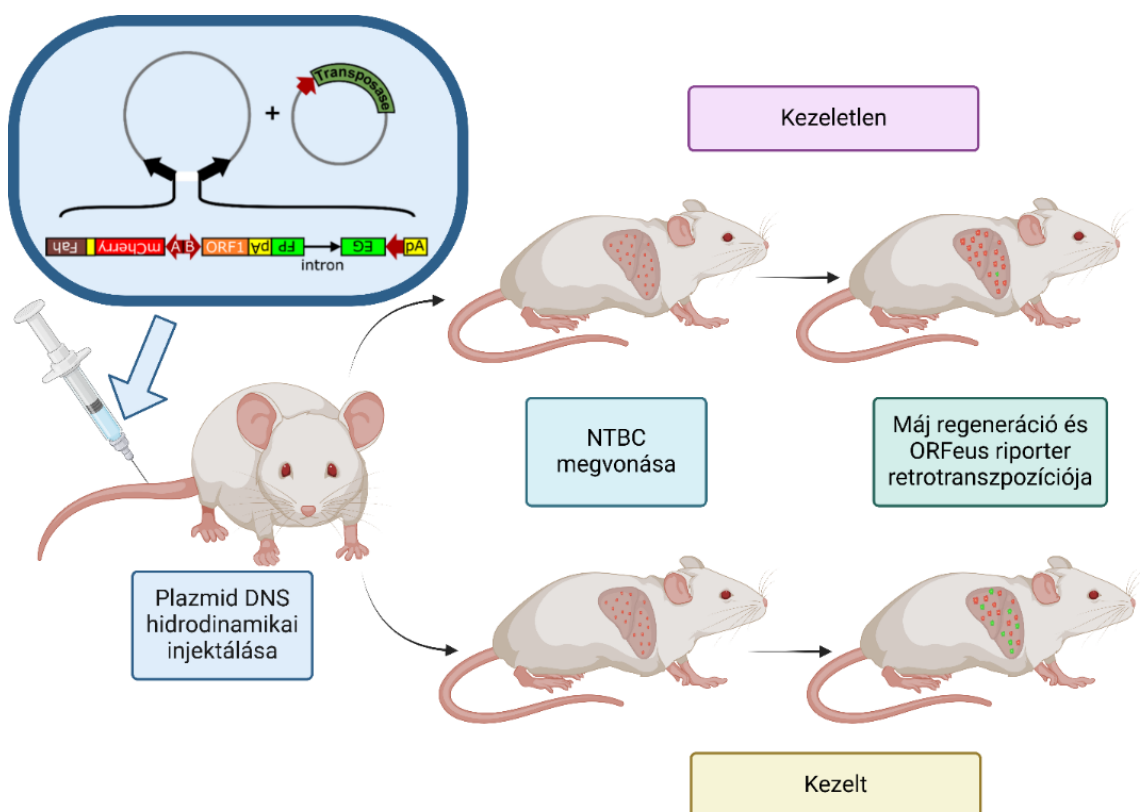
2.6 Laborunkban használatos *in vitro* és *in vivo* technikák

In vitro kísérletek során a már korábban említett ORFeus riporterrendszert használjuk, ahol a riporter gén az L1 nem-kódoló régiójába integrálva inaktív. Sikeres retrotranszpozíció esetén a riporter gén aktiválódik, GFP expressziót eredményezve. A szelekciós marker segítségével 2 hét G418 (Neomicin) szelekció után minden sejt expresszálta a transzfektált konstrukciót, amely a Sleeping Beauty SB100 hiperaktív transzpozáz segítségével stabilan integrálódott a genomba, amelyet egy segítő plazmidként co-transzfektáltunk. [15] Ezek a sejtpopulációk alkalmasak a retrotranszpozíciós aktivitás változásainak megfigyelésére. Ez a rendszer alkalmas lehet különböző anyagok tesztelésére is, viszont érdemes a kísérlettervezés során az anyagok inhibitor hatásmechanizmusaira figyelmet fordítani.



6.Ábra: ORFeus riporter működése, retrotranszpozíció monitorozására alkalmas sejtek létrehozása

Az *in vivo* kísérletek során a már korábban bemutatott (2.3.3. pont) módszerünket alkalmazva vizsgáljuk a májregenerációban lévő egereken a tesztanyag hatását. A GFP jelöléssel ellátott, retrotranszpozíciós eseményen átesett kolóniák arányának elemzésével következtethetünk a vizsgált anyagnak az L1 eseményekre gyakorolt hatására.



7. Ábra: Anyagok L1 retrotranszpozícióra gyakorolt hatásának tesztelése in vivo

2.7 Lipid nanopartikulumok áttekintés

A lipid nanopartikulumok (LNP-k) apró, zsírszerű részecskék, amelyeket gyógyszerek vagy gének célzott szállítására használnak a szervezetben. Kiválóan alkalmazhatók rák, szív- és érrendszeri betegségek, neurológiai rendellenességek és fertőző betegségek kezelésében. Az LNP-k számos előnnyel járnak, mint például a fokozott hatékonyság, a csökkent mellékhatások és a széleskörű alkalmazhatóság. Azonban még megoldandó feladatok is vannak, mint a stabilitás és a szervezetben való viselkedésük pontos megértése. Az LNP-k ígéretes jövőt tartogatnak az orvostudományban, új lehetőségeket nyitva a betegségek diagnosztikájában és kezelésében.[18]

2.8 mRNS LNP-k áttekintése

Az mRNS terápiás potenciált mutatott számos alkalmazásban, beleértve a vírusvakcinákat, a fehérjepótló terápiákat, a rák immunterápiákat, a sejtek átprogramozását és a genom szerkesztését. A terápiás hatások elérése érdekében az mRNS molekulának el kell érniük a specifikus célsejteket, és elegendő fehérjét kell termelniük. Az LNP-k sikeresen befutottak a

klinikai alkalmazásban, miszerint a kis molekulák, siRNS gyógyszerek és mRNS szállítására igen alkalmasak a szervezetben. Két engedélyezett COVID-19 vakcina, az mRNA-1273 és a BNT162b, LNP-ket használ az antigén mRNS szállítására.[19]

2.8.1 Felépítésük

Az mRNS LNP-k jellemzően négy fő lipidkomponenst tartalmaznak: ionizálható lipidet, PEG-lipidet, koleszterint és helper-lipidet (például foszfolipidet). Ezek a komponensek együttesen biztosítják az mRNS hatékony bejuttatását a sejtekbe.

Az **ionizálható lipid** kulcsfontosságú szerepet játszik az mRNS kapszulázásában és az endoszómális menekülésben. Fiziológias pH-n semleges, de alacsony pH-értéken, például az endoszómákban, protonálódik, és pozitív töltést kap. Ez lehetővé teszi az mRNS negatív töltésű foszfátcsoportjaival való elektrosztatikus kölcsönhatást, ami az mRNS becsomagolásáteredményezi az LNP-be. Az endoszómákban a pozitív töltésű ionizálható lipid destabilizálja az endoszómális membránt, elősegítve az mRNS kijutását a citoplazmába, ahol a transzláció megtörténik.

A számos ionizálható lipid van használatban, melyeket mRNS szállítására használnak, beleértve a DLin-DMA-t, DLin-KC2-DMA-t, DLin-MC3-DMA-t (MC3), L319-et, Lipid 5-öt, Lipid H-t (SM-102) és az ALC-0315-öt. Az SM-102 és az ALC-0315 az ionizálható lipid komponensek az mRNA-1273 és a BNT162b COVID-19 vakcinákban.

A **PEG-lipid** segít megvédeni az LNP-t az immunrendszer általi felismeréstől és eltávolítástól. A PEG (polietilén-glikol) egy hidrofil polimer, amely az LNP felszínéhez kötődik, és sterikus védelmet nyújt. Ez csökkenti az LNP kölcsönhatását az immunsejtekkel és a vörösvérsejtekkel, meghosszabbítva a keringési idejét a véráramban.

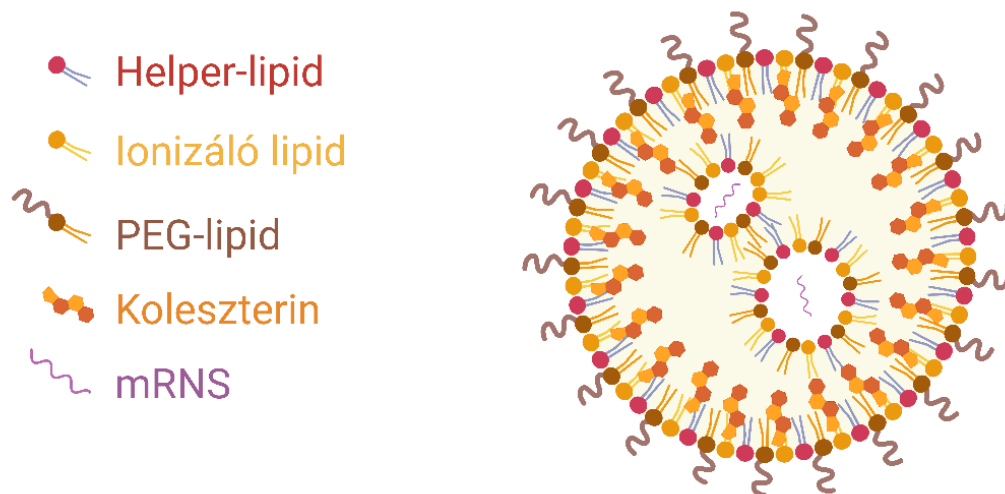
A PEG-lipidek aránya és tulajdonságai befolyásolják az LNP méretét, zeta potenciálját, stabilitását, keringési idejét és eloszlását. A források a PEG2000-DMG-t és a PEG2000-DSG-t említik példaként a semleges PEG-lipidekre.

A **koleszterin** stabilizálja a lipid kettős réteget. A koleszterin merev szerkezete növeli az LNP stabilitását és csökkenti a permeabilitását. Ez segít megvédeni az mRNS-t a degradációtól és meghosszabbítja az LNP élettartamát.

A koleszterinszármazékok befolyásolhatják az LNP alakját, és fokozhatják az intracelluláris szállítást. Például a koleszteril-oleátot tartalmazó LNP-k nagyobb szelektivitást mutatnak a máj endotélsejtjeire, mint a hepatocitákra.

A **helper-lipid**, például a foszfolipid, elősegíti az LNP-k képződését. A helper-lipidek segítenek a lipidkomponensek megfelelő arányban történő összekeverésében és az LNP szerkezetének stabilizálásában.

A kutatók a DSPC-t (1,2-disztearoil-sn-glicero-3-foszfocholin) és a DOPE-t (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-foszfoetanolamin) említik példaként a foszfolipid helper-lipidekre. A DSPC telített zsírsavlánccal rendelkezik, és stabil lamelláris fázist képez, míg a DOPE telítetlen zsírsavlánccal rendelkezik, és elősegíti az endoszómális menekülést.[19]



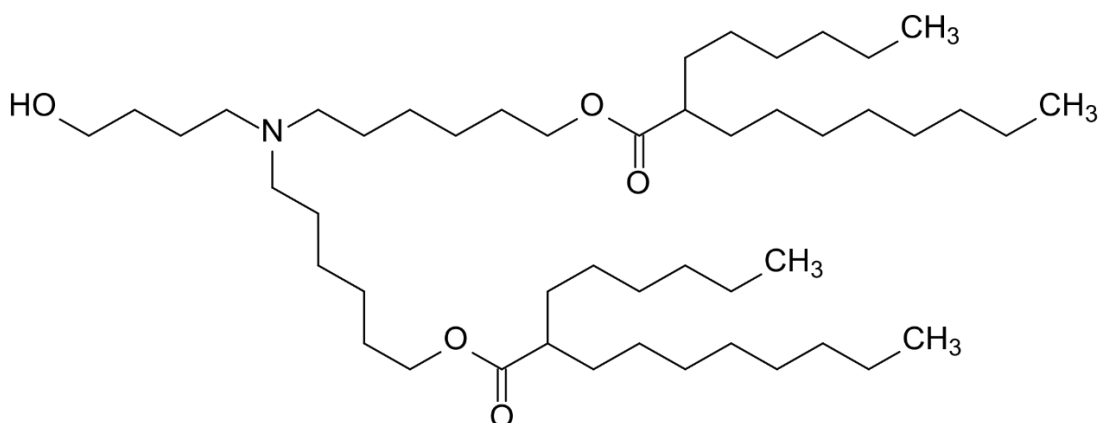
8. Ábra: Lipid nanopartikulumok felépítése

2.8.2 Működési elvük

Az mRNS-t szállító lipid nanorészecskék (LNP-k) komplex rendszerek, amelyeknek számos akadályt kell leküzdeniük a szervezetben, hogy hatékonyan juttassák el az mRNS-t a célsejtekbe. Ezek az akadályok közé tartozik a nukleázok általi lebontás, az immunrendszer felismerése és eltávolítása, a vese általi szűrés, a célsejtek elérése és a sejten belüli endoszómából való kiszabadulás. Az LNP-k speciális felépítésüknek köszönhetően képesek védeni az mRNS-t, elkerülni az immunrendszert, és bejutni a sejtekbe, ahol az mRNS-t a sejt fehérjékké tudja fordítani. Az LNP-k fejlesztése kulcsfontosságú a hatékony mRNS alapú terápiák kifejlesztéséhez. [19]

2.8.3 ALC-0315 mRNS-LNP

Az ALC-0315 egy zsírszerű anyag, egy úgynevezett szintetikus lipid, amelyet a Pfizer/BioNTech COVID-19 vakcinában használnak. Ennek az anyagnak kulcsfontosságú szerepe van abban, hogy az mRNS molekulákat, amelyek a vakcina hatóanyagai, biztonságosan és hatékonyan eljuttassák a szervezet sejtjeibe. Ez az anyag stabilizálja az mRNS-t tartalmazó lipid nanorészecskéket, segíti azok bejutását a sejtekbe és kijutását az endoszómákból, hogy a sejt a benne kódolt fehérjét előállíthassa. Az ALC-0315-öt más, hasonló funkciójú lipiddel, például az SM-102-vel (amelyet a Moderna vakcinában használnak) is összehasonlították. Az eredmények alapján az SM-102 hatékonyabb lehet az mRNS sejtekbe juttatásában és az immunrendszer aktiválásában. Azonban az ALC-0315 is hatékony, és számos előnye van, például a stabilitása és a könnyű előállíthatósága. A kutatók folyamatosan vizsgálják az ALC-0315 tulajdonságait, hogy még fejlettebb vakcinákat fejlesszenek ki. [20][21][22]



9. Ábra: ALC-0315 molekula szerkezete[23]

3 Célkitűzés

Fő célkitűzés:

Egy olyan új toxikológiai vizsgálati módszert szeretnénk kidolgozni, amely a szomatikus L1 retrotranszpozíciót biomarkerként használva képes azonosítani azokat a vegyi anyagokat, amelyek a rák kialakulásához vezethetnek. Ez a módszer jelentős előrelépést jelenthet a rákmegelőzés területén.

Konkrét részcélok:

1, A kutatócsoportunk által kifejlesztett szomatikus transzgenikus egérmodell és az ORFeus L1 riporter rendszer felhasználásával különböző vegyületek L1 retrotranszpozícióra gyakorolt hatásának vizsgálata.

2, A szomatikus transzgenezis rendszer hatékonyságának növelése, és a szórás csökkentése érdekében egy új, nukleozid módosított mRNS-LNP technológia bevezetése és az ezzel bejuttatott mCherry fehérje expressziójának vizsgálata az egér különböző szervrendszereiben.

4 Anyagok és módszerek

4.1 Állatok gondozása és tartása

Az egereket a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Központi Állatházában tenyésztettük és tartottuk. A kórokozómentes állapotukat háromhavonta ellenőriztük a FELASA irányelveknek megfelelően [24]. Az egereket 12 órás fény-sötét ciklusban, 22 °C hőmérsékleten tartottuk, tetszés szerinti mennyiségű vízzel és standard rágcsáló táppal ellátva. Minden kísérleti eljárást a Biológiai Kutatóközpont Állatgondozási és Használati Bizottsága által jóváhagyott protokolloknak megfelelően végeztünk. Etikai engedélyszám: XVI./801/2018.

A vizsgálatban használt Fah mutáns törzs, a C57BL/6N-Fah^{tm1(NCOM)Mfgc/Biat}, az Európai Egér Mutáns Archívumban (EMMA) EM:10787 kódszámon van nyilvántartva. A Fah^{-/-} egerek Orfadin® (Nitisinone, NTBC) oldatot kaptak 8 mg/l koncentrációban az ivóvizükben. Az NTBC adagolást a hidrodinamikai injekció után azonnal leállítottuk. A vad típusú C57BL/6NTac egereket a Taconic Biosciences-től vásároltuk.

4.2 L1 monitorozására tervezett ORFeus riporter

Az általunk kidolgozott szomatikusan transzgenikus egérmodellt és az ORFeus L1 riporter rendszer kombinációját használtuk a szomatikus L1 aktivitás méréséhez

4.3 A plazmidok előkészítése és hidrodinamikai farokvéna injektálás

A plazmidok előkészítését Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Maxi Plus EF Kit segítségével végeztük, a gyártói utasításoknak megfelelően. A tisztított plazmidokat steril Ringer(0,9% NaCl; 0,03% KCl; 0,016% CaCl₂) oldatban hígítottuk. Az állatkísérletekhez 6-8 hetes egereket használtunk. Az injekció előtt az egerek farkát meleg vízben áztattuk a vénák kitágítása céljából. Az állatok testtömegének 10%-ával egyenlő térfogatú plazmid oldatot adtunk be 5-8 másodperc alatt az oldalsó farokvénába, hogy hidrodinamikusan hatást érvényesítsünk. Az egyes injekciók 4 µg transzpozáz segítő plazmidot (SB100 vagy hyPBase) és 50 µg transzpozont tartalmazó plazmidot tartalmaztak.[25][26]

4.4 A retrotranszpozíciót feltehetően indukáló vegyületek adagolása

A már hidrodinamikailag beoltott és NTBC-t nem kapó állatoknak elkezdtek adagolni a kiválasztott kemikáliákat 3 hónapon keresztül a táblázatban feltüntetett információk szerint. A

kontrollcsoportba tartozó egerek ugyanannyi mennyiségű hordozóanyagot kaptak, mint a kezelték.

Vegyület	Vivőanyag	Dózis	Bejuttatási mód	Gyakoriság /hét	Hivatkozások
Efavirenz (MedChemExpress)	DMSO	10 mg/kg	Intraperitoneális injektálás	2x	[27]
MelQX (Abcam)	DMSO	5mg/kg	Intraperitoneális injektálás	2x	[28][29]
FICZ (MedChemExpress)	Kukorica olaj	5mg/kg	Intraperitoneális injektálás	2x	[30]

Táblázat 2: Kezelés során használt anyagok

4.5 Sztereomikroszkópos képalkotás

Az egész egér májról Olympus SZX12 fluoreszcens sztereomikroszkóppal készítettünk képeket. A mikroszkóp 100 W-os higanylámpával és speciális szűrőkészletekkel volt felszerelve a GFP és mCherry fluoreszcencia szelektív gerjesztéséhez és emissziójához.

4.6 A szomatikus L1 retrotranspozíciós aktivitás mérése *in vivo*

A 3 hónapos kezelési időszakot követően az egereket altatásban részesítettük. A máj felszínén lévő EGFP pozitív hepatocita kolóniákat fluoreszcens sztereomikroszkópia segítségével megszámoltuk mind a kezelt, mind a kezeletlen állatoknál.

4.7 Létrehozott Lipid Nanopartikulum

A HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpontban található Biotechnológiai Nemzeti Laboratóriumban az általunk klónozott mCherry régiót tartozó mRNS-t ALC-0315 típusú LNP-be burkolták.

4.8 Az mRNS-LNP bejuttatása, kimutatása

A létrehozott konstrukciót 10 µl térfogatban 300 µl 1x foszfáttal pufferolt sóoldatban (DPBS) oldottuk fel. Az így kapott oldatot C57BL/6 törzsű, vad típusú egerek farokvénájába injektáltuk. A

kísérleti csoportban 4 állat (3 nőstény, 1 hím) volt, míg a kontroll csoportban 1 nőstény állatot alkalmaztunk.

24 órával az injekció beadása után az állatokat eutanizáltuk, majd az alábbi szerveket távolítottuk el: agy, szegycsont, szív, tüdő, gyomor, lép, máj, comb izomszöve, petefészek (nőstényeknél) és here (hímnél). A szerv-, és szövetmintákat 4% formalinban fixáltuk, majd paraffinba ágyztuk, és 5 µm vastag metszeteket készítettünk. Az immunhisztokémiai protokollunk során az alábbiakat alkalmaztuk:

- DAKO Target Retrieval Solution pH9 50x hígításban
- Elsődleges antitestként nyúl poliklonális anti-mCherry (GeneTex, GTX128508) 1:500 hígításban,
- Másodlagos antitestként Novolink antinyúl polimert (Leica, Novolink Polymer Detection Systems) használtunk 30 percig.
- Előhíváshoz EnVision FLEX DAB+ Substrate Chromogen System-et (Dako Omnis, GV825) használtunk.
- A sejtmagokat hematoxylin-nek festettük meg 5 perc alatt.
- Fedés után Panoramic Digital Slide Scanner (3D Histech) rendszerrel szkenneltük be a metszeteket.

4.9 Adatok statisztikai kiértékelése, és vizualizációja

A R és a GraphPad Prism (8.4.3. Windows verzió) szoftvereket használtuk az adatok vizualizálására. A statisztikai elemzéseket Fisher-féle exakt teszttel és Pearson-féle khi-négyzet próbával végeztük. A statisztikai szignifikanciát $p < 0,05$ -ös szignifikanciaszinten állapítottuk meg.

5 Eredmények

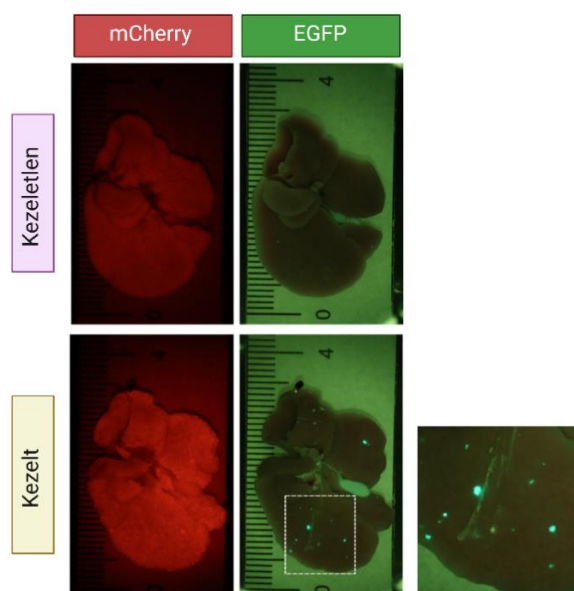
5.1 A kemikáliákkal történő kezelések eredményei

Az **Efavirenz** egy nem-nukleozid reverz transzkriptáz gátló (NNRTI), ami egy speciális típusú antiretrovirális gyógyszer. Ez azt jelenti, hogy a HIV vírus szaporodását gátolja, így segít a fertőzés kezelésében. Reverz transzkriptáz inhibitor tulajdonsága miatt választottuk tesztelésre. [31]

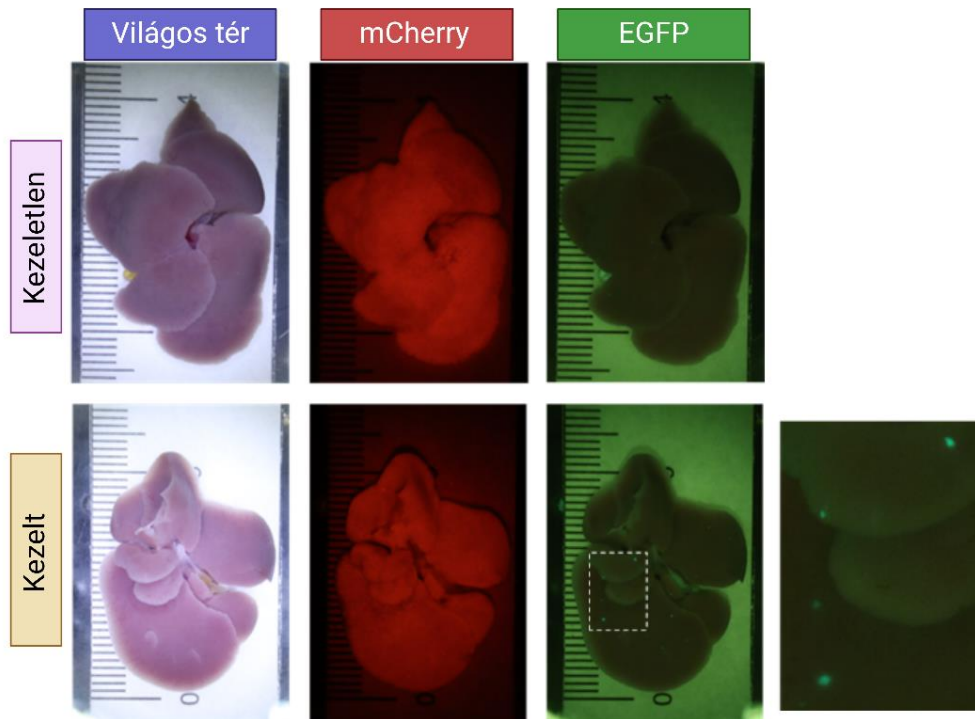
A **MeIQx** (2-amino-3,8-dimetil-imidazo[4,5-f]quinoxalin) egy heterociklickus aromás amin, amelyet elsősorban húsfélék magas hőfokon történő sütés-főzés során keletkezik. Az egyik legpotensebb mutagén és karcinogén anyagnak tartják, ami a táplálékkal a szervezetbe kerülve növelheti bizonyos rákfajták kialakulásának kockázatát.[32]

A **FICZ** (6-formilindolo[3,2-b]kARBazol) egy rendkívül érdekes vegyület, amely jelentős szerepet játszik a biológiai folyamatokban. Elsősorban erős affinitásáról ismert az aryl-hidrogén receptorhoz (AhR), egy olyan transzkripciós faktorhoz, amely számos biológiai folyamatban vesz részt, például a xenobiotikumok metabolizmusában, a sejtnövekedésben és a gyulladásos válaszokban. [33]

Az alábbi ábrákon megfigyelhetjük, hogy a már hidrodinamikailag beoltott és NTBC-től megvont egér májak esetében milyen változás ment végbe 3 hónapig tartó kemikália kezelés hatására.



10. Ábra: Az mCherry és EGFP fehérje expressziója kezelt és kezeletlen májak esetében



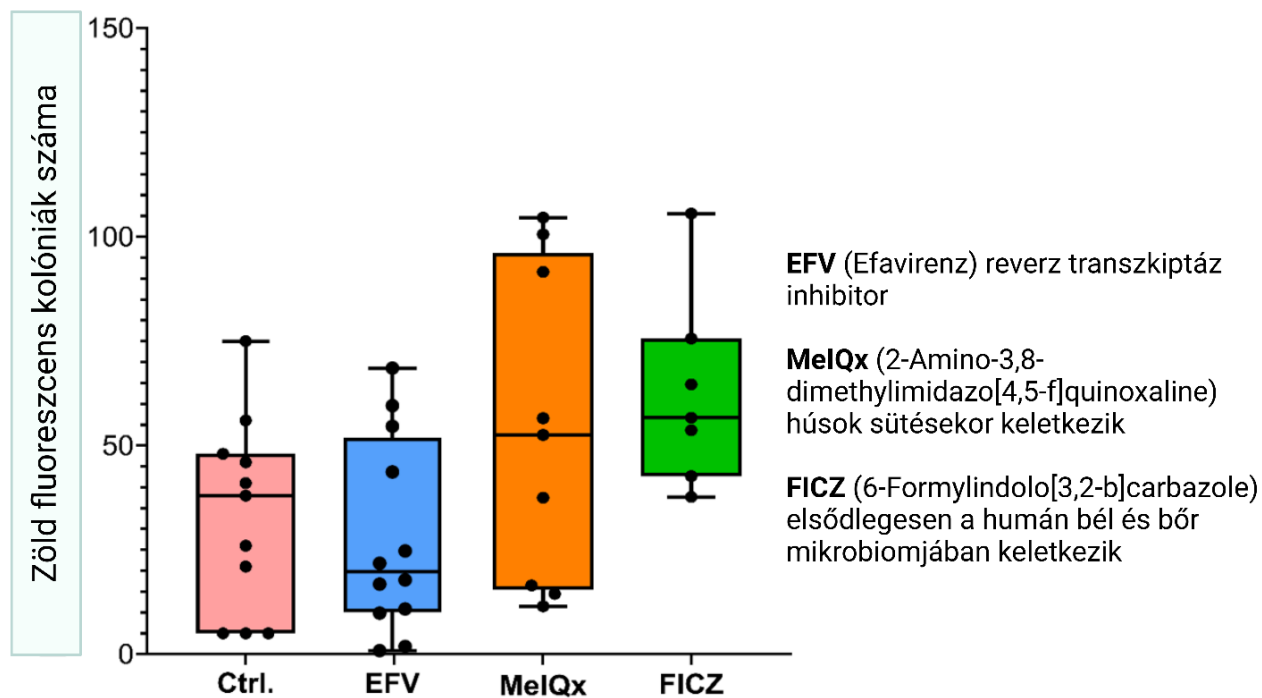
11. Ábra: Kezelt és kezeletlen májak makrovizualizációja világos tér, mCherry és EGFP megvilágítás során

Mindkét ábrán azt láthatjuk, hogy a májak szinte teljes felületükön expresszálják az mCherry fehérjét, míg a retrotranszpozíció detektálására alkalmas EGFP jelet expresszáló sejtek több kolóniát alkotnak a kezelt állatok májában, mint a kezeletlenek esetében.

A kezelések sikerességét az alapján értékeltük ki, hogy makrovizualizáció során a májak felszínén mennyi EGFP pozitív kolóniát számoltunk meg. Ezeket az adatokat az alábbi táblázatba rendszereztük, illetve box plot-on ábráztuk.

	Kontroll	Efavirenz	MelQx	FICZ
Átlag	33.273	27.833	54.444	62.714
Medián	38	20	53	57
Szórás	23.066	23.304	37.370	22.962

Táblázat 3 Felszíni EGFP pozitív kolóniák átlaga, mediánja és szórása 3 hónap kezelés után.



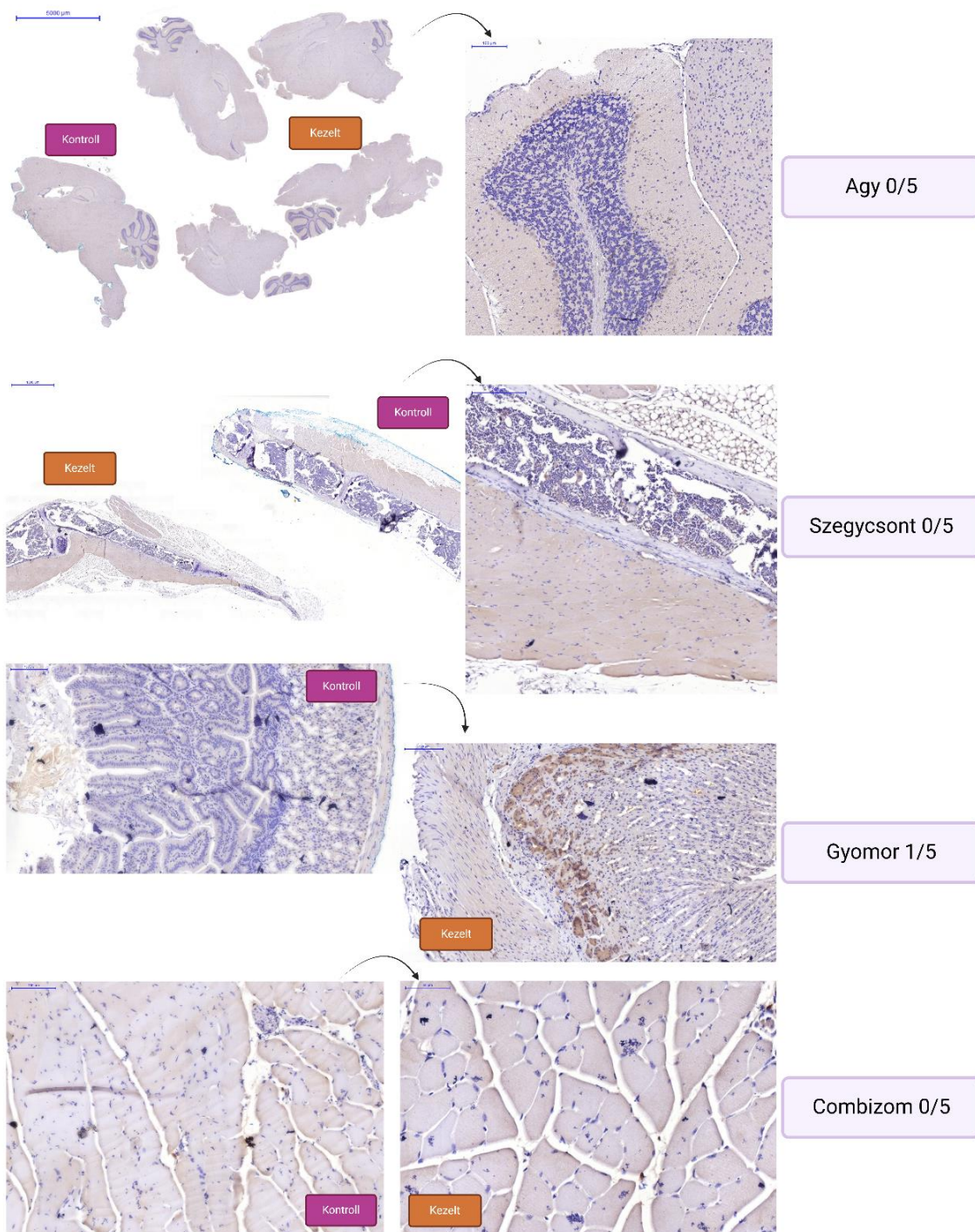
12. Ábra: A zöld fluoreszcens kolóniák száma box plotban ábrázolva

A kapott adatok alapján azt láthatjuk, hogy a kontrollhoz képest az Efavirenz nem mutatott lényeges különbséget, addig a MelQx és a FICZ szignifikáns eltérést mutat a kolóniák számának tekintetében, és így a végbemenő L1 retrotranszpozíciós eseményekben is.

Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy számos vegyi anyag képes lehet a szomatikus L1 retrotranszpozíciós aktivitás kiváltására/növelésére, ezáltal a rák kialakulási kockázatának növelésére.

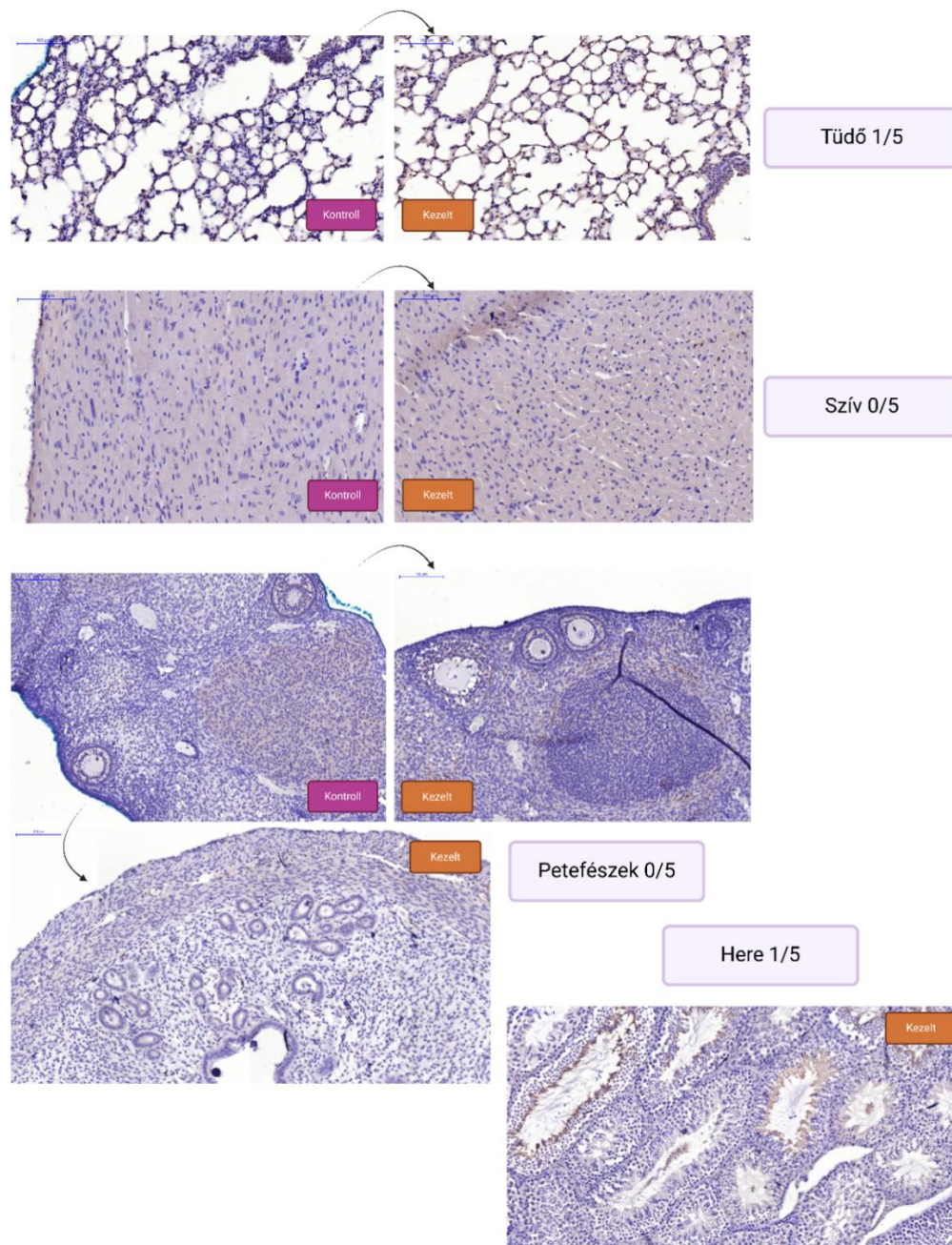
5.2 *In vivo* mCherry szenzitív immunhisztokémia

A metszetek kiértékeléséhez kialakítottunk egy pontrendszert, melynek 5 lépcsője van a festődés erőssége szerint. 0 értéket kapott az a szövet, melyben nem kaptunk specifikus jelet. Amennyiben minden sejt erősen expresszálja a jelet, akkor 5-s jelölést kapott.



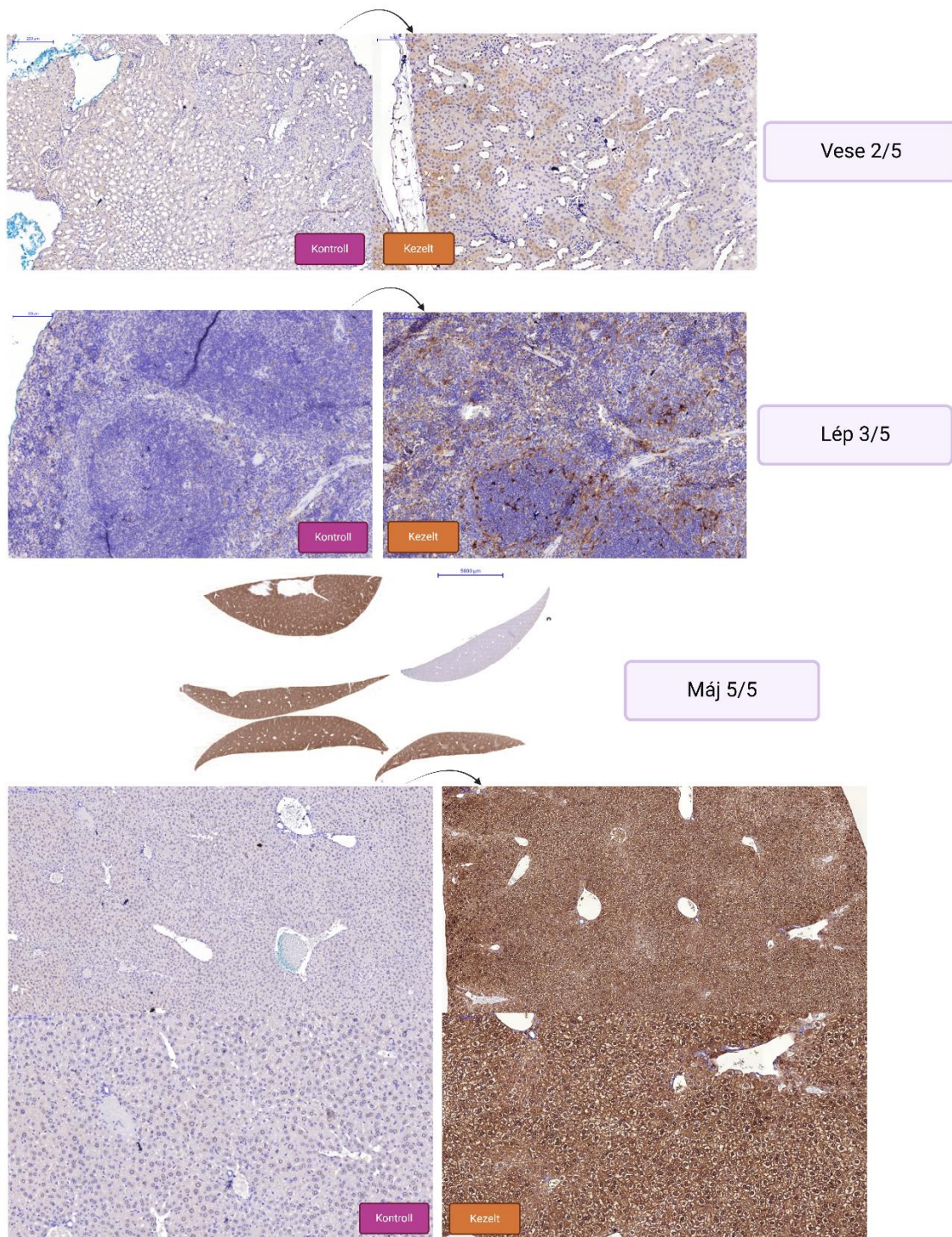
13. Ábra: mCherry specifikus IHC egér agy-, szegycsont-, gyomor-, combizom szövetekben

Az agy, a szegycsont és a combizom szövettani vizsgálata során nem észleltünk specifikus festődési eltérést. A gyomorban azonban a fundusmirigyek bazális részén elhelyezkedő fősejtek pozitív festődést mutattak.



14. Ábra: *mCherry* specifikus IHC egér tüdő-, szív-, petefészek-, here szövetekben

A szív és petefészek metszeteken nem észleltünk pozitív festődést. A tüdő alveolusainak hámsejtjei minimális, nem specifikus festődést mutattak. A herében a spermatozoák pozitív festődést mutattak, azonban kontroll állat hiányában ennek jelentősége nem egyértelmű. A gyomorban, tüdőben és herében tapasztalt festődés feltehetően a sejtek gyors proliferációjával állhat összefüggésben.



15. Ábra: mCherry specifikus IHC egér vese-, lép-, máj szövetekben

A hisztopatológiai vizsgálat során a vese nephronjainak kanyarultas csatornáiban specifikus festődési reakciót tapasztaltunk. A lépben a pozitív festődés a szerv immunológiai funkciójával állhat összefüggésben, figyelembe véve a lépben zajló immunfolyamatokat.

A májban rendkívül erős és kiterjedt festődést észleltünk, ami arra utal, hogy a bejuttatott mCherry fehérje szinte teljes mértékben a májsejtekben lokalizálódott. Ez az eredmény alátámasztja azt a hipotézist, hogy az intravénás úton beadott, LNP-be csomagolt mRNS elsősorban a májba kerül és ott halmozódik fel.

6 Jövőbeli tervek

Jövőbeli tervünk egy olyan innovatív genotoxicitási teszt kifejlesztése, amely széles körben alkalmazható a különböző iparágakban, beleértve a vegyi és gyógyszeripari szektort is. Ennek a tesztnek köszönhetően hatékonyan szűrhetjük ki azokat az anyagokat, amelyek az L1 retrotranszpozon rendszer aktiválása révén károsíthatják a genetikai anyagot. Jelen kutatásunk során folyamatban van egy olyan, módosított GFP változat létrehozása, amely segítségével sokkal érzékenyebben tudjuk detektálni a retrotranszpozíciós eseményeket. Ez a fejlesztés önmagában is jelentős áttörést jelent a molekuláris biológia területén.

A jelenleg érvényben lévő állatvédelmi szabályozásoknak megfelelően törekszünk arra, hogy a genotoxicitási esszénket *in vitro* körülmények között, *ex vivo* egér primer hepatocita tenyészetén végezhessük el. Ez a megközelítés lehetővé teszi, hogy jelentősen csökkentsük a felhasznált állatok számát a kísérletek során, és ezzel összhangban vagyunk az úgynevezett 3R elvvel (replacement, reduction, refinement). Azáltal, hogy az állatok helyett sejtkultúrákat használunk, nemcsak az állatok jólétét óvjuk, hanem a gyógyszerfejlesztés költségeit is csökkenthetjük, hiszen a hagyományos, állatokon végzett kísérletek hosszú időt és jelentős erőforrásokat igényelnek.

Hosszú távon célunk, hogy a genotoxicitási tesztünk széles körben elterjedjen és a hatályos jogszabályokba bekerüljön. Egy ilyen teszt nemcsak az emberi egészséget védi, hanem hozzájárulhat a környezet védelméhez is, hiszen segít azonosítani és kizárni a környezetre káros anyagokat.

7 Diszkusszió

A genetikával, a molekuláris és sejtbiológiával kapcsolatos kérdésekre gyakran a megfelelő kísérleti modellrendszerek/organizmusok segítségével lehet a legjobban válaszolni. Minden modellrendszernek vannak előnyei és hátrányai, és a legjobb rendszer használata a feltett kérdés függvénye. Úgy gondoljuk, hogy a modellrendszerek kulcsfontosságú szerepet fognak játszani abban, hogy részletesebb megértést nyerjünk az L1 mechanizmusáról, sejtbiológiájáról és a transzposzonok és a betegségi állapotok közötti kölcsönhatásról. [7]

A bemutatott kísérleti eredmények alapján a következő fő következtetéseket vonhatjuk le:

- **A MeIQx és a FICZ fokozza az L1 retrotranszpozíciót:** A kísérletek során megfigyeltük, hogy a MeIQx és a FICZ vegyületek jelentősen megnövelték a kolóniák számát, ami arra utal, hogy ezek a vegyületek képesek fokozni az L1 retrotranszpozíciót. Ez a megállapítás alátámasztja azt a hipotézist, hogy számos vegyi anyag képes kiváltani vagy fokozni a szomatikus L1 retrotranszpozíciót, ezzel növelve a rák kialakulásának kockázatát.
- **Az LNP-k hatékonyan szállítják az mRNS-t a májba:** Az intravénásan beadott, LNP-be csomagolt mCherry fehérje elsősorban a májsejtekben halmozódott fel, ami megerősíti, hogy az ilyen módon beadott mRNS elsősorban a májban koncentrálódik.

A kapott eredmények alapján ígéretesnek tűnik annak a lehetősége, hogy transzpozáz mRNS-t LNP-be burkolva a májba juttassunk, így elősegítve a transzgenezist. Ez a módszer új lehetőségeket nyithat a genotoxikus anyagok azonosítására és a májbetegségek modellezésére.

Eljárásunk vélhetően alkalmazható lesz különböző májbetegségek modellezésére, új gyógyszerjelöltek hatásának vizsgálatára, vagy akár génterápiás eljárások kifejlesztésére. Az eredmények alapján úgy gondoljuk, hogy ez a technológia jelentős előrelépést jelent a májbetegségek kutatásában, és új utakat nyithat a hatékonyabb terápiák kifejlesztésében.

8 Köszönetnyilvánítás

Szeretném kifejezni őszinte hálám Mátés Lajosnak és Mátés-Nagy Andreának, akik befogadtak, és teret adtak, hogy szárnyalhassak a laborjukban, és szakmai iránymutatásukkal, türelmükkel és biztatásukkal nagyban hozzájárultak dolgozatom elkészítéséhez.

Külön köszönettel tartozom Karkas Rékának, aki mindig végtelen türelemmel és segítőkészséggel állt hozzám, és megmutatta egy molekuláris labor rejtelseit. Imre Gergelynek az értékes elméleti és gyakorlati tanácsait, May Raya-nak a reményt, hogy sose adjam fel, Verebi Olíviának a remek összhangot és rengeteg nevetést, Szalmási Katinkának a támogatását nem csak labor, hanem a mesterképzés keretein belül is.

Hálás vagyok férjemnek, Vecsernyés Endrének, aki végig mellettem állt, biztatott és támaszom volt a nehézségek során is *(és a sok-sok éjszakai virrasztások közepette is)*. Nélküle nem sikerült volna elérnem ezt, ahol most tartok.

Köszönettel tartozom a HUN-REN Szegedi Biológiai Kutatóközpontnak is, amely biztosította számomra a szükséges feltételeket a kutatásomhoz.

Külön köszönetet szeretnék mondani a SZTE - ÁOK Szent-Györgyi Albert Klinikai Központ - Patológiai Intézet munkatársainak, Sükösd Farkasnak, Pankotai-Bodó Gabriellának, Csikós Ivettnek és többieknek a készséges közös munkáért.

Bízom benne, hogy a szakdolgozatomban megszerzett tudás és tapasztalat hasznos lesz számomra a további tanulmányaim során.

9 Irodalomjegyzék

- [1] T. G. B. and P. L. Hofmarcher, 'Comparator report on cancer in Europe 2019—disease burden, costs and access to medicines. No. 2019: 7. IHE-The Swedish Institute for Health Economics', 2019, Accessed: Nov. 03, 2024. [Online]. Available: https://ihe.se/wp-content/uploads/2020/10/IHE-Report-2019_7_.pdf
- [2] Bruce A. J. Ponder, 'Cancer genetics', 2001. doi: <https://doi.org/10.1038/35077207>.
- [3] H. Turkez, M. E. Arslan, and O. Ozdemir, 'Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade', Oct. 03, 2017, *Taylor and Francis Ltd*. doi: 10.1080/17425255.2017.1375097.
- [4] G. J. Pharmaceu Sci, M. Saks, S. Upreti, and R. Dang, 'Genotoxicity: Mechanisms, Testing Guidelines and Methods', *Review Article*, vol. 1, 2017, doi: 10.19080/GJPPS.2017.02.555575.
- [5] 'OECD Guidelines for the Testing of Chemicals'.
- [6] Jose L. Garcia-Pérez, 'Transposons and Retrotransposons Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 1400', 2016. doi: 10.1007/978-1-4939-3372-3.
- [7] Abram Gabriel, 'Retrotransposons Human Disease and L1 Retrotransposons as a Source of Genetic Diversity', 2022. doi: https://doi.org/10.1142/9789811249228_fmatter.
- [8] E. M. Ostertag and H. H. Kazazian Jr, 'Biology of Mammalian L1 Retrotransposons', *Annu Rev Genet*, vol. 35, no. 1, pp. 501–538, Dec. 2001, doi: 10.1146/annurev.genet.35.102401.091032.
- [9] C. R. Beck, J. L. Garcia-Perez, R. M. Badge, and J. V. Moran, 'LINE-1 elements in structural variation and disease', Jul. 13, 2011. doi: 10.1146/annurev-genom-082509-141802.
- [10] J. S. Han, 'Open Access REVIEW BioMed Central Non-long terminal repeat (non-LTR) retrotransposons: mechanisms, recent developments, and unanswered questions', 2010. [Online]. Available: <http://www.mobilednajournal.com/content/>
- [11] K. H. Burns, 'Transposable elements in cancer', Jul. 01, 2017, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/nrc.2017.35.
- [12] M. S. Protasova, T. V. Andreeva, and E. I. Rogaev, 'Factors regulating the activity of line1 retrotransposons', *Genes (Basel)*, vol. 12, no. 10, Oct. 2021, doi: 10.3390/genes12101562.
- [13] W. An *et al.*, 'Characterization of a synthetic human LINE-1 retrotransposon ORFeus-Hs', *Mob DNA*, vol. 2, no. 1, 2011, doi: 10.1186/1759-8753-2-2.
- [14] A. G. Kopasz *et al.*, 'A versatile transposon-based technology to generate loss- and gain-of-function phenotypes in the mouse liver', *BMC Biol*, vol. 20, no. 1, Dec. 2022, doi: 10.1186/s12915-022-01262-x.

- [15] L. Mátés *et al.*, 'Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates', *Nat Genet*, vol. 41, no. 6, pp. 753–761, Jun. 2009, doi: 10.1038/ng.343.
- [16] N. Okudaira *et al.*, 'Involvement of retrotransposition of long interspersed nucleotide element-1 in skin tumorigenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate', *Cancer Sci*, vol. 102, no. 11, pp. 2000–2006, Nov. 2011, doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02060.x.
- [17] N. Okudaira, Y. Ishizaka, and H. Nishio, 'Retrotransposition of long interspersed element 1 induced by methamphetamine or cocaine', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 289, no. 37, pp. 25476–25485, Sep. 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.559419.
- [18] L. Battaglia and M. Gallarate, 'Lipid nanoparticles: State of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery', May 2012. doi: 10.1517/17425247.2012.673278.
- [19] X. Hou, T. Zaks, R. Langer, and Y. Dong, 'Lipid nanoparticles for mRNA delivery', Dec. 01, 2021, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41578-021-00358-0.
- [20] I. A. Boldyrev, V. P. Shendrikov, A. G. Vostrova, and E. L. Vodovozova, 'A Route to Synthesize Ionizable Lipid ALC-0315, a Key Component of the mRNA Vaccine Lipid Matrix', Apr. 01, 2023, *Pleiades Publishing*. doi: 10.1134/S1068162023020061.
- [21] L. Zhang *et al.*, 'Effect of mRNA-LNP components of two globally-marketed COVID-19 vaccines on efficacy and stability', *NPI Vaccines*, vol. 8, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1038/s41541-023-00751-6.
- [22] F. Ferraresso, A. W. Strilchuk, L. J. Juang, L. G. Poole, J. P. Luyendyk, and C. J. Kastrup, 'Comparison of DLin-MC3-DMA and ALC-0315 for siRNA Delivery to Hepatocytes and Hepatic Stellate Cells', *Mol Pharm*, vol. 19, no. 7, pp. 2175–2182, Jul. 2022, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.2c00033.
- [23] BroadPharm, 'ALC-0315', https://broadpharm.com/product/bp-25498?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiArby5BhCDARIsAIJvjITMeWTpE7r2EtIjE1eldmYGjytEsoaPKYcIokaZwPGEzrvvSWSMI0QaArbhEALw_wcB.
- [24] M. Mähler *et al.*, 'FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units', *Lab Anim*, vol. 48, no. 3, pp. 178–192, Jan. 2014, doi: 10.1177/0023677213516312.
- [25] J. B. Bell, K. M. Podetz-Pedersen, E. L. Aronovich, L. R. Belur, and R. S. McIvor, 'Preferential delivery of the sleeping beauty transposon system to livers of mice by hydrodynamic injection', *Nat Protoc*, vol. 2, no. 12, pp. 3153–3165, Dec. 2007, doi: 10.1038/nprot.2007.471.

- [26] I. Portier *et al.*, 'High and long-term von Willebrand factor expression after Sleeping Beauty transposon-mediated gene therapy in a mouse model of severe von Willebrand disease', *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, vol. 16, no. 3, pp. 592–604, Mar. 2018, doi: 10.1111/jth.13938.
- [27] L. Bertrand, L. Dygert, and M. Toborek, 'Antiretroviral Treatment with Efavirenz Disrupts the Blood-Brain Barrier Integrity and Increases Stroke Severity', *Sci Rep*, vol. 6, Dec. 2016, doi: 10.1038/srep39738.
- [28] H. Ohgaki, H. Hasegawa, M. Suenaga, S. Sato, S. Takayama, and T. Sugimura, 'Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) from cooked foods', 1987. [Online]. Available: <http://carcin.oxfordjournals.org/>
- [29] G. Nauwelaers *et al.*, 'DNA adduct formation of 4-aminobiphenyl and heterocyclic aromatic amines in human hepatocytes', *Chem Res Toxicol*, vol. 24, no. 6, pp. 913–925, Jun. 2011, doi: 10.1021/tx200091y.
- [30] M. Keshavarzi, M. J. Khoshnoud, A. Ghaffarian Bahraman, and A. Mohammadi-Bardbori, 'An Endogenous Ligand of Aryl Hydrocarbon Receptor 6-Formylindolo[3,2-b]Carbazole (FICZ) Is a Signaling Molecule in Neurogenesis of Adult Hippocampal Neurons', *Journal of Molecular Neuroscience*, vol. 70, no. 5, pp. 806–817, May 2020, doi: 10.1007/s12031-020-01506-x.
- [31] B. Costa and N. Vale, 'Efavirenz: History, Development and Future', Jan. 01, 2023, *MDPI*. doi: 10.3390/biom13010088.
- [32] H. Ohgaki, H. Hasegawa, M. Suenaga, S. Sato, S. Takayama, and T. Sugimura, 'Carcinogenicity in mice of a mutagenic compound, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) from cooked foods', 1987. [Online]. Available: <http://carcin.oxfordjournals.org/>
- [33] A. Rannug and U. Rannug, 'The tryptophan derivative 6-formylindolo[3,2-b]carbazole, FICZ, a dynamic mediator of endogenous aryl hydrocarbon receptor signaling, balances cell growth and differentiation', Aug. 09, 2018, *Taylor and Francis Ltd*. doi: 10.1080/10408444.2018.1493086.