

Humán szövetspecifikus DNS-szekvenciák hatása sejtkultúra modellekben

Doktori értekezés

dr. Fűri István

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Béla, tudományos tanácsadó, az MTA doktora
Konzulens: Dr. Múzes Györgyi, egyetemi docens, Ph.D., C.Sc., Habil.
Programvezető: Prof. Dr. Tulassay Zsolt, egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Hivatalos bírálók: Dr. Bödör Csaba, tudományos főmunkatárs, Ph.D.
Dr. Rakonczay Zoltán, tudományos tanácsadó, az MTA doktora
Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Tóth Sára, egyetemi docens, Ph.D., Habil.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Erika, osztályvezető főorvos, Ph.D.
Dr. Sebestyén Anna, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest

2016

TARTALOMJEGYZÉK

2	BEVEZETÉS	7
2.1	A vastagbél szövettani szerkezete.....	7
2.2	A sejtek közötti kommunikáció a kolorektális adenoma-karcinóma szekvenciában....	8
2.3	A daganatsejtek növekedését és terjedését támogató faktorok	9
2.4	A szabad DNS felfedezése.....	10
2.5	A sejten kívüli DNS, mint szabályozó molekula	11
2.6	A cfDNS egyéb hatásai	11
2.7	DNS érzékelő rendszerek.....	12
2.7.1	A TLR9 jelátviteli útvonal	12
2.7.2	A STING jelátviteli útvonal	14
2.8	A szabad DNS vastagbélhámra gyakorolt hatása	15
2.9	A CpG DNS szekvenciák és az LPS hatása a perifériás vér mononukleáris sejtjeire	16
3	CÉLKITŰZÉSEK.....	18
4	MINTÁK ÉS MÓDSZEREK	19
4.1	HT-29 sejt kultúra	19
4.2	DNS izolálás HT-29 sejt kultúrából.....	19
4.3	DNS izolálás sebészileg eltávolított szövetmintákból	19
4.4	DNS hipermetiláció és fragmentálás	20
4.5	DNS kezelés és teljes RNS izolálás	22
4.6	Reverz Transzkripció (RT) és valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)	23
4.7	mRNS expressziós microarray vizsgálatok	25
4.8	Immuncitokémiai vizsgálatok.....	27
4.9	Az immuncitokémiai vizsgálatok kiértékelése	28

4.10 HT-29 sejteken végzett viabilitási vizsgálatok	28
4.11 Kvantitatív 5-metilcitozin arány meghatározás HT-29, SW480 és Caco2 vastagbél karcinóma sejt kultúrák genomiális DNS-éből és a kezeléshez használt egészséges illetve vastagbélkarcinómás szöveti párokból	29
4.12 Az egészséges donoroktól származó perifériás vér mononukleáris sejtjein elvégzett vizsgálatok	30
4.12.1 Egészséges önkéntesek.....	30
4.12.2 PBMC sejtek szeparációja.....	30
4.12.3 DNS kezelés, LPS kezelés, teljes RNS izoláció és a humán T- és B-sejt-aktivációs PCR Array vizsgálati módszer	31
5 EREDMÉNYEK.....	32
5.1 5-metilcitozin meghatározás vastagbél karcinóma sejt vonalak genomiális DNS szekvenciáiból és a kezeléshez használt egészséges, vastagbélkarcinómás szöveti párokból	32
5.2 A HT-29 sejt vonalból izolált (hipometilált) és módosított (hipermetilált, fragmentált) DNS szekvenciák hatása a TLR9 jelátviteli útvonal génjeire HT-29 adenokarcinóma sejtekben	33
5.3. A HT-29 vastagbélkarcinóma sejt vonalból izolált saját és módosított DNS szekvenciák hatása a CK és a DNMT3a fehérjék expressziójára	36
5.4 Az egészséges és tumor szöveti DNS hatása HT-29 vastagbél karcinóma sejtekre ...	41
5.5 A TLR9 útvonal fő elemeinek vizsgálata qRT-PCR-rel, és az útvonal annotált génjeinek azonosítása Affymetrix microarray rendszeren.....	43
5.6 CK20, E-cadherin, DNMT3a vizsgálata immuncitokémiával.....	44
5.7 A HT-29 sejteken elvégzett sejtviabilitási vizsgálatok eredményei	48
5.8 A perifériás vér mononukleáris sejtjein elvégzett génexpressziós kísérletek eredményei	49
6 MEGBESZÉLÉS	58
6.1 A saját és módosított (hipermetilált, fragmentált) DNS szekvenciák hatása.....	59

6.2 Az egészséges és tumor szöveti DNS eltérő hatása HT-29 vastagbél karcinóma sejtekben	60
6.3 Egészséges önkéntesek perifériás vérének mononukleáris sejtjein végzett génexpressziós kísérletek eredményei	62
7 KÖVETKEZTETÉSEK.....	63
8 LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS MEGFIGYELÉSEK	65
9 ÖSSZEFOGLALÁS	66
9.1 Magyar összefoglaló	66
9.2 Angol összefoglaló	67
10 IRODALOMJEGYZÉK	68
11 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	79
11.1 A disszertáció témájában megjelent közlemények	79
11.1.1 Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények	79
11.1.2 Magyar folyóiratban megjelent közlemények	79
11.2. A disszertáció témájától eltérő témában megjelent közlemények	79
11.2.1 Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények	79
12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	81
13. FÜGGELÉK	83

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

5-mC	5-metilcitozin
°C	fok Celsius
APC	antigén prezentáló sejt
BSA	marha szérum albumin (Bovine Serum Albumine)
cf-DNA	szabad dezoxiribonukleinsav (cell-free DNA)
CAF	karcinóma-asszociált fibroblaszt (carcinoma associated fibroblast)
CD	sejtfelszíni molekulák (Cluster of Differentiation)
CpG	citozin-guanin dinukleotid
CRC	kolorektális rák (colorectal cancer)
Ct	detektálási határ (cycle threshold)
COX-2	ciklooxygenáz 2
CXCL	kemokin (C-X-C motívum) ligandum
DAMP	veszély-asszociált molekuláris mintázatok
dCt	delta CT, a referencia és a vizsgált gén közötti ciklusszám különbség a valós idejű PCR során
ddCt	a vizsgált gén két mintacsoport közötti normalizált ciklusszám különbsége a valós idejű PCR során
DNMT	DNS-metiltranszferáz
DNS	dezoxiribonukleinsav
dsDNS	kettősszálú dezoxiribonukleinsav
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ErbB	epidermális növekedési faktor receptorcsalád
EGF	epidermális növekedési faktor
FC	Fold Change, expressziós változás mértéke

GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz gén (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
GEO	Gene Expression Omnibus adatbázis
HGF	hepatocita növekedési faktor
IFN- α	interferon alfa
IGF	inzulinszerű növekedési faktor
IL	interleukin
IRAK	interleukin receptor-asszociált kináz
IRF	interferon termelést reguláló faktor
LPS	lipopoliszacharid
MMP	mátrix metalloproteináz
mRNA	hírvivő ribonukelinsav
MYD 88	myeloid differenciáló faktor 88
NFkB	nukleáris faktor kB
ODN	oligodezoxinukleotid
PAM	Prediction Analysis for Microarrays statisztikai elemző módszer
PAMP	patogén-asszociált molekuláris mintázatok
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejtjei
PBS	foszfát puffer (Phosphate Buffer Saline)
PCR	polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction)
pDC	plazmacitoid dendritikus sejt
PI	propídium jodid
PI3K	foszfatidil-inozitol 3'-kináz (phosphatidylinositol 3'-kinase)
PI3K/AKT/	foszfatidil inozitol kináz – AKT jelátviteli útvonal

RIN	RNS integritási szám (RNA Integrity Number)
RNS	ribonukleinsav
RN-ase	RN-áz, ribonukleáz
RT-PCR	valós idejű polimeráz láncreakció (Real-Time PCR)
SAM	S-adenozil-metionin
STING	interferon gén stimuláló jelrendszer
SFRP1	szekretált frizzled-rokon fehérje 1
TGF β	transzformáló növekedési faktor- β
Th	segítő T-limfocita
TKI	tirozin kináz inhibitor
TLR	toll-szerű receptor (toll-like receptor)
TLR9	toll-szerű receptor 9 (toll-like receptor 9)
TNF- α	tumor nekrosis faktor alfa
TRAF6	tumor nekrosis faktor alfa-asszociált faktor 6
Twist	Twist transzkripció faktor
ZEB	cinkujj E-box-kötő homeobox fehérje

2 BEVEZETÉS

2.1 A vastagbél szövettani szerkezete

A vastagbél a béltraktusnak a csípőbél beszájadásától (valvula ileocecalis; Bauhin-billentyű) a végbélnyílásig terjedő szakasza. Fő feladatai közé tartozik az ionok, a víz és vitaminok felszívása a bélcsatornából, valamint az emészthetetlen salakanyagok perisztaltikus továbbítása a vékonybélből a külvilág felé. Hossza 150–160 cm, átmérője: 6–8 cm, amely a végbélnyílás irányába fokozatosan csökken. A vastagbél anatómiailag vakbélre, felszálló-, haránt-, és leszálló vastagbélre, szigtabélre és végbélre osztható [1].

A vastagbélben a következő szövettani rétegek különíthetők el:

1. nyálkahártya (tunica mucosa), (amelyet további három szövettani réteg alkot, a hámréteg (lamina epithelialis mucosae), kötőszövetes réteg (lamina propria mucosae) és a mirigyekhez tartozó izomszövet (lamina muscularis mucosae),
2. kötőszövetes réteg (tunica submucosa) és a
3. a bélcső körkörös és hosszanti izomrétege (tunica muscularis) (1).

A vastagbelet kutikulás hengerhám béleli, a hengerhámsejtek között kehelysejtek helyezkednek el, amelyek a nyáktermelésért felelősek. Ez a hámbélés terjed be a nyálkahártya saját kötőszövetes rétegébe, egymás mellett sűrűn és szabályosan elhelyezkedő mirigyekbe, amelyeket Lieberkühn kriptáknak nevezünk. A bélhámsejtek átlagos élettartama 5-6 nap, pótlásuk a kripta bazális részén elhelyezkedő, osztódó őssejtekből történik. Az őssejtek leánysejtjei a kripták lumináris felszíne felé vándorolnak, miközben hengerhámsejteké, vagy kehelysejteké differenciálódnak. Az egészséges vastagbélben a nyálkahártya felületéről leváló és elhaló sejtek mennyisége egyensúlyban van. Ha ez az egyensúly a sejtszétválás felé tolódik el, úgy lokális sejtszaporulatok képződnek. Ezekből polipok alakulhatnak ki, amelyeket a vastagbél-daganatok fő kiindulási állapotának tartunk (2).



1.ábra: A vastagbél szövettani szerkezete (forrás: Röhlich Pál, Szövettan(1))

2.2 A sejtek közötti kommunikáció a kolorektális adenoma-karcinóma szekvenciában

A sporadikus vastagbélrák kialakulásával kapcsolatos legfontosabb elmélet az adenoma - karcinóma szekvencia modell, amely kidolgozása Vogelstein és munkatársai nevéhez fűződik (3, 4). Tanulmányukban leírják, hogy a karcinóma jóindulatú előalakból, diszplasztikus elváltozásokat mutató adenomából fejlődik ki. A vastagbél nyálkahártyájában a korai (pl. APC, K-ras) és késői (pl. DCC és p53 tumorszuppresszor gének) mutációk, valamint epigenetikai változások (pl. promóter hipo- és/vagy hipermetiláció) felhalmozódásával alakul ki a vastagbél-daganat (4-6),

Adenomában és karcinómában is jellegzetes a kötőszövetes állomány (stroma) sejttösszetételének, mint mikrokörnyezetnek (niche-nek) a megváltozása (7). Az abnormalis mikrokörnyezet kötőszöveti sejtjei, valamint az adenoma hám és a hám eredetű karcinóma sejtek által termelt autokrin és parakrin módon ható szabályozó molekulák fontos szerepet játszanak a daganatok kialakulásában és az áttétképzésben egyaránt (7). A szabályozó molekulák oldott (szolubilis) formában, illetve sejtmembránnal körülvett komplexek formájában (pl. mikrovezikulák, apoptotikus testek) érik el a sejtet, ahol sejt felszíni, vagy endocitózist követően sejten belüli receptorokat aktiválnak (8, 9). A tumorok esetében ez a receptor-ligandum kapcsolat olyan jelátviteli útvonalakat aktivál, amelyek a normálistól eltérő sejtfunciók (pl. megváltozott proliferációs tulajdonságok, receptor és ligandum termelés vagy angiogenezis) kialakulásához vezet (10, 11).

2.3 A daganatsejtek növekedését és terjedését támogató faktorok

A daganat és stromasejtek megváltozott ligandum termelése autokrin és parakrin módon hathat a tumorsejtek növekedésére, osztódására, valamint az áttétképző tulajdonságokra (12). Kiemelt szereppel bírnak a különböző módon ható növekedési faktorok (az IGF, a HGF, az ErbB receptorok ligandumai és a TGF- β). Az IGF az IGF1 receptorhoz kötődve az AKT jelátviteli út felülszabályozásával serkenti a sejtosztódást és csökkenti a programozott sejthalált (13), a HGF a c-MET proto-onkogén receptorához kötődve fejti ki sejtproliferációt növelő hatását (14). Az ErbB1-4 receptorok aktivációja kiemelt szerepet játszik a PI3K/Akt jelátviteli útvonal felülszabályozásában, ezáltal fokozva a sejtosztódást, angiogenezist és az áttétképzést (15). Az ErbB receptorok ligandumai közül az EGF az egyik legjobban feltérképezett, daganatnövekedésben fontos szerepet betöltő, jelátviteli utat indító fehérje. Prognosztikus és terápiás szempontból is kiemelt jelentőségű (16). Az EGF-EGFR jelátviteli útvonal gátlása kétféleképpen lehetséges: monoklonális antitestekkel (cetuximab és panatimumab) és tirozin kináz inhibitorokkal (TKI) (gefitinib, erlotinib, lapatinib) (17). A kolorektális daganatok monoklonális antitest terápiájában kiemelt szereppel bír a K-ras gén második exonjában lévő 12-es és 13-as kodonok mutációjának a

vizsgálata. Ezek a gyakran előforduló K-ras mutációk a monoklonális antitest terápia hatástalanságát okozzák (18).

A TGF β a TGF- β I és II receptorokhoz kötődve a Smad2 és Smad3 jelátviteli molekulákat foszforilálja, amelyek a Smad4 fehérjével komplexet képezve a sejtmagba transzlokálódnak, és különböző transzkripciós faktorokat (Twist, Zeb, Snai1) aktiválnak. A TGF β jelátviteli út aktivációja a tumorképződés során kettős hatással bír: míg a tumor kialakulásának első fázisában gátolja a sejtosztódást, addig a késői fázisokban onkogén citokinként növeli a daganatsejtek osztódását és elősegíti az áttétképződés folyamatát (19).

Nem utolsósorban kiemelkedő szereppel bírnak az anyagcserét és a sejtprolifерációt befolyásoló hormonok és hormonális neuropeptidek (inzulin, szomatosztatin). Hatásukkal serkentik a sejtosztódást és a sejtek anyagcseréjét, valamint gátolják az apoptózis folyamatát (20, 21).

A daganatnövekedést szintén jelentősen befolyásolják a tumorszuppresszor hatású ligandumok, amelyek közül a kolorektális daganatoknál kiemelendők a Wnt jelátviteli utat negatívan szabályozó ligandumok, mint a DKK protein (22) és a miofibroblaszt eredetű SFRP1 fehérje (23).

2.4 A szabad DNS felfedezése

A keringő szabad DNS (cf-DNA) 1948-as Mandel és Metais általi felfedezése (24) csak a felfedezést követően 30-40 évvel később került a figyelem középpontjába, amikor Leon és munkatársai a keringő szabad DNS szint emelkedését mutatták ki különböző daganattípusokban (25). Következő lépésként Stroun és munkatársai a keringő szabad DNS egy részének tumor eredetét igazolták, amely a daganat molekuláris karakterét hordozva "folyékony biopsziás mintaként" szolgálhat (26). A fentiek hatására megindult a szabad DNS (cf-DNA) szekvenciák elemzése, amelynek fő célja diagnosztikus és prognosztikus szereppel bíró mintázatok azonosítása ezekben a DNS szakaszokban (27-29).

2.5 A sejten kívüli DNS, mint szabályozó molekula

Számos tanulmány szerint (30-32) a tumor eredetű DNS fragmentumok (21-500 bázis hosszúságú DNS molekulák) szerepet játszanak a tumor kialakulását és terjedését támogató mikrokörnyezet létrejöttében és fenntartásában, azaz elősegítik a tumor invázióját és segítenek elkerülni a tumor-specifikus immunválaszt (33-36). A keringő szabad DNS származhat apoptotikus/nekrotikus tumorsejtekből, de az élő sejtek is bocsáthatnak ki cf-DNA-t a sejten kívüli térbe (37-40). A tumorszövet eredetű cf-DNA kimutatható a plazmában és a szérumban, és biomarkerként szolgálhat a daganatos betegségek kimutatásában (39). A cf-DNA számos daganat-specifikus mintázatot hordozhat, beleértve mutáns onkogéneket, tumorsuppresszor géneket, aberráns mikroszatellitákat és kromoszomális DNS szekvenciákat, valamint a daganatra jellemző metilációs mintázatokat (40). A legújabb vizsgálatok megerősítették a tumorsejtekből származó DNS szakaszok recipiens sejtek intracelluláris terébe történő felvételét. Ezek a daganat-specifikus DNS motívumok szerepet játszhatnak a recipiens sejtekben jelátviteli utak aktiválásában (pl. MAPK and Akt jelátviteli útvonalak) és ezáltal fokozott sejtnövekedést és sejtmorfológiai átalakulást is okozhatnak (41).

2.6 A cfDNA egyéb hatásai

Yu és munkatársai kimutatták, hogy az onkogének horizontális géntranszfer útján képesek bejutni a recipiens sejt genomjába és kórosan növelik a sejtosztódást, valamint fokozott motilitást is kiválthatnak (42). A horizontális géntranszfer egy jól leírt példája, amikor c-erbB-2 neu onkogén transzfekciójával megnőtt az NIH-3T3 egér-eredetű embrionális fibroblaszt sejtek ér endotél sejtekhez való adhézíós képessége. A kezelés hatására fokozott invazivitás volt megfigyelhető a bazális membránon keresztül, továbbá a jelátvitel hatására termelt kemotaktikus molekulák fokozták a fibroblaszt sejtek motilitását (42).

A Lee és munkatársai által 2014-ben közölt munka szintén kiemeli, hogy a daganatsejtek vezikulákba csomagolt kettősszállú DNS-t (dsDNS) bocsáthatnak ki, amely onkogéneket is tartalmazhat. Ezek az 50-200 nm méretű mikrovezikulák a sejtmembránon keresztül bejutnak a fogadó sejtekbe, majd beépülnek a recipiens sejt sejtmagjába és kóros sejtosztódást váltanak ki (43).

2.7 DNS érzékelő rendszerek

A szakirodalom szerint jelenleg két fő citoplazmatikus DNS molekulát érzékelő rendszer ismert: a toll-szerű receptor 9 (TLR9) és az interferon gén stimulátor (STING) jelátviteli útvonalak (44).

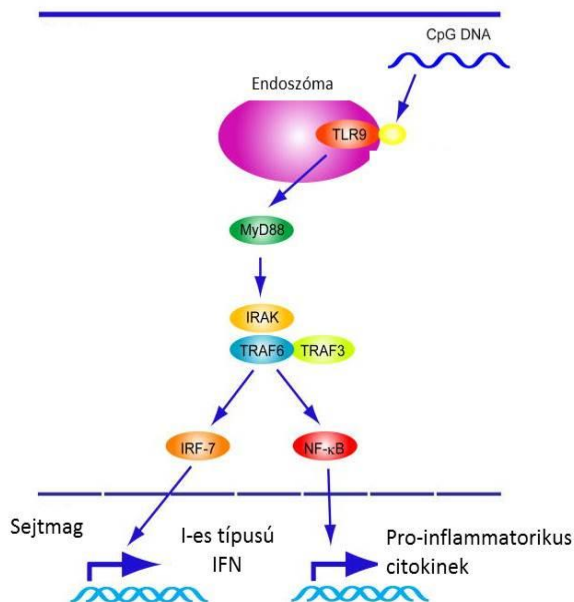
2.7.1 A TLR9 jelátviteli útvonal

A citoplazmatikus TLR9 endogén, illetve exogén eredetű patogén- és veszély-asszociált molekuláris mintázatokat (PAMP és DAMP) ismer fel, amelyekben nem-metilált DNS szakaszok előfordulása jellemző (45-47). A globális hipometiláció a daganatokban - többek között a kolorektális daganatban is - jól ismert jelenség (48-50), ami a daganatsejtek genomjából származó hipo- és hipermetilált DNS szakaszok génexpresszióra gyakorolt eltérő hatását feltételezi. A TLR9 DNS-t érzékelő receptor fokozott expresszióját számos tumortípusban (pl. prosztatata, nyelőcső- és méhnyakrák) kimutatták (51-54). A karcinóma sejtekben a megnövekedett TLR9 kifejeződés magasabb metasztatikus potenciállal társult, feltételezhetően a szöveti DNS hatására fokozódó mátrix-metalloproteináz (MMP) termelés vezetett a daganatsejtek fokozott invazivitásához (52). A stroma fibroblaszt-szerű sejtjeinek magasabb TLR9 expressziója azonban csökkentette az áttétek kialakulásának valószínűségét (55).

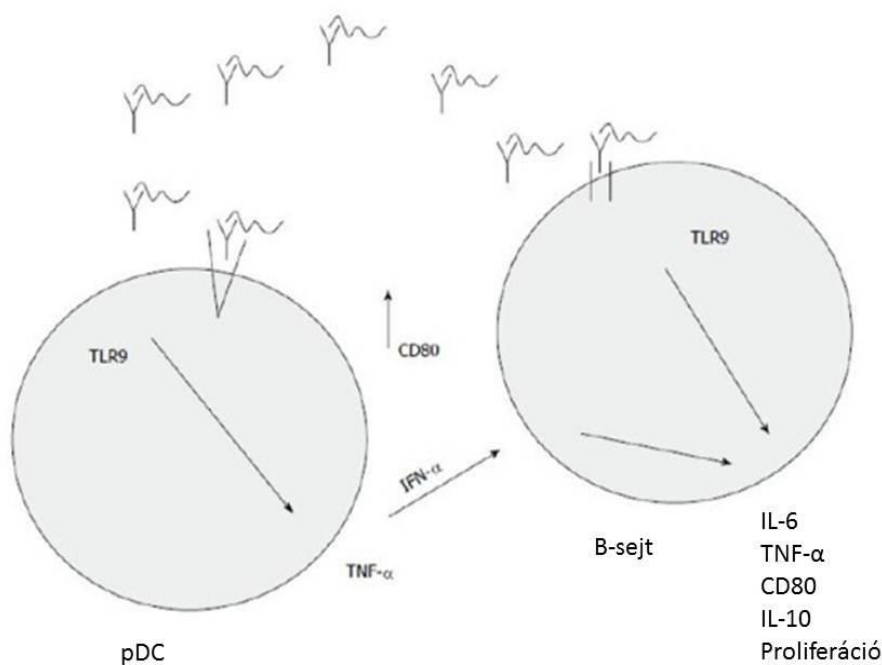
A TLR9 aktiválása bonyolult, soklépcsős folyamat. Az első lépés a DNS-szekvenciák felismerése és megkötése. Egyszálú DNS-t sok sejt képes bejuttatni az intracellulárisan (endoszómákban) elhelyezkedő TLR9 receptorig, a kettős szálú DNS bejutását pedig nagyban segíti a DNS szekvenciák kationaktív lipidbe való csomagolása (56,57). *Hacker és munkatársai* (1988) fluoreszcein izotiocianáttal jelölt CpG ODN-ek (szintetikus oligodezoxinukleotid szekvenciák) alkalmazásával bebizonyították, hogy a DNS-szekvenciák intracelluláris kompartmentbe való jutása endocitózissal történik (57). A fent leírt endocitózis nem specifikus folyamat, mivel a CpG-szekvenciákkal nem rendelkező ODN-ek is bejutnak így az endoszómába. Azt is sikerült igazolni, hogy a CpG ODN-nel való APC (antigén prezentáló sejt) aktiváció kompetitíven gátolható nem-CpG

szekvenciákkal, és olyan ágensekkel is, amelyek a sejt intracelluláris pH szintjét szabályozzák (pl. chloroquin, bafilomycin A) (57). A nem specifikus endocitózissal történő bejutás és a savas környezetben való érés után a különböző szignálmolekulák által közvetített jelátviteli útvonalakon keresztül citokinválasz érhető el (56,58). A citokinválasz egy bonyolult intracelluláris kaszkárendszer aktiválódásának eredménye, amelyben részt vesznek a MYD88, a TRAF6 és az IRAK1-4 fehérjék, valamint az NF κ B transzkripciót reguláló faktor, amely sejtmagba történő transzlokációja végső soron gyulladásos citokinválaszt és interferon képződést eredményez ((58), 2. Ábra)

A TLR9 CpG DNS-sel való aktiválása elősegíti a gyulladásos citokineket kódoló gének és a major hisztokompatibilis rendszer (MHC) II. osztályú antigénjeinek fokozott expresszióját. A plazmocitoid dendritikus sejtek (pDC-k) I. típusú interferonokat (IFN- α és β) termelnek, amelyek a B-sejtekben gyulladásos citokinek (IL-6, TNF- α) termelődését segítik elő ((56), 3. Ábra.)



2.ábra: A TLR9 jelátviteli útvonal(44)

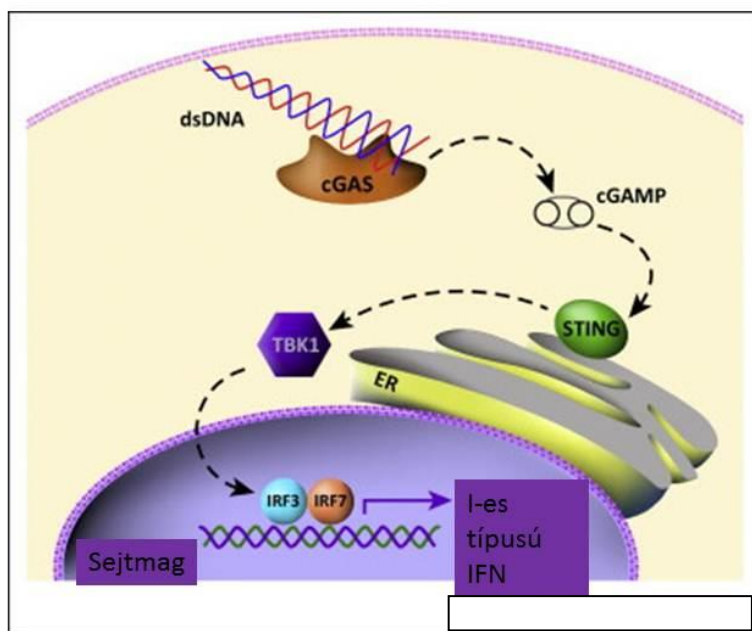


3. ábra: A TLR9 jelátviteli útvonal aktivációja által kiváltott (MHC) II. osztályú antigén- és citokinválasz (35,56)

2.7.2 A STING jelátviteli útvonal

A STING útvonalat (más néven TMEM173 molekula által indított jelátviteli utat) citoszolban lokalizált DNS érzékelő receptor-jelátviteli rendszerként írták le. A STING molekula a cGAS (ciklikus GMP-AMP szintáz) enzim működése által létrejött ciklikus dinukleotidokat (cGMP-AMP) ismeri fel, és aktiválja a perinukleárisan elhelyezkedő tankötő kinázt (TBK1-t), amely foszforilálja az interferon termelést reguláló faktorokat (IRF3 és IRF7) és ezáltal közvetlenül az I-es típusú interferonok termelését segíti elő (59,60). Woo és munkatársai a tumorszövetet infiltráló APC-k citoszoljában tumor eredetű DNS szekvenciákat mutattak ki, ami alátámasztja a STING citoszolikus DNS-t érzékelő rendszer által termelt I-es típusú interferonok tumorelleses immunitásban betöltött szerepét. A fenti

interferon termelés kulcslépés a tumorspecifikus T-sejtválaszban (61). A STING jelátviteli útvonalat a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra: A STING jelátviteli útvonal (59)

2.8 A szabad DNS vastagbélhámra gyakorolt hatása

Számos korábbi tanulmányban írták le a TLR9 fehérje kifejeződését vastagbélhámokban (62,63). A TLR9 DNS-t érzékelő receptornak a vastagbélhám élettani és kóros folyamataiban betöltött szerepe azonban nem tisztázott.

Akhtar és munkatársai azt figyelték meg, hogy a patogén eredetű (*E.coli*) DNS molekulák az IL-8 gén TLR9 aktiváció okozta felülexpresszióját eredményezték kolorektális karcinóma sejteken (HT-29, Caco-2, T84) (62).

További vizsgálatok bizonyították az IL-8 gén fokozott kifejeződését kolorektális karcinóma sejteken (HT-29, CaCo-2, DLD-1), foszforotioát-vázú, CpG szigetet tartalmazó szintetikus oligodezoxinukleotid szekvenciákkal (CpG ODN) történő kezelés hatására (63).

Kauppi és munkatársai a humán eredetű daganat-specifikus DNS molekulák TLR9 által közvetített hatását vizsgálták emésztőrendszeri daganatos sejtvonalakon (OE33 nyelőcsőrák, AGS gyomorrák, Caco2 vastagbélrák sejtvonalakban). A fenti vizsgálatokban humán eredetű daganat-specifikus kvadriplex DNS-t (h-Tel22 G-quadruplex) használtak, és a kezelés hatására jelentős invazivitás növekedést tapasztaltak. Ezek az eredmények felvetik a daganat-eredetű DNS invazivitást fokozó hatását (64).

2.9 A CpG DNS szekvenciák és az LPS hatása a perifériás vér mononukleáris sejteire

Bauer és munkatársai (1990) humán monociták, T és B-limfociták proliferációját vizsgálták CpG ODN kezelés hatására. Az aktivált humán monocitákban fokozódott az IL-6 és az IL-12 szekréciója (65). Fokozott TNF α termelődést csak a bakteriális DNS kezelés hatására figyeltek meg, azonban a CpG ODN szekvenciák nem okoztak jelentős TNF α szekréciót. A TLR9 aktiválása a CD40 és a CD86 ko-stimulációs molekulák fokozott termelését és B sejt proliferációt okozott, de nem volt hatással a T sejtek és a monociták proliferációjára (65). További tanulmányok igazolták, hogy a CpG ODN szekvenciák egér makrofág- és B-sejtvonalakban fokozták az NF κ B transzkripciós faktor aktivitását, és a B-sejtek fokozott osztódását váltották ki (66-68).

Krieg és munkatársai szerint a jövőben a tumor immunterápiában esetlegesen használandó DNS vakcináknak két fő komponenst kéne tartalmaznia: egy plazmidon kódolt fehérje antigént, ami meghatározná az immunválasz fajlagosságát és egy CpG DNS szekvenciát, amely közvetlenül képes aktiválni a B-sejteket, valamint a Th1 citokinek expressziójának és az antigén prezentáló sejteken (APC) a ko-stimulációs molekulák fokozott termelésének indukciója révén antigén specifikus immunválaszt indítana (69). A fenti megállapítások

feltételezik a TLR9 és más DNS érzékelő receptorok jelentős szerepét a tumorellenes immunitásban.

Hornung és munkatársai különböző TLR-ek (TLR 1-10) expresszióját vizsgálták egészséges önkéntesek PBMC mintáin és fokozott TLR9 kifejeződést tapasztaltak a pDC-kben és B-sejtekben. Vizsgálataikban kimutatták, hogy a pDC-k a CpG motívumok fő szenzorai az immunrendszerben és kiemelt szerepet töltenek be a DNS szekvenciák hatásának közvetítésében, szabályozzák más sejttípusok (monociták, T-sejtek, NK sejtek) aktivitását az általuk termelt citokinek, kemokinek, és más ko-stimulációs molekulák termelésével (70). Hatással lehetnek a Th1/Th2 polarizációra és differenciációra is (70). A TLR4 és TLR9 együttes kezelés hatására szignifikánsan csökkent 1-es típusú interferon termelést figyeltek meg a külön végzett TLR4 és TLR9 kezeléshez képest. Megfigyelésük szerint bizonyos TLR-ek együttes aktivációja szinergista, más TLR-ek antagonistá hatást fejtenek ki.

Egy másik tanulmány a lipopoliszacharid (LPS) aktiválta B-sejtek hatását vizsgálta a T-sejtek proliferációjára, és azt találták, hogy az LPS-sel (TLR4-agonista) aktivált, majd anti-CD3 monoklonális antitesthez kapcsolt B-sejtek - a tumorellenes T-sejt válasz elősegítése révén - erős tumorellenes hatással bírnak. (71). Feltételezhető az egyes TLR agonisták kölcsönös hatása a PBMC-k egyes sejtpopulációin, ami további vizsgálatok szükségességét veti fel a TLR-ek tumor immunitásban betöltött szerepének vizsgálata céljából.

3 CÉLKITŰZÉSEK

PhD munkám vizsgálati céljait az alábbi pontokban határoztam meg:

- 1, HT-29 sejtvonalból izolált és mesterségesen metilált, fragmentált DNS szekvenciák hatásának vizsgálata a TLR9 jelátviteli útra HT-29 vastagbél karcinóma sejtekben.
- 2, Az egészséges és vastagbél daganatos szöveti DNS hatásának feltérképezése HT-29 vastagbél karcinóma sejtvonalon teljes genomot lefedő génexpressziós módszerrel.
- 3, Az egészséges és vastagbél daganatos szöveti DNS TLR9 jelátviteli útvonalon kifejtett hatásának az vizsgálata HT-29 kolorektális sejtvonalon (qRT-PCR módszerrel).
- 4, Az egészséges és vastagbél daganatos szövetből kinyert DNS szekvenciák hatásának a vizsgálata HT-29 vastagbél karcinóma sejtek életképességére és sejtciklusára.
- 5, Az egészséges és vastagbél daganatos szövetből kinyert DNS hatásának a vizsgálata perifériás vér mononukleáris sejtjein.

4 MINTÁK ÉS MÓDSZEREK

4.1 HT-29 sejtkultúra

A HT-29 vastagbél karcinóma sejteket (LGC STANDARDS; ATCC® HTB-38™) RPMI 1640 tápfolyadékban 10% FBS-sel (v/v); (FBS Standard Quality; PAA Laboratories GmbH, Ausztria), 50 mg/ml gentamicinnel (Sandoz GmbH, Ausztria) és 2.50 µg/mL amfotericin B-vel (Sigma Aldrich, USA) kiegészítve az I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében (Semmelweis Egyetem) patogénmentes, steril szövettanyésző laboratóriumban 37 °C hőmérsékleten, 5% CO₂ és 95% páratartalom mellett tartottuk fenn.

4.2 DNS izolálás HT-29 sejtkultúrából

A DNS kezelésekhez használt genomiális DNS-t $\sim 5 \times 10^7$ HT-29 sejtől High Pure PCR Template Preparation kit (Roche GmbH, Németország) segítségével izoláltuk, amely proteináz K fehérjebontó enzimet is tartalmazott. Az izolált DNS mintákon 5 µl RNáz A/T1 Mix használatával (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Litvánia) 1 órán keresztül 37 °C-on RNáz kezelést alkalmaztunk, az RNS szennyeződés eltávolítása céljából. A DNS koncentrációt NanoDrop 1000 spektrofotométer (Thermo Scientific, Németország) segítségével határoztuk meg. A továbbiakban a HT-29 sejtkultúrából kivont DNS saját DNS-ként szerepel, mivel a HT-29 sejteket az első kísérlet során HT-29 sejtekből kivont DNS-sel kezeltük.

4.3 DNS izolálás sebészileg eltávolított szövetmintákból

A genomiális DNS izolálása sebészileg eltávolított makroszkóposan egészséges, illetve vastagbél tumoros szövetből történt, amelyhez a mintákat a Transzplantációs és Sebészeti Klinika (Semmelweis Egyetem) biztosította. A vastagbélbetegségben szenvedő betegek definitív szövettani diagnózissal (Dukes B és C stádium) rendelkeztek és nem részesültek operáció előtti kemo- illetve radioterápiában. Minden betegről beleegyező nyilatkozatot gyűjtöttünk, a mintagyűjtéshez szükséges etikai engedélyt (TUKEB 23970/2011) a

regionális etikai bizottság adta meg. Az izolált, fehérje-mentes DNS-t 20 µl RNáz A/T1 Mix (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Litvánia) alkalmazásával 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk. Az izolált, tisztított DNS mennyiségét és minőségét NanoDrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Németország) határoztuk meg.

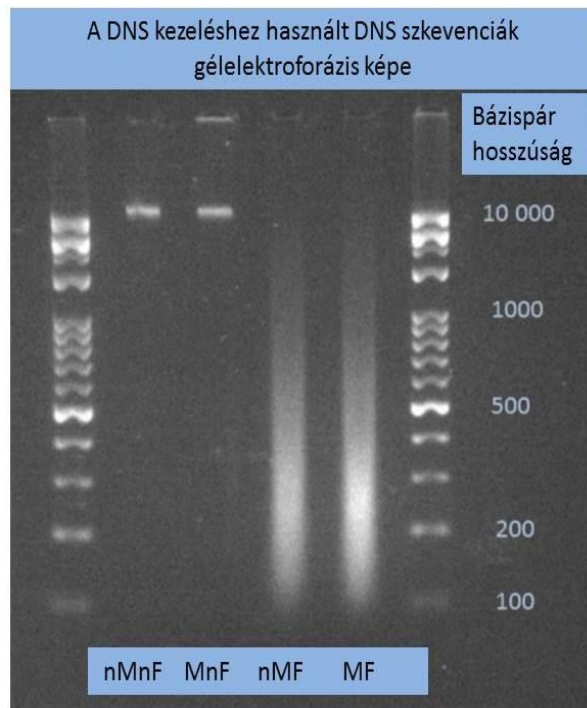
4.4 DNS hipermetiláció és fragmentálás

A sejtkísérletek során alkalmazott genomiális DNS-t négy egyenlő mennyiségre osztottuk fel:

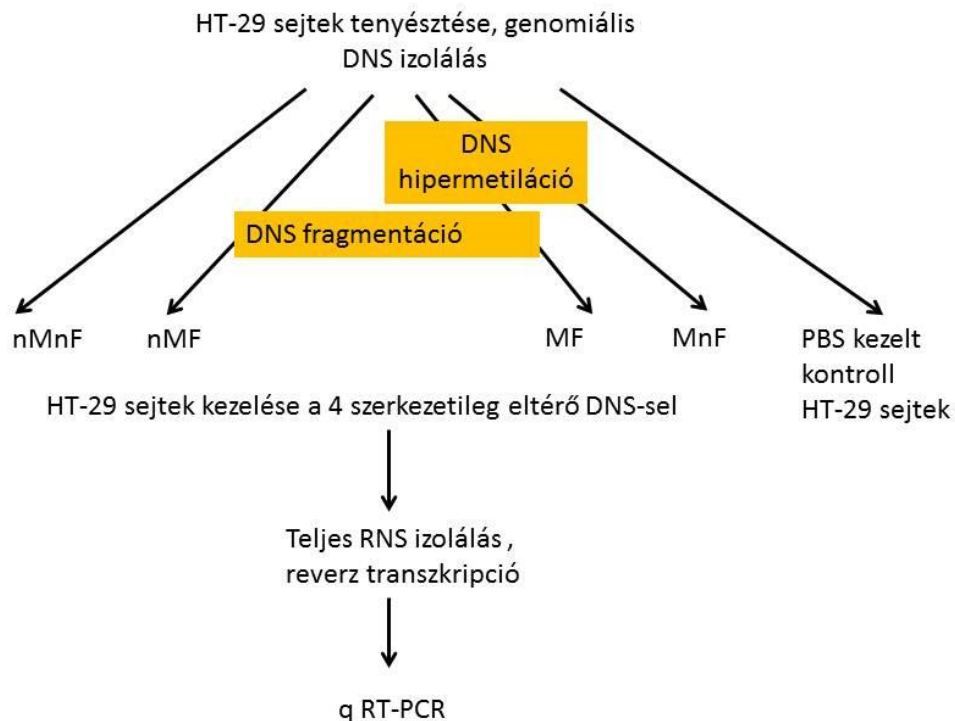
- (1) Az első típuson nem végeztünk sem mesterséges hipermetilációt, sem fragmentációt (1-es típusú DNS; nem-metilált, nem-fragmentált; nMnF).
- (2) A második típust ultrahanggal tördeltük a kívánt fragmentumhossz eléréséig, de mesterséges metilációt nem alkalmaztunk (2-es típusú DNS; nem –metilált, fragmentált; nMF)
- (3) A harmadik típust mesterségesen hipermetiláltuk, de nem fragmentáltuk (3-as típusú DNS; metilált, nem-fragmentált; MnF)
- (4) A negyedik részt mesterségesen hipermetiláltuk és fragmentáltuk (4-es típusú DNS; metilált, fragmentált; MF).

A HT-29 sejtvonalból kinyert DNS hipermetilációjához az M.SssI CpG metiltranszferáz (New England Biolabs Ipswich, USA) enzimet használtuk, amely metil donorként SAM-ot (S-adenozilmetionint) használva a DNS lánc minden metilálatlan citozin (C5) molekuláját hipermetilál a kettősszálú DNS 5'...CG...3' CpG dinukleotidjain.

A DNS fragmentumok hosszát 2%-os agaróz gélen elektroforézis módszerrel (5. ábra) határoztuk meg.



5. ábra: A DNS kezeléshez használt 10 000 bp feletti intakt genomiális DNS szakaszok (1. és 2. Minta nMnF és MnF DNS szekvenciák) és az ultrahangos tördeléssel elkészített ~200 bp hosszú DNS szakaszok (3. és 4. minta nMF, MF DNS szekvenciák) gélelektroforézis képe.



6. ábra: A HT-29 sejteken mesterségesen metilált /fragmentált DNS szakaszokkal elvégzett DNS kezelés folyamatábrája

4.5 DNS kezelés és teljes RNS izolálás

Kísérletünkhöz 0.5×10^6 HT-29 sejtet raktunk ki hatlyukú kezelő lemezre 2 ml RPMI 1640 tápfolyadékban 10% FBS (v/v) (FBS; Standard Quality; PAA Laboratories GmbH, Ausztria), 50 ng/ml gentamicin (Sandoz GmbH, Ausztria) és 2.50 µg/mL amfotericin B (Sigma Aldrich, USA) hozzáadásával.

Következő lépésként 15 µl-nyi szerkezetileg módosított, illetve egészséges és tumorszövetből izolált DNS-t alkalmaztunk a kezelésekhöz, amelyeket külön-külön 200 µl steril pufferolt foszfát sóoldatban (PBS) oldottunk fel. A szöveti DNS-t High Pure PCR Template Preparation kit (Roche GmbH, Németország) segítségével izoláltuk. A módosított

DNS szekvenciákkal elvégzett kezeléseket a 6. ábra szemlélteti. A kontroll mintákhoz 200 µl steril PBS-t adtunk, majd a sejteket 37 °C-on 5% CO₂ és 95%-os páratartalom mellett tenyésztettük. A 6 illetve 24 órás kezelést követően a sejteket kétszer steril PBS-ben mostuk át. A második mosást követően a sejteket 5 ml steril PBS-ben szuszpendáltuk, majd 2,5 ml sejtszuspenziót használtunk a teljes RNS frakcióizolálásához, a maradék 2,5 ml sejtszuspenzióból Cytospin (tárgylemezre való citocentrifugálás) citocentrifuga segítségével immuncitokémiai vizsgálatot végeztünk.

A HT-29 sejtekből történő teljes RNS izolálás RNeasy Mini Kittel (Qiagen, USA) történt a gyártó előírásai szerint.

4.6 Reverz transzkripció (RT) és valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

A TLR9 jelátviteli útvonal génjeire és az interleukin 8 (IL-8) citokint kódoló génre a Primer3 (<http://sourceforge.net/projects/primer3/>) primertervező programmal terveztünk primereket. A NanoDrop 1000 spektrofotométerrel történt mennyiségi meghatározás után kapilláris gélelektroforézis módszerrel minőségi ellenőrzést végeztünk az izolált RNS mintákon Agilent RNA 6000 Pico kit használatával (Agilent Technologies, USA). Az RNS integritási szám (RIN) egy a legintaktabb (10) mintától a legtöredezetebbig (1) felállított skála, amelyet az Agilent 2100 Bioanalyzer készülék programja a 18S és 28S riboszomális RNS csúcsok aránya alapján határoz meg. A továbbiakban csak a 8-nál nagyobb mutatójú RNS integritási számmal (RIN>8) rendelkező RNS mintákat használtuk a komplementer DNS-re (cDNS-re) történő átíráshoz és az RT-PCR vizsgálatához. A cDNS-re történő átírást 1 µg teljes RNS-ből kiindulva a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel (Applied Biosystems, USA) végeztük el a gyártó előírásai szerint.

A valós idejű PCR reakciót LightCycler 480 készüléken (Roche, Svájc), Probes Master (Roche GmbH, Németország) reagens és SYBR Green (Roche GmbH, Németország) zöld interkalálódó festék segítségével végeztük el.

A vizsgált gén expresszióját a GAPDH referencia gén expressziójához viszonyítottuk és az expressziós különbségeket a $2^{-\Delta\Delta C_t}$ képlet használatával számoltuk ki, amelyben a $\Delta\Delta C_t$ érték a vizsgált gén két mintacsoport közötti normalizált ciklusszám különbsége.

hTLR9_F	Toll-like receptor 9	CCTCCTGCTCAAGCTACACC
hTLR9_R	Toll-like receptor 9	CTTGTCCCTTTTCTGCCCTTG
hMYD88_aF	myeloid differenciáló faktor 88	GAAGAAAGAGTTCCCCAGCA
hMYD88_aR	myeloid differenciáló faktor 88	GTGCAGGGGTTGGTGTAGTC
hMYD88_bF	myeloid differenciáló faktor 88	CTCCTCCACATCCTCCCTTC
hMYD88_bR	myeloid differenciáló faktor 88	CGCACGTTCAAGAACAGAGA
hIRAK2_F	interleukin receptor asszociált kináz 2	CTTGGAGTGGGCTTTCTGAG
hIRAK2_R	interleukin receptor asszociált kináz 2	AGGCTGGAATTGTCAACGTC
hIRAK4_F	interleukin receptor asszociált kináz 4	GCTGCCTCAATGTTGGACTAA
hIRAK4_R	interleukin receptor asszociált kináz 4	TTCCATCCTTCTTGAGGATCA
hTRAF6_F	tumor nekrotizáló faktor asszociált faktor 6	CTTTGGCAAATGTCATCTGTG
hTRAF6_R	tumor nekrotizáló faktor asszociált faktor 6	CTGAATGTGCATGGAATTGG
hNFκB1_F	nukleáris faktor κB 1	TATGTGGGACCAGCAAAGGT

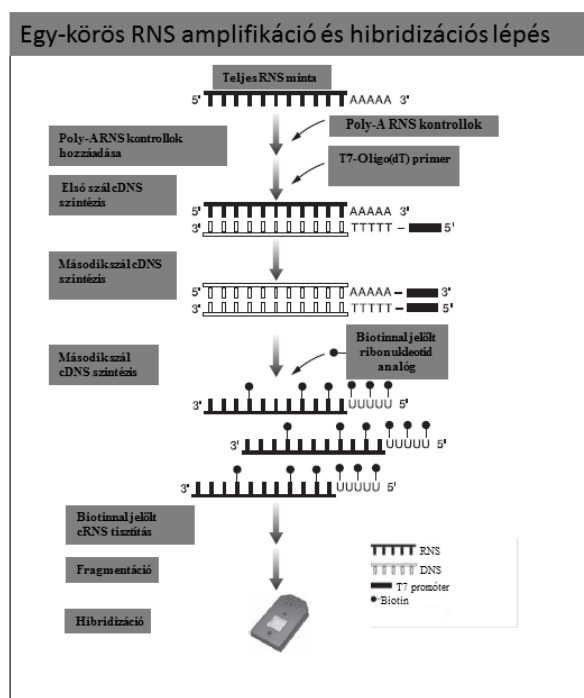
hNFκB1_R	nukleáris faktor κB 1	GCAGATCCCATCCTCACAGT
hIL8_F	interleukin 8	GTGCAGTTTTGCCAAGGAGT
hIL8_R	interleukin 8	AAATTTGGGGTGGAAAGGTT
hIL1B_F	interleukin 1β	GCATCCAGCTACGAATCTCC
hIL1B_R	interleukin 1β	GCATCTTCCTCAGCTTGTC
IRF7_F	interferon termelést reguláló faktor 7B	GGGTGTGTCTTCCCTGGATA
IRF7_R	interferon termelést reguláló faktor 7B	GCTCCATAAGGAAGCACTCG
hTNFa_F	tumor necrosis faktor α	CCTGTGAGGAGGACGAACAT
hTNFa_R	tumor necrosis faktor α	GGTTGAGGGTGTCTGAAGGA

1. táblázat: A TLR9 jelátviteli útvonalban szereplő génekre tervezett primerek szekvenciájának a listája

4.7 mRNS expressziós microarray vizsgálatok

Az izolált RNS mennyiségét NanoDrop 1000 spektrofotométerrel határoztuk meg, majd minőségi ellenőrzést végeztünk kapilláris gélelektroforézis technológiával Agilent RNA 6000 Pico kit segítségével. A biotinnal jelölt cRNS próbákat $5 \pm 0,50$ µg teljes RNS frakcióból készítettük el egyciklusú jelölő rendszerrel (GeneChip 3' IVT Express Kit, Affymetrix, USA) az Affymetrix cég hivatalos ajánlása alapján. Következő lépésként a cRNS mintákat fragmentáltuk és minden mintából 10 µg mennyiséget 16 órán keresztül, 45 °C hőmérsékleten hibridizáltuk a HGU133 Plus2.0 array chipekre (Affymetrix, USA). A

vizsgált chipen fluoreszcens festékekkel történő jelölés és mosás következett a Fluidics Station 450 állomáson (Affymetrix Inc., USA). A fluoreszcens jelek detektálására microarray technológia szkennelésére alkalmas GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix, USA) rendszert alkalmaztunk. Az alkalmazott egykörös RNS amplifikációt és a vizsgálati chipre történő hibridizációs lépéseket a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra: Egykörös RNS amplifikáció és a vizsgálati chipre történő hibridizáció

A kép forrása:

http://media.affymetrix.com/support/downloads/manuals/3_ivt_express_kit_manual.pdf

A microarray adatok mennyiségi és minőségi ellenőrzését a Tumor Analízis Munkacsoport ajánlásai alapján végeztük el (72). A szkennelt vizsgálati chipet kötődési műtermékek kiszűrése érdekében átvizsgáltuk, továbbá megvizsgáltuk a használandó RNS töredezettség

mentességét (intaktságát), amelyek minden elvárásnak megfeleltek (73). A HT-29 sejtvonalon és a PBMC sejtek esetében is 2-2 biológia párhuzamos mérést vetettünk össze Euclidean távolságanalízissel. Valamennyi sejt kultúrából kinyert mintából készült microarray megfelelt a minőségi követelményeknek. A fenti ajánlásokat követve gcRMA (Background Adjustment Using Sequence Information) háttérnormalizációs módszert alkalmaztunk a vizsgálati chipen.

A gcRMA szoftverrel elvégzett normalizáció és elemzés után PAM finom küszöbérték megállapítást (soft thresholding) alkalmaztunk azzal a céllal, hogy a két csoport közötti összehasonlítás (egészséges szöveti DNS kezelt vs. kontroll és tumor szöveti DNS kezelt vs. kontroll) az erősen elkülönülő génexpressziót mutató géneket tartalmazza ($p \leq 0.05$, $\log FC \geq 1$).

Az eredmények annotációja (a kapott gének azonosító alapján történő nevesítése) az Affymetrix NetAffx analízis központjával történt (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>). Az adathalmazok további elemzése, illetve ellenőrzés céljából megtalálhatók a Gene Expression Omnibus adatbankban (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) a GSE67557 hivatkozási szám alatt.

4.8 Immuncitokémiai vizsgálatok

A HT-29 sejtvonalon történt kezelés után 2,5 ml HT-29 sejtszuszpenziót használtunk fel az immuncitokémiai (ICC) vizsgálatokhoz. A HT-29 sejteket (mikroszkóp) tárgylemezre citocentrifugáltuk, majd 10 percig $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os metanolban rögzítettük. A nem specifikus kötőhelyek blokkolására 30 percen keresztül 1%-os BSA (marha szérum albumin, Bovine Serum Albumin) oldatot használtunk.

Az immunfestésekhez egér monoklonális anti-TLR9 IgG (1:300 hígítás; ab85860, ABCAM, Cambridge, MA, USA), anti-DNMT3a IgG (1: 300 hígítás; ab13888, ABCAM, Cambridge, MA, USA) anti-citokeratin 20 IgG (1: 200 hígítás, klón: PCK-26, Dako, Glostrup, Dánia) és anti-E-cadherin IgG (1:2 hígítás, klón: ECH6, Hisztopatológia Kft., Pécs, Magyarország) ellenanyagokat használtunk.

A jelkonverzióra EnVision + HRP (Labeled Polymer anti- egér,/ nyúl K5007, Dako) és diaminobenzidin - hidrogén-peroxidáz - kromogén - szubsztrát rendszert (Cytomation Liquid DAB + Substrate Chromogen System, K3468, Dako) alkalmaztuk, végül hematoxilin-eozin festést végeztünk (MMI H&E Staining Kit Plus, MMI AG, Svájc). A tárgylemezeket digitálisan archiváltuk (Pannoramic Scan készülék, szoftver verzió: 1.11.25.0, 3DHISTECH, Budapest, Magyarország), a kiértékeléshez Pannoramic Viewer szoftvert (v:1,11,43,0, 3DHISTECH Kft., Budapest, Magyarország) használtunk.

4.9 Az immuncitokémiai vizsgálatok kiértékelése

Az immunhisztokémiai elemzést a Panoramic Viewer digitális mikroszkóp Histoquant modulja segítségével végeztük el tárgylemezenként 1000 sejten. A CK20 citoplazmatikus és az E-cadherin membránban megjelenő immunreakcióit a festődés erőssége szerint negatív (-), gyenge (+), közepesen erős (++) és erős (+++) csoportbasoroltuk. A DNMT3a nukleáris/citoplazmatikus kifejeződéseit a festődés erőssége alapján negatív (-), gyenge (+), mérsékelt (++) és erős (+++) kategóriákba soroltuk. Százalékos pixelpozitivitás értéket adtunk meg a negatív (-), gyenge (+), mérsékelt (++) és erősen pozitív (+++) pixelek arányaira mintánként.

4.10 HT-29 sejteken végzett viabilitási vizsgálatok

Kísérletünkhöz $0,1 \times 10^6$ HT-29 sejtet helyeztünk hatlyukú kezelő lemezre 2 ml RPMI 1640 tápfolyadékban (Sigma Aldrich, USA) 10% FBS (v/v) (FBS; StandardQuality; PAA Laboratories GmbH, Ausztria), 50 mg/ml gentamicin (Sandoz GmbH, Ausztria), és 2.5 µg/ml amfotericin B (Sigma Aldrich, USA) hozzáadásával.

A kezelésekhez 15 µg egészséges illetve tumoros vastagbél műtéti mintákból izolált DNS-t használtunk, amelyeket külön-külön 200 µl steril PBS-ben oldottunk fel. A kontroll mintákhoz 200 µl steril PBS-t adtunk hozzá. A sejteket 37 °C -on, 5% CO₂ és 95%-os páratartalom mellett tenyésztettük. A 72 órás kezelés után a sejteket 0,25%-os Tripszin-EDTA (Sigma Aldrich, USA) oldat segítségével választottuk el a kezelő plate felületétől, kétszer mostuk 1 ml steril PBS-ben és 1 ml -20 °C-os 70%-os etanolban 15 percen keresztül szobahőmérsékleten fixáltuk. A mintákat vizsgálat időpontjáig -20 °C-os

hőmérsékleten tároltuk. Méréseinket három független párhuzamos sejtkultúra mintán végeztük el.

A HT-29 sejteket 3 percig 1300 fordulatszámon alkoholmentesítettük, majd a sejteket 300 µl extrakciós lízispufferben szuszpendáltuk fel. A sejtsuszpenziókhoz 3 µl RNáz oldatot (RNáz A/T1 Mix, Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Litvánia) adtunk hozzá az RNS-propídium jodid műtermék keletkezésének elkerülése miatt. A sejtsuszpenzióhoz továbbá 3 µl propídium jodidot (Sigma-Aldrich, USA) adtunk és 15 perc szobahőmérsékleten történt inkubáció után a sejt-viabilitási mérést FaCsCalibur (New Jersey, USA) műszeren végeztük el.

Ezenfelül a HT-29 sejteken 72 órás viabilitási vizsgálatot végeztünk tripánkék festéssel, majd az élő illetve elpusztult sejteket hemocitóméterben számoltuk meg a tumor és egészséges szöveti DNS-sel kezelt mintákban, amelyeket a PBS kezelt kontroll HT-29 minták sejtszámaihoz hasonlítottunk. Az élő és elpusztult sejtek számának átlagát három független számolással három biológiai párhuzamos mintán határoztuk meg. Statisztikai elemzéseink során eredményeinket a Student-féle kétmintás t-próbával értékeltük ki.

4.11 Kvantitatív 5-metilcitozin arány meghatározás HT-29, SW480 és Caco2 vastagbél karcinóma sejtkultúrák genomiális DNS-éből és a kezeléshez használt egészséges illetve vastagbélkarcinómás szöveti párokból

A genomiális DNS-t High Pure PCR Template Preparation kit (Roche GmbH, Németország) segítségével izoláltuk HT-29, SW480, Caco2 vastagbél karcinóma sejtkultúrákból és a műtétilag eltávolított egészséges és tumoros vastagbél-szövetből. Az izolált DNS-ekből 100 ng mennyiségű DNS-t használtunk a teljes genom 5-metil-citozin (5-mC) arányának a meghatározására.

Vizsgálatainkhoz 5-mC DNS ELISA kit-et használtunk (Zymo Research Corp., USA) a gyártó előírásainak megfelelően, amely tartalmazott anti-5-metil-citozin monoklonális ellenanyagot, 5-mC fedő puffert (5-mC Coating Buffer), 5-mC ELISA puffert, másodlagos ellenanyagot és torna peroxidázt (HRP).

A 100 ng-nyi DNS mintákat 5-mC fedő pufferrel (5-mC Coating Buffer) egészítettük ki 100 µl végtérfogatra, majd 98 °C-on 5 percen keresztül denaturáltuk. A denaturáció után a mintákat 10 percig szárazjégre helyeztük és a vizsgáló lemez lyukaiba áthelyezve 37 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd háromszor tisztítottuk 5-mC ELISA pufferrel. Következő lépésként az antitest keveréket adtuk hozzá, amely anti-5-mC elsődleges (1:2000) és másodlagos antitestet (1:1000) tartalmazott 100 µl térfogatban. A lemezt fóliával fedtük le és 37 °C-on 1 órán keresztül inkubáltuk. Az ellenanyag keverék eltávolítása után a kezelőlyukakat háromszor 5-mC ELISA pufferrel tisztítottuk és 100µl HRP fejlesztő oldatot adtunk az egyes mintákhoz és szobahőmérsékleten 1 órán át inkubáltuk. Az abszorbanciát ELISA lemezolvasón (Labsystems MultiScan MS, Thermo Labsystems, Milford, USA) 450 nm-en mértük le. Az 5-mC százalékos értékét másodrendű regressziós egyenlet segítségével számoltuk ki a pozitív és negatív kontrollokból felállított standard görbéből.

4.12 Az egészséges donoroktól származó perifériás vér mononukleáris sejteinek elvégzett vizsgálatok

4.12.1 Egészséges önkéntesek

Négy egészséges donorból származó PBMC mintát vizsgáltunk, a donorok kórelőzményében nem szerepelt daganatos és autoimmun betegség. A vizsgálat idején nem mutattak aktív fertőzés tüneteit. Az önkéntesek között 2 nő és 2 férfi szerepelt 25 és 40 év közötti életkorral. A negatív kórelőzmény diagnózisát az SE. II sz. Belgyógyászati Klinika belgyógyász szakorvosai állították fel.

4.12.2 PBMC sejtek szeparációja

Az egészséges önkéntesektől 20 ml perifériás vért vettünk, amelyből a mononukleáris sejteket gradiens centrifugálással Ficoll-Histopaque-1077 kit használatával (Sigma Aldrich, Németország) nyertük ki. A perifériás vért a Ficoll-Histopaque-1077 gradiens fölé rétegeztük és 1600 percenkénti fordulatszámon 20 percig centrifugáltuk. A interfázisban kapott "buffy coat" -ot összegyűjtöttük, ez követően 5 ml Hank-féle médiumban (Biomed, Lengyelország) diszpergáltuk, és 1600 percenkénti fordulatszámon 10 percig

centrifugáltuk. A felülúszót összegyűjtöttük, a kinyert PBMC-ket 1100 percenkénti fordulatszámra 5 perc centrifugálással kétszer mostuk át steril PBS-ben.

4.12.3 DNS kezelés, LPS kezelés, teljes RNS izoláció és a humán T- és B-sejt-aktivációs PCR Array vizsgálati módszer

1×10^6 PBMC-t helyeztünk ki hatlyukú kezelő lemezre RPMI 1640 tápfolyadékban gentamicin-nel, amfotericin B-vel és 10% FBS-sel kiegészítve. A DNS kezeléshez 15 μ g egészséges illetve tumor szöveti DNS-t 200 μ l steril foszfát-pufferolt sóoldatban (PBS), a DNS-LPS együttes kezeléshez 100 ng LPS-t (O26:B6 szerotípusú Escherichia coli-ból származó lipopoliszacharid, Sigma Aldrich, USA) alkalmaztunk. A nem kezelt kontroll mintákhoz 200 μ l steril PBS-t adtunk. A sejteket 37°C hőmérsékleten, 5% CO₂ és 95% páratartalom mellett tenyésztettük. A teljes RNS izolálást a gyártó előírásai alapján RNeasy Mini Kit-tel (Qiagen, USA) végeztük el. Az izolált RNS-t -80° C-on tároltuk a vizsgálatok elvégzéséig.

A cDNS-t a RT² Nano pre-amplifikációs cDNS átíró kit (Qiagen, USA) segítségével készítettük az izolált teljes RNS mintákból. A cDNS szintézishez 100 ng teljes RNS-t használtunk, majd a célgének expressziós különbségeinek vizsgálatára a humán T- és B-sejt-aktivációs RT² Profiler PCR Array (Qiagen, USA) génexpressziós panelt használtuk. A vizsgált gének listája megtalálható a Qiagen cég honlapján (<https://www.qiagen.com/hu/shop/assay-technologies/real-time-pcr-and-rt-pcr-reagents/rt2-profiler-pcr-arrays?catno=parn-053z#geneglobe>). A génexpressziós vizsgálatokat LightCycler 480® műszeren végeztük (Roche, Svájc). Ez a panel 84 gén kifejeződésének vizsgálatát teszi lehetővé, amelyek között szerepelnek T- és B-sejtek proliferációját és differenciálódását befolyásoló gének, valamint Th1 és Th2 differenciációt és a T-sejt-polarizációt szabályozó gének. A génexpressziós panel ezenkívül makrofágok, neutrofil sejtek és NK-sejtek (natural killer sejtek) aktivációs markereit is tartalmazza. A relatív dCt értéket (delta Ct) minden egyes génnél a GAPDH referencia génhez történt normalizáció után számítottuk ki, majd ezeket az értékeket a kontroll minták dCt értékeivel vetettük össze, ami megadta a kezelt és a kontroll minták közti expresszió különbséget (ddCt).

5 EREDMÉNYEK

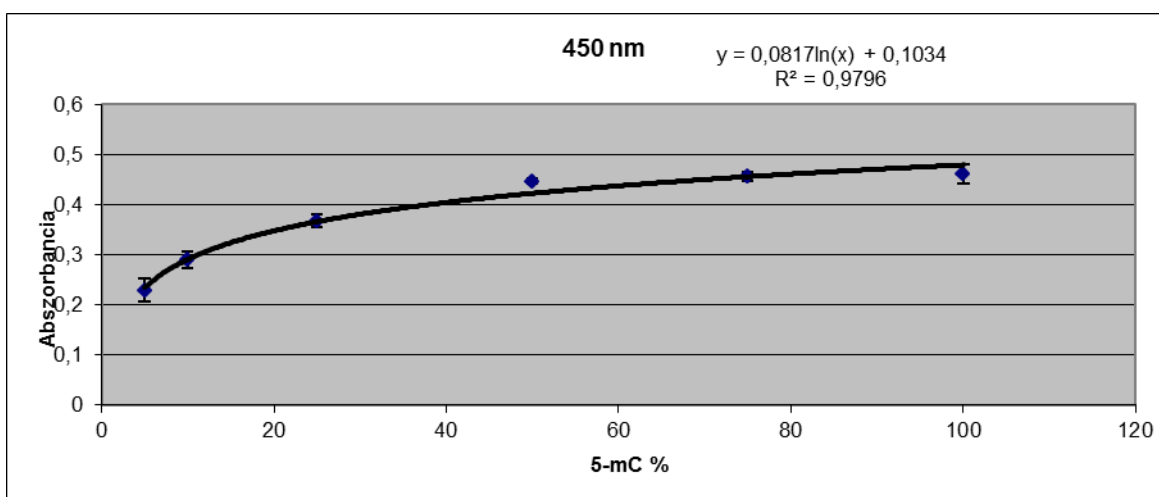
5.1 5-metilcitozin meghatározás vastagbél karcinóma sejtvonalak genomiális DNS szekvenciáiból és a kezeléshez használt egészséges, vastagbélkarcinómás szöveti párokból

A teljes genom 5-metilcitozin arányának meghatározás során a HT-29, SW480 és Caco 2 vastagbél karcinóma sejtvonalakból izolált genomiális DNS szekvenciák és a DNS kezelésekre használt egészséges és vastagbél karcinóma szöveti DNS szekvenciák teljes genom metilációs arányát határoztuk meg.

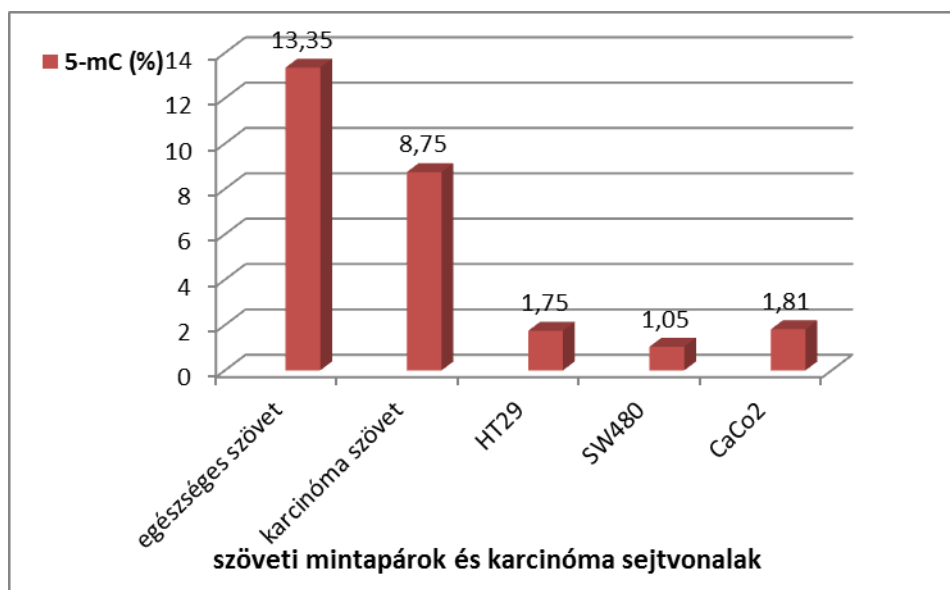
A minták 5-mC százalékos értékeit ELISA lemezolvasón a pozitív és negatív kontroll minták értékeiből 450 nm-en mért abszorbanciából felállított standard görbéből (8. ábra) a következő másodrendű regressziós egyenlet segítségével számoltuk ki:

$$\ln(x) = \frac{y - 0,1034}{0,0817} \text{ (9. ábra).}$$

Az x tengely a metiláció százalékos arányát, míg az y tengely értékei a mért abszorbanciát szemléltetik.



8 ábra: Az ELISA lemezolvasón 450 nm-en mért pozitív és negatív kontroll minták értékeiből mért abszorbanciákból felállított standard görbe



9. ábra: Az DNS kezelésekhez használt, műtétiileg eltávolított egészséges, vastagbél karcinóma szöveti DNS szekvenciák és vastagbél karcinóma sejtvonalak genomialis DNS-ének teljes genom 5-metilcitozin arányai

5.2 A HT-29 sejtvonalból izolált (hipometilált) és módosított (hipermetilált, fragmentált) DNS szekvenciák hatása a TLR9 jelátviteli útvonal génjeire HT-29 adenokarcinóma sejtekben

A négy (nem- metilált nem fragmentált; nem-metilált fragmentált; metilált nem fragmentált; metilált fragmentált) szerkezetileg eltérő DNS szekvencia a TLR9 jelátviteli útvonal különböző elemeinek a génjeiben eredményezte a génexpresszió növekedését vagy csökkenését.

A nem metilált, nem fragmentált (nMnF) DNS-sel való kezelés a TLR9 gén szignifikáns felülexpresszióját eredményezte ($p = 0,0298$) ellentétben a MYD88A ($p = 0,006$) és TRAF6 ($p = 0,0042$) génekkel, melyekben a kezelés csökkent génexpressziót okozott.

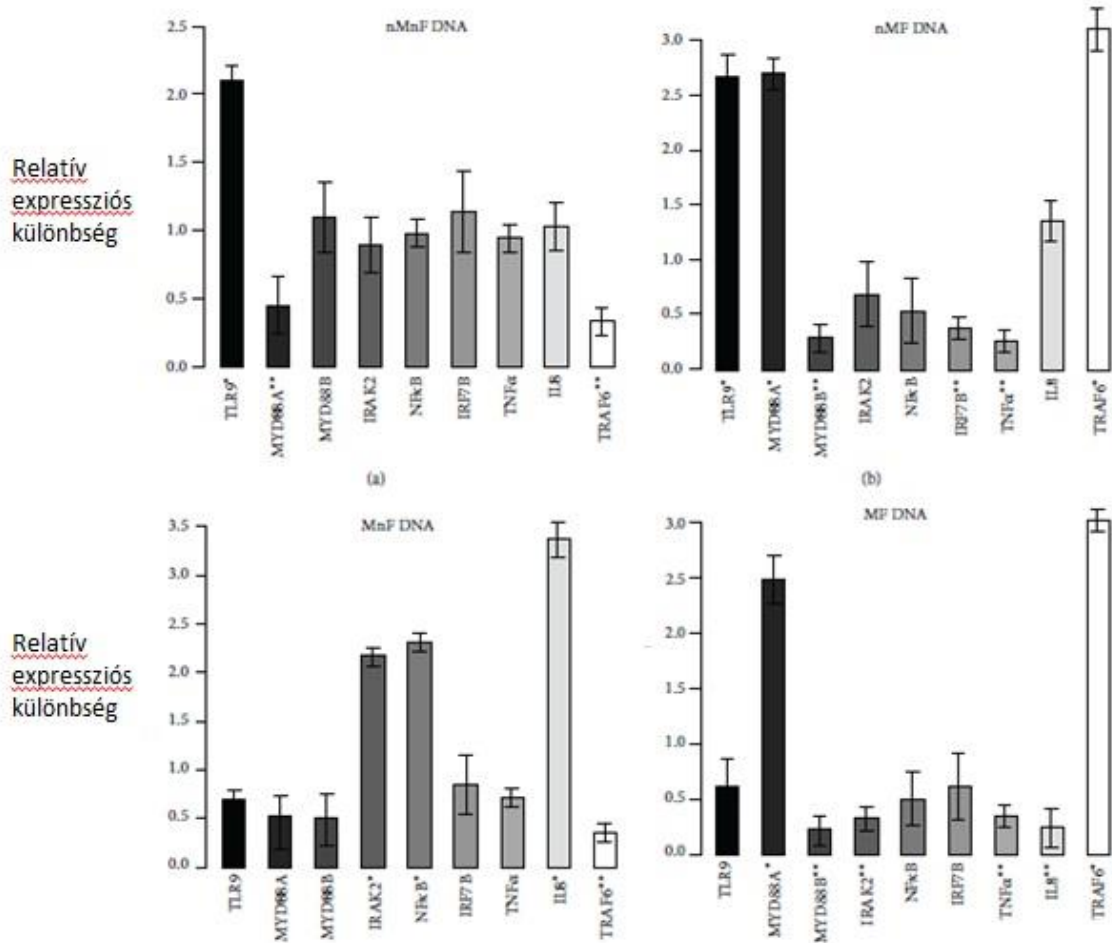
A nem metilált, fragmentált (nMF) DNS szekvenciákkal történt kezelés a TLR9 ($p = 0,0072$), MYD88A ($p = 0,0304$) és TRAF6 ($p = 0,0016$) gének növekvő expresszióját eredményezte, míg a MYD88B ($p = 0,012$) és az IRF7 ($p = 0,002$) génben csökkenő génexpressziós változás mutatkozott.

A metilált, nem-fragmentált (MnF) DNS szekvenciákkal történt kezelés az IRAK2 ($p = 0,024$), NFkB ($p = 0,001$), és az IL-8 ($p = 0,0002$) gének overexpresszióját és a TRAF6 gén csökkenő expresszióját eredményezte. ($p = 0,004$)

A metilált fragmentált (MF) DNS szekvenciákkal történt kezelés a MYD88A ($p = 0,0033$), TRAF6 ($p = 0,006$) gének felülexpresszióját eredményezte, illetve a MYD88B ($p = 0,0023$), IRAK2 ($p = 0,004$), TNFSF10 ($p = 0,0034$) és az IL-8 ($p = 0,0031$) gének csökkent expresszióját váltotta ki.

Figyelemre méltó, hogy csak a hipermetilált DNS-szekvenciákkal történt kezelés eredményezett szignifikáns génexpressziós változást az IL-8 génben, amit a hámsejtek neutrophil kemoattraktánsként termelnek.

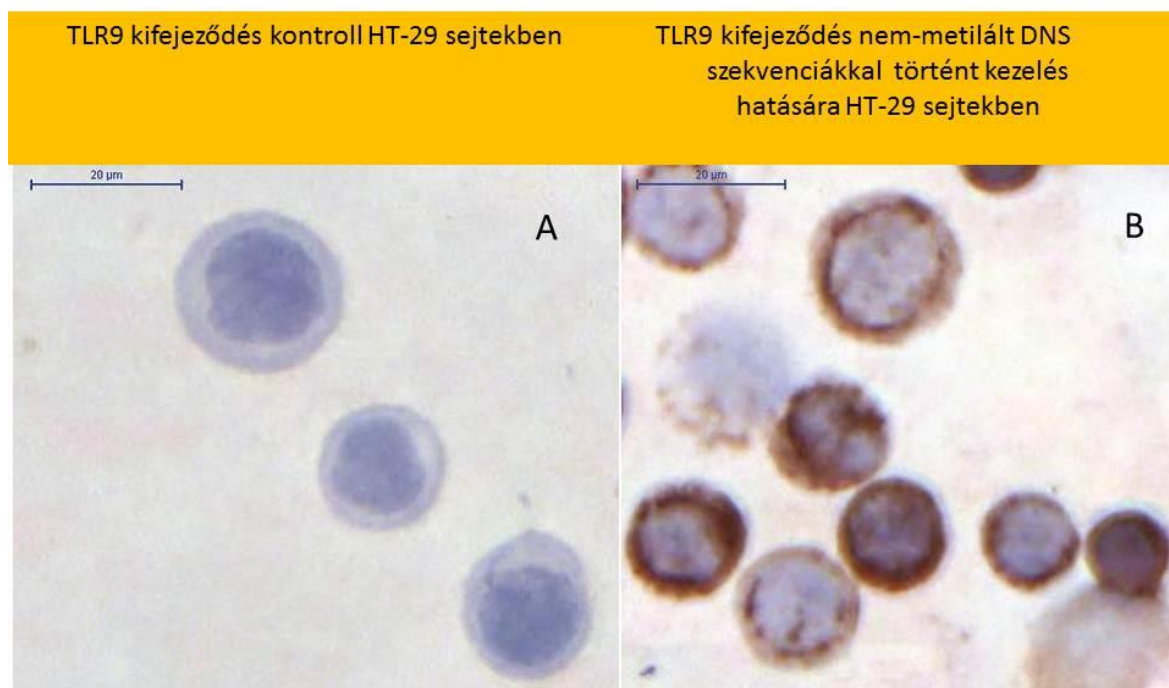
A saját, illetve a módosított DNS szekvenciával (nMnF, nMF, MnF, MF) történt DNS kezelés hatását a TLR9 jelátviteli útvonal génjeire a 10. ábrán foglaltuk össze.



10.ábra: A négy szerkezetileg eltérő (nMnF , nMF, MnF, MF)DNS szekvencia hatása a TLR9 jelátviteli útvonal génjeire

5.3. A HT-29 vastagbélkarcinóma sejtvonalból izolált saját és módosított DNS szekvenciák hatása a CK és a DNMT3a fehérjék expressziójára

A nem metilált (nMnF, nMF) DNS szekvenciákkal való kezelés fokozta a TLR9 fehérje expresszióját (nMnF:48,74 % $\pm$ 6,7%) illetve (nMF:39,24 % $\pm$ 4,86 %) a PBS-sel kezelt kontroll mintákhoz képest (8,96 % $\pm$ 2,48 %) ($p < 0,001$), amely megerősíti az RNS expressziós eredményeinket. A kontroll mintákban (11A), illetve a nem metilált DNS kezelést hatására emelkedett TLR9 kifejeződést (11B) a 11. ábra szemlélteti.



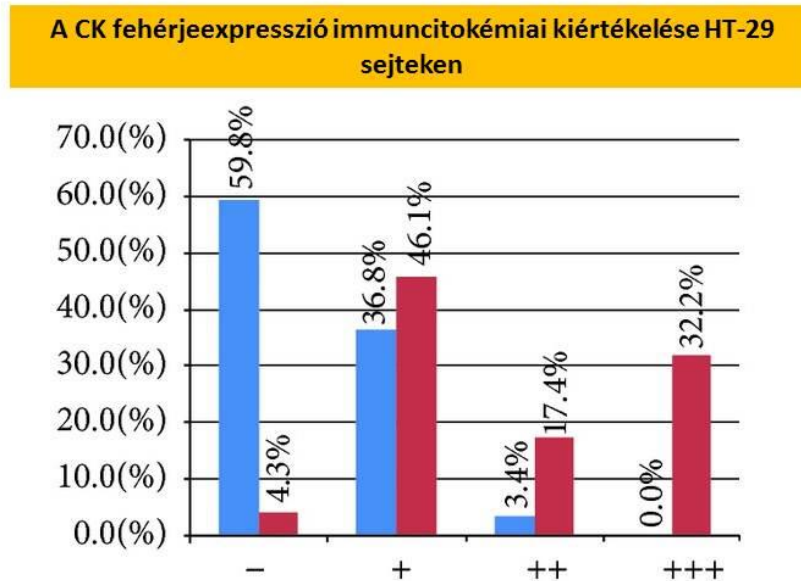
11. ábra: Szignifikánsabb erősebb TLR9 immunpozitivitás a nem-metilált (nMnF, nMF) DNS szekvenciákkal történt kezelés hatására (11B ábra) a PBS kezelt kontroll mintához hasonlítva (11A ábra). Digitális mikroszkópos felvétel, 200x nagyítás, 20 µm –es skála.

A 3-as típusú hipermtílt, nem fragmentált (MnF) DNS-sel való kezelés szignifikánsan ($p < 0,0001$) fokozta a CK és DNMT3a fehérjék expresszióját (12B és 14B ábra) a PBS kezelt kontroll mintákban mutatkozott expresszióhoz viszonyítva (12A, 14A ábra). A nMnF, nMF, MF DNS-sel való kezelés hatására a HT-29 sejtekben nem tapasztaltunk erősebb CK és DNMT3a pozitivitást.

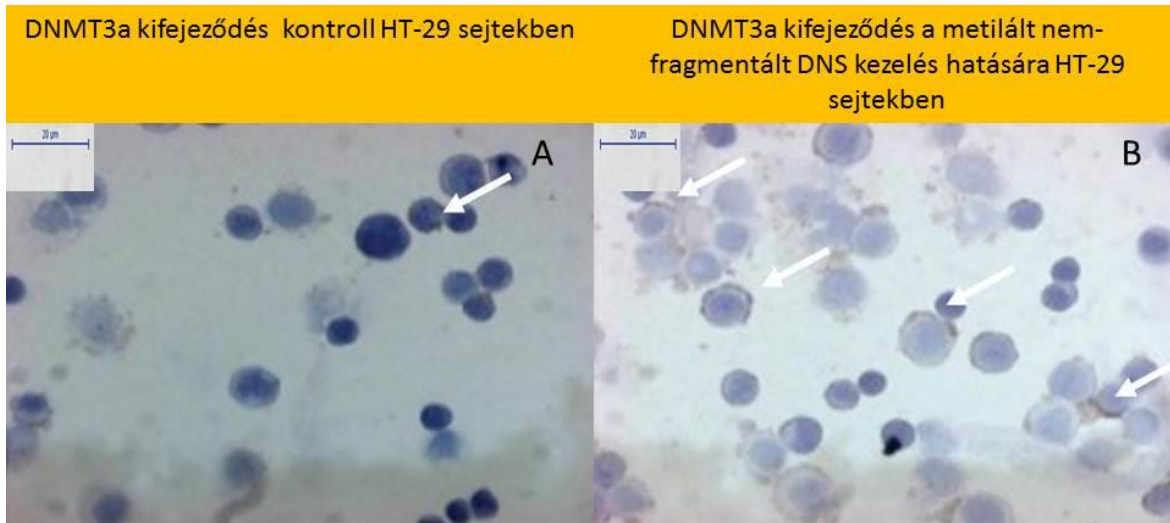
A DNMT1 és DNMT3B fehérjék expressziójában a saját és a módosított DNS szekvenciákkal való kezelés után sem tapasztaltunk kifejeződésbeli változást.



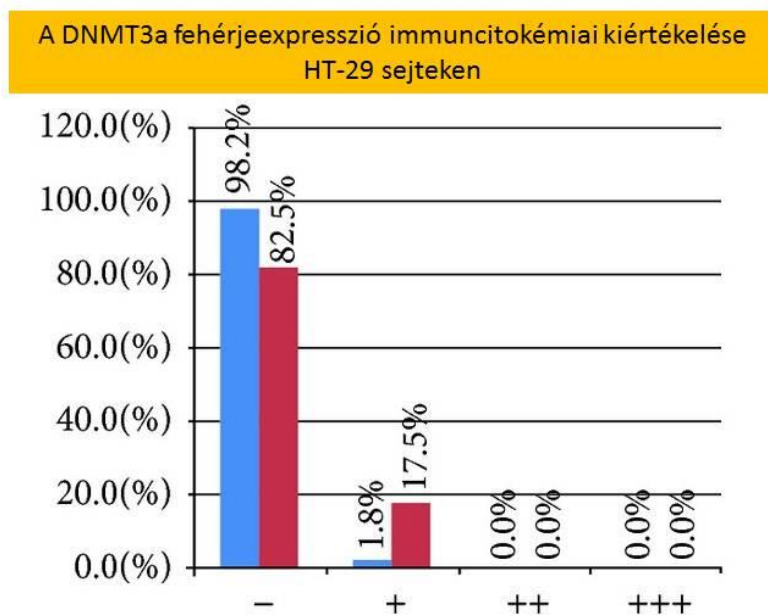
12. ábra: Erős citoplazmatikus CK festődést mutató HT-29 sejtek az MnF DNS szekvenciákkal való kezelés hatására (12B ábra) a PBS kezelt kontroll sejtekhez viszonyítva (12A ábra). Digitális mikroszkópos felvétel, 100x nagyítás, 20 µm skála. A fehér nyilakkal az MnF DNS szekvenciákkal való kezelés hatására a citoplazmában megjelenő szignifikánsan erősebb CK expressziót mutató sejteket szemléltetjük.



13. ábra: A CK fehérjeexpresszió immuncitokémiai kiértékelése a PBS kezelt kontroll HT-29 sejtekben (kék oszlop) és a metilált DNS szekvenciákkal történő kezelés hatására (piros oszlop). Százalékos pozitivitás értékekkel szemléltetjük a negatív (-), gyenge (+), mérsékelt (++) és erősen pozitív (+++) immunreakciókat.



14. ábra: Gyenge citoplazmatikus DNMT3a festődés a PBS kezelt kontroll HT-29 sejtekben (14A ábra) és fokozott DNMT3a kifejeződés (14B ábra) az MnF HT-29 DNS kezelés hatására. Digitális mikroszkópos felvétel, 100x nagyítás, 20 µm skála. A fehér nyilakkal az MnF DNS szekvenciákkal való kezelés hatására a citoplazmában megjelenő szignifikánsan erősebb DNMT3a expressziót mutató sejteket szemléltetjük.



15. ábra: A DNMT3a fehérjeexpresszió immuncitokémiai kiértékelése a PBS-sel kezelt kontroll HT-29 sejteken (kék oszlop) és metilált DNS szekvenciákkal történő DNS kezelés hatására (piros oszlop). Százalékos pozitivitás értékekkel szemléltetjük a negatív (-), gyenge (+), mérsékelt (++) és erősen pozitív (+++) immunreakciókat.

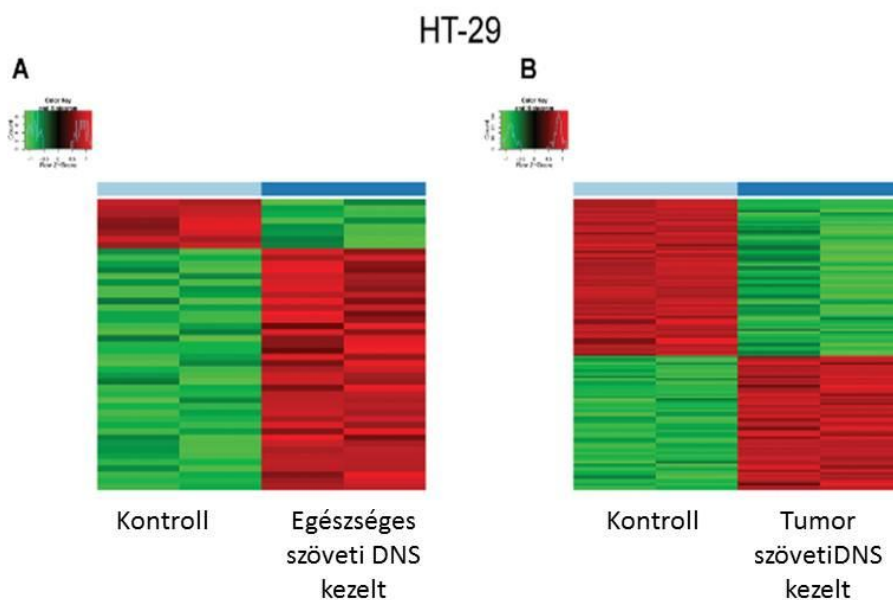
5.4 Az egészséges és tumor szöveti DNS hatása HT-29 vastagbél karcinóma sejtekre

Az egészséges és tumor szöveti DNS kezelés hatására a metalotinén gének (MT1H, MT1G, MT1X, MT1P2 és MT2A) fokozott expresszióját észleltük. A tumor szöveti DNS-kezelés 118 gén fokozott kifejeződését eredményezte (16B ábra). Ezek közül a gének közül kiemelendők az áttétképzéshez köthető gének, többek között a metasztázis-asszociált molekula 1(MACC1), a vastagbeldaganatokban tüdő adenokarcinóma-asszociált metasztázis transzkriptum 1 (MALAT1), sejtadhéziót szabályozó gének mint a karcinoembrionális antigén kapcsolt sejtadhéziós molekula 5 (CEACAM5), továbbá metabolikus gének, mint az inzulin indukálta gén 1 (INSIG1), endoteliális lipáz (LIPG) és hírvivő molekulák génjei mint a duál adaptor foszfortirozin és 3-foszfoinozitidek (DAPP1) és a cAMP hírvivő elem 3-szerű protein 2 (CREB3L2) is.

2. táblázat: A tumor szöveti DNS kezelés hatására felülexpresszált gének, amelyek bizonyítottan szerepet játszanak a kolorektális daganatsejtek invazivitásában, anyagcseréjében és jelátvitelében.

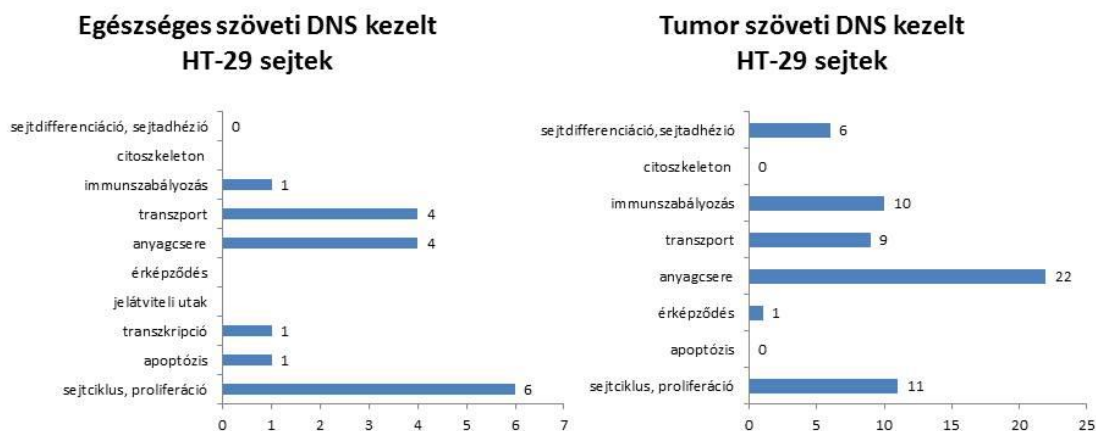
Tumorképzésben játszott szerep	Gén szimbólum	Referencia
áttétképződésben szerepet játszó gének	TACSTD2, MACC1, MALAT1,	(74),(75), (76)
tumor biomarker	CEACAM5	(77)
metabolikus gének	INSIG1, LIPG	(78,79)
hírvivő molekulákat kódoló gének	DAPP, CREB3L2	(80)

Az egészséges illetve tumoros DNS kezelés hatására megváltozott kifejeződést mutató géneket ($\text{Log FC} \geq 1$, $p \leq 0.05$) a 16. ábrán hő térképen ábrázoltuk és függelék 1. és 2. sz. táblázatában kerültek ismertetésre.



16. ábra: Az Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarray vizsgálati rendszerrel vizsgált egészséges (A) és tumor szöveti DNS (B) hatása a génexpresszióra HT-29 sejtekben.

Az egészséges illetve tumoros DNS kezelés hatására megváltozott kifejeződést mutató ismert sejtfunkciójú géneket a 17. ábrán ábrázoltuk. A sejtfunkció szerinti osztályozást a Affymetrix NetAffx analízis központjának segítségével végeztük el.



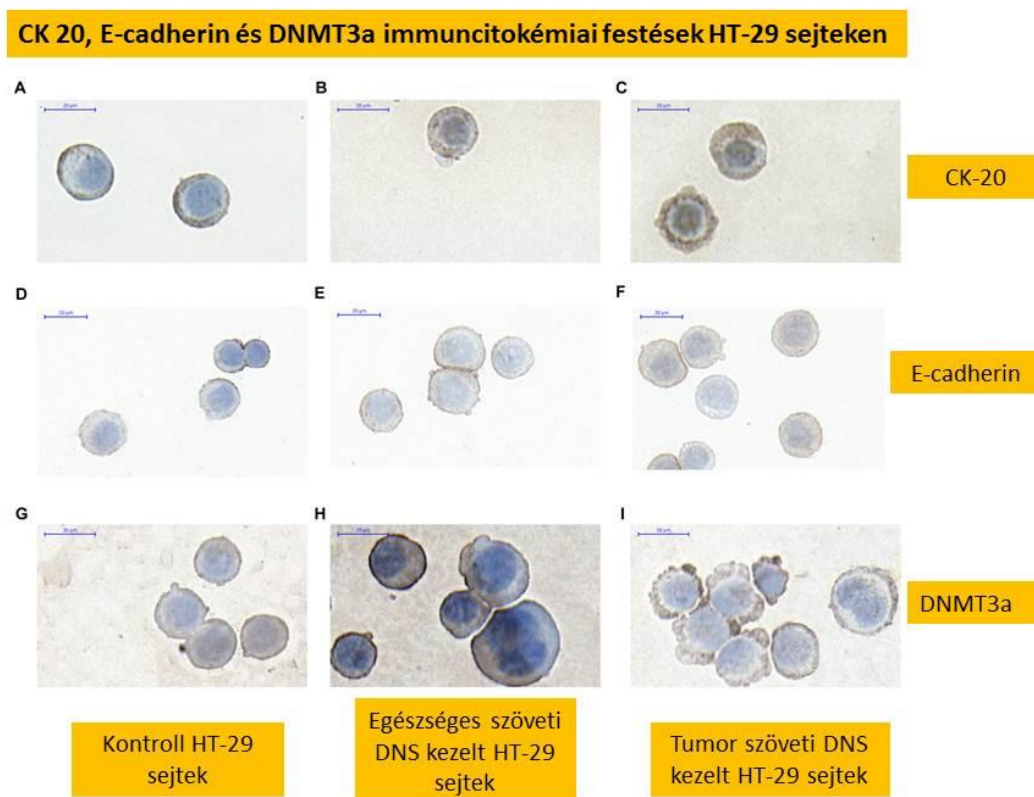
17. ábra: Az Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarray vizsgálati rendszerrel vizsgált egészséges és tumor szöveti DNS hatására változott gének sejtfunkció szerinti osztályozása

5.5 A TLR9 útvonal fő elemeinek vizsgálata qRT-PCR-rel, és az útvonal annotált génjeinek azonosítása Affymetrix microarray rendszeren

A tumor és az egészséges szöveti DNS kezelés a HT-29 sejtekben a TLR9 / MYD88 függő jelátviteli útvonal egyetlen elemének, az interleukin 1 β (IL-1 β) génnek a fokozott kifejeződését eredményezte ($\log F_c \geq 1$; $p \leq 0.05$). Ez a pro-inflammatorikus citokint kódoló gén az egyik fontos eleme a TLR9 / MYD88 függő jelátvitelnek.

5.6 CK20, E-cadherin, DNMT3a vizsgálata immuncitokémiával

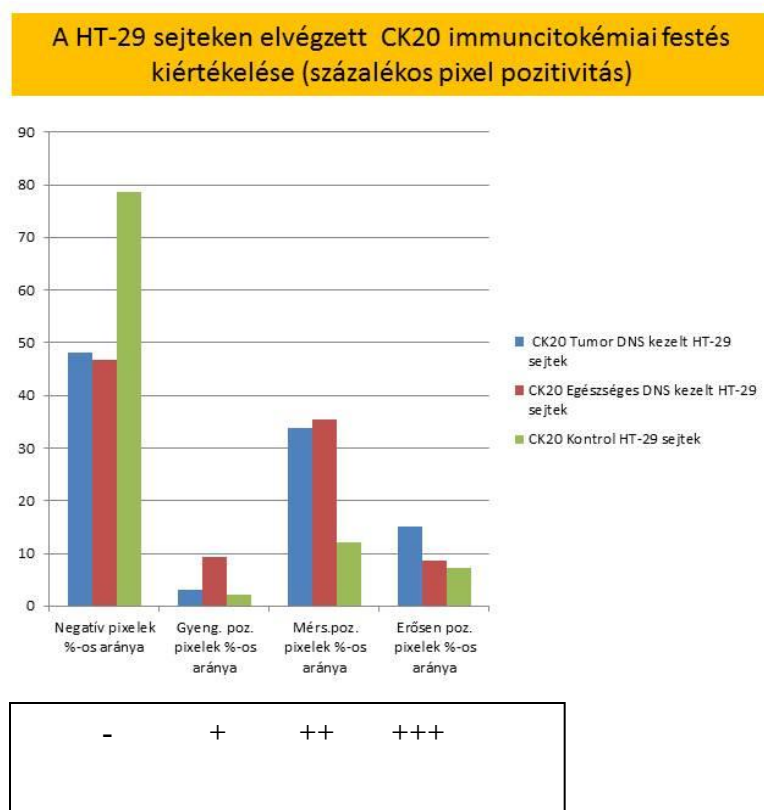
Hámdifferenciációs, sejtkapcsoló és DNS metiltranszferáz fehérjék vizsgálatát végeztük el immuncitokémia módszerrel HT-29 vastagbél karcinóma sejt kultúrában az egészséges illetve tumor szöveti DNS kezelés hatásának a feltérképezése céljából. A PBS-sel kezelt kontroll HT-29 sejtek gyenge citoplazmatikus CK20 (18A ábra), gyenge DNMT3a (18G ábra) illetve gyenge membrán E-cadherin (18D ábra) kifejeződést mutattak. A tumoros DNS kezelés hatására szignifikánsan ($P \leq 0.05$) megnőtt a CK20 (18C ábra), az E-cadherin (18F) és a DNMT3a (18I ábra) fehérjék kifejeződése.



18 ábra: CK20 kifejeződés a PBS kezelt kontroll HT-29 vastagbél karcinóma sejtekben (A), egészséges szöveti DNS kezelés hatására (B), tumor szöveti DNS kezelés hatására (C). E-cadherin kifejeződés a PBS kezelt kontroll HT-29 sejtekben (D), egészséges szöveti DNS kezelés hatására (E), tumor szöveti DNS kezelés hatására (F), DNMT3a expresszió a PBS

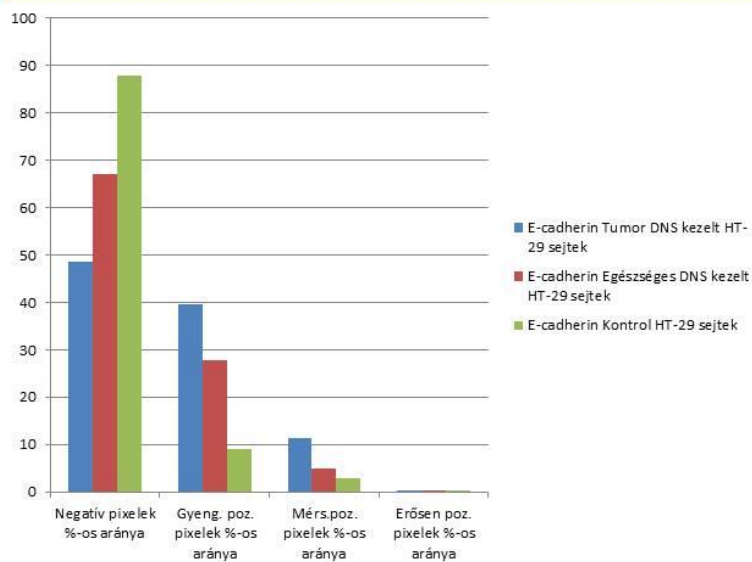
kezelt kontroll HT-29 sejtekben (G), egészséges szöveti DNS kezelés hatására (H), tumor szöveti DNS kezelés hatására (I). Digitális mikroszkópos felvétel, 200x nagyítás, 20 μm – es skála.

A Histoquant (3DHistech Kft., Magyarország) szoftver modul segítségével történt hámdifferenciációs, sejtkapcsoló és metiltranszferáz fehérjék kiértékelését a 19, 20, és 21 ábrákon összegeztük.



19 ábra: CK20 kifejeződés kontroll HT-29 sejtekben tumor (kék oszlop) és egészséges (piros oszlop) szöveti DNS kezelés hatására a kontroll HT-29 sejtekhez viszonyítva (zöld oszlop). Százalékos pixelpozitivitás értékekkel szemléltetjük a negatív (-), gyenge (+), mérsékelt (++) és erősen pozitív (+++) pixelek arányait mintánként.

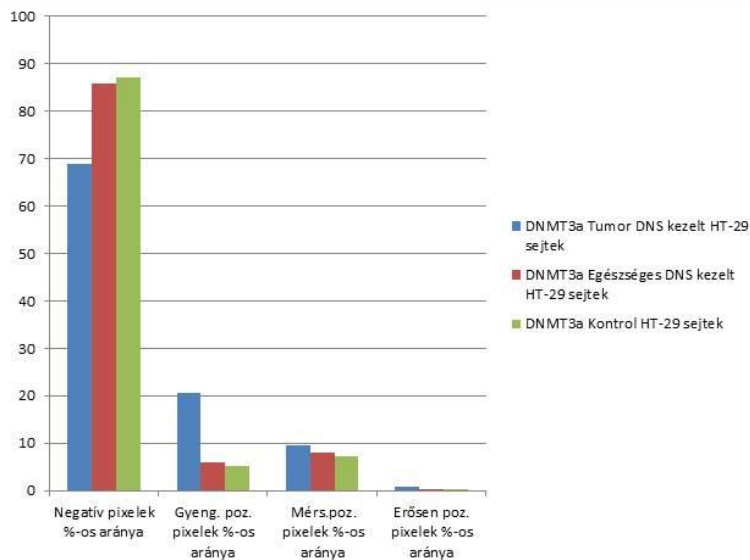
A HT-29 sejteken elvégzett E-cadherin immuncitokémiai festés kiértékelése (százalékos pixel pozitivitás)



-	+	++	+++
---	---	----	-----

20. ábra: E-cadherin kifejeződés HT-29 sejtekben tumor (kék oszlop) és egészséges (piros oszlop) szöveti DNS kezelés hatására a kontroll HT-29 sejtekhez viszonyítva (zöld oszlop). Százalékos pixelpozitivitás értékekkel szemléltetjük a negatív (-), gyenge (+), mérsékelt (++) és erősen pozitív (+++) pixelek arányait mintánként.

A HT-29 sejteken elvégzett DNMT3a immuncitokémiai festés kiértékelése (százalékos pixel pozitivitás)



-	+	++	+++
---	---	----	-----

21. ábra: DNMT3a kifejeződés HT-29 sejtekben tumor (kék oszlop) és egészséges (piros oszlop) szöveti DNS kezelés hatására a kontroll HT-29 sejtekhez viszonyítva (zöld oszlop). Százalékos pixelpozitivitás értékekkel szemléltetjük a negatív (-), gyenge (+), mérsékelt (++) és erősen pozitív (+++) pixelek arányait mintánként.

Fehérjeszintű vizsgálataink megerősítésére az E-cadherin és a CK 20 fehérjéket tartozó transzkriptumok azonosítóját kerestük vissza az Affymetrix HGU 133 2.0 Plus mRNA expressziós chipen, ahol a fenti fehérjék kifejedésével azonos irányú mRNA expresszió növekedést tapasztaltunk a tumor szöveti DNS kezelés hatására.

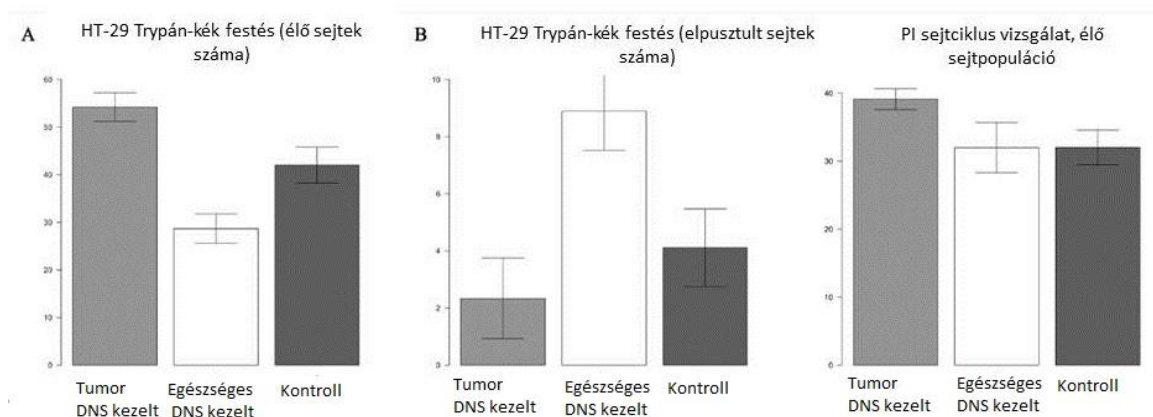
3.táblázat: Az CDH1 és a CK20 gének expressziós különbségei egészséges és tumor szöveti DNS kezelés hatására

Probe Set azonosító	Gén szimbólum	t-teszt (Kontroll vs. Egészséges szöveti DNS kezelt)	t-teszt (Kontroll vs. Tumor szöveti DNS kezelt)	LogFC(Kontroll vs. Egészséges szöveti DNS kezelt)	LogFC(Kontroll vs. Tumor szöveti DNS kezelt)
201131_s_at	CDH1	0,030924	0,004002	0,25845	0,735174
213953_at	KRT20	0,057182	0,007309	0,177712	0,741828

5.7 A HT-29 sejteken elvégzett sejtvitalitási vizsgálatok eredményei

RNS expressziós eredményeink alátámasztására további kísérleteket végeztünk el a tumor és az egészséges szöveti DNS kezelés sejtvitalitásra és sejtosztódásra kifejtett hatásának a feltérképezésére. A PI (propidium jodid) sejtciklus analízis szignifikánsan magasabb élő (G1+S+G2+M sejtfázisok) sejtpopulációt mutatott a tumor DNS-sel kezelt csoportban a kontroll csoporttal összevetve (a három független mintán mért átlagos élő sejtpopuláció a tumor szöveti DNS kezelés hatására $39.11\pm0.57\%$, a kontroll csoport élő sejtpopulációja 32.00 ± 2.50 ; $p\leq0.05$). Az egészséges szöveti DNS kezelés nem befolyásolta a vizsgált sejtek sejtciklusát, de a kezelés hatására alacsonyabb sejtszám volt azonosítható a DNS hisztogramon.

A HT-29 vastagbél karcinóma sejtek viabilitását tripánkék festési módszerrel vizsgáltuk meg, amelynek értékeit hemocitóméterben történt számlálás után statisztikailag elemeztünk. A tumor szöveti DNS kezelés szignifikánsan magasabb élő sejtszámot eredményezett a kontroll csoporttal összevetve (élő sejtek átlagos száma a tumor DNS kezelés hatására 54.22 ± 3.03 , a kontroll csoportban $42.00\pm3.77 \times 10\,000$ sejt/ml; $p\leq0.05$). Az egészséges szöveti DNS kezelés szignifikánsan alacsonyabb élő sejtszámot eredményezett a PBS kezelt kontroll mintákkal történt összevetés során (átlagos sejtszám az egészséges szöveti DNS kezelés hatására 28.67 ± 3.08 ; a kontroll csoportban $42.00\pm3.77 \times 10\,000$ sejt/ml; $p\leq0.05$; (22. ábra)).



22. ábra Tripán kék festéssel elvégzett viabilitási teszt: élő sejtek száma (A), elpusztult sejtek száma (B) és PI jelöléssel elvégzett sejtciklus vizsgálat HT-29 sejteken (C) tumor, egészséges szöveti DNS kezelés hatására és a kontroll mintákban.

5.8 A perifériás vér mononukleáris sejtjein elvégzett génexpressziós kísérletek eredményei

Az egészséges szöveti DNS kezelés hatására a Qiagen T és B sejt aktivációs array 84 génje közül a CD1D, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 és az IL-11 gének mutattak jelentőségi szintet meghaladó változást ($\log F_c \geq 1$; $p \leq 0.05$)

A tumor szöveti DNS kezelés hatására az IL-2, IL-6, IL-11 és az IL-12 gének mutattak szignifikáns génexpressziós változást ($\log F_c \geq 1$; $p \leq 0.05$).

Az egészséges illetve tumor szöveti DNS kezelés génexpressziós eredményeit a 4. táblázat foglalja össze.

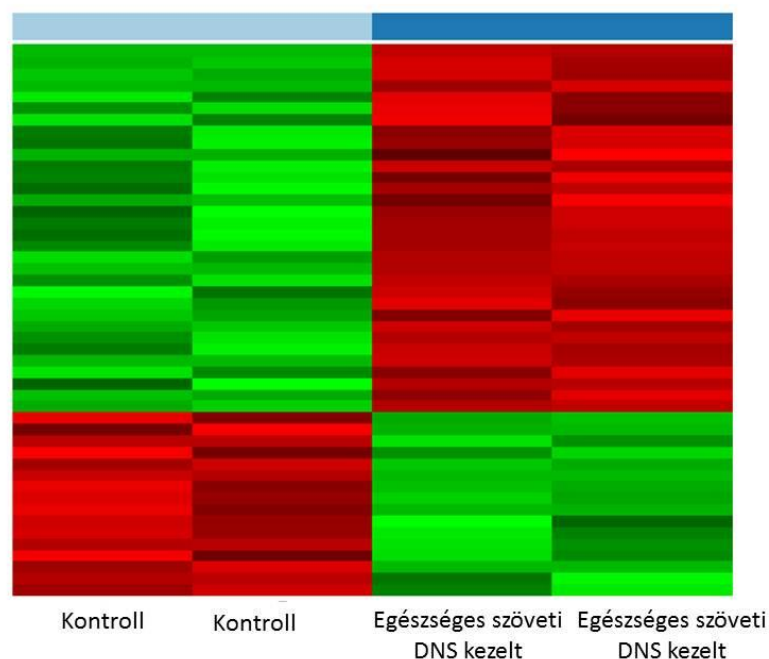
4. táblázat: Az egészséges illetve tumor szöveti DNS kezelés hatása a PBMC sejtekre. A dCt érték a GAPDH referencia génnel történt normalizáció utáni ciklusértéket szemlélteti, míg a ddCt érték az egészséges illetve tumor szöveti DNS –sel kezelt minták és a kontroll csoport közötti ciklusszám különbséget adja meg. A negatív előjel növekedett, míg a pozitív előjel csökkent expressziót jelez.

Gén szimbólum	CD1D	IL-2	IL-4	IL-6	IL-11	IL-5	IL-12
Tumor DNS-sel kezelt PBMC átlag dCt érték	34,480	33,39	33,435	26,655	35,745	34,085	31,39
Egészséges DNS-sel kezelt PBMC átlag dCt érték	34,955	32,85	34,32	26,945	35,87	33,89	32,11
ddCt érték Tumor DNS kezelt vs. Kontroll	-1,065	-1,555	-1,185	-1,225	-1,005	1,135	0,62
ddCt érték Egészséges DNS kezelt vs. kontroll	-0,78	-2,285	-0,49	-1,125	-1,07	0,75	1,15
	Felfelé szabályozott gének					Lefelé szabályozott gének	

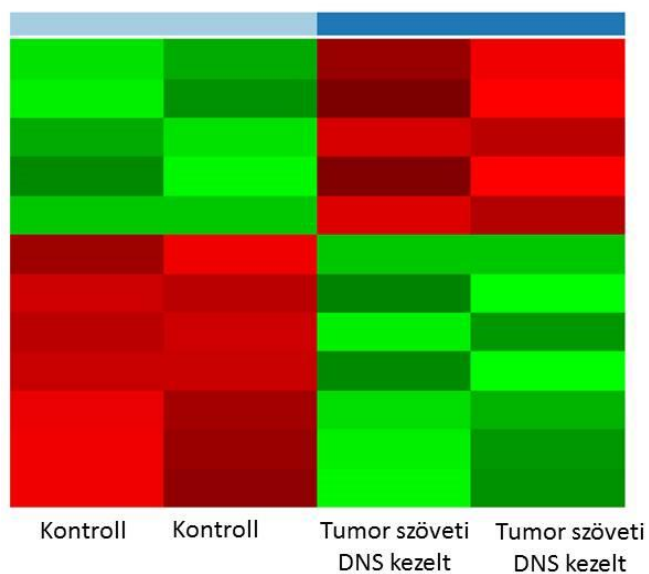
Az egészséges illetve tumor szöveti DNS kezelés hosszútávú (24 órás) hatásának a feltérképezésére az Affymetrix HGU 133 2.0 microarray rendszert használtuk. A $\log_{2}FC \geq 0.75$; $p \leq 0.05$ kritériumrendszernek megfelelően az egészséges szöveti DNS-sel való kezelés 48 génben, míg a tumor szöveti DNS kezelés 12 génben okozott lényegességi szintet meghaladó változást.

Az LPS-sel történt kezelés 1479 génben eredményezett változást a PBS kezelt kontroll csoporttal történt összehasonlításban. Az LPS-egészséges szöveti DNS együttes kezelés 129 gén expressziójában okozott lényegességi szintet meghaladó változást, míg az LPS–tumor szöveti DNS együttes kezelés 21 génben okozott lényegességi szintet meghaladó változást ($\log FC \geq 0.75$; $p \leq 0.05$).

Az egészséges illetve tumorszöveti DNS kezelések hatásait LPS hozzáadása nélkül és LPS együttes hozzáadásával, illetve az LPS kezelés hatását a teljes kontroll csoporthoz viszonyítva hő térképeken, a változott gének funkció szerinti osztályozását oszlopdiagramokon ábrázoltuk. A tumor illetve egészséges szöveti DNS kezelések hatására változó gének listája a függelék 3., 4., 5., és 6. táblázatában tekinthető meg.

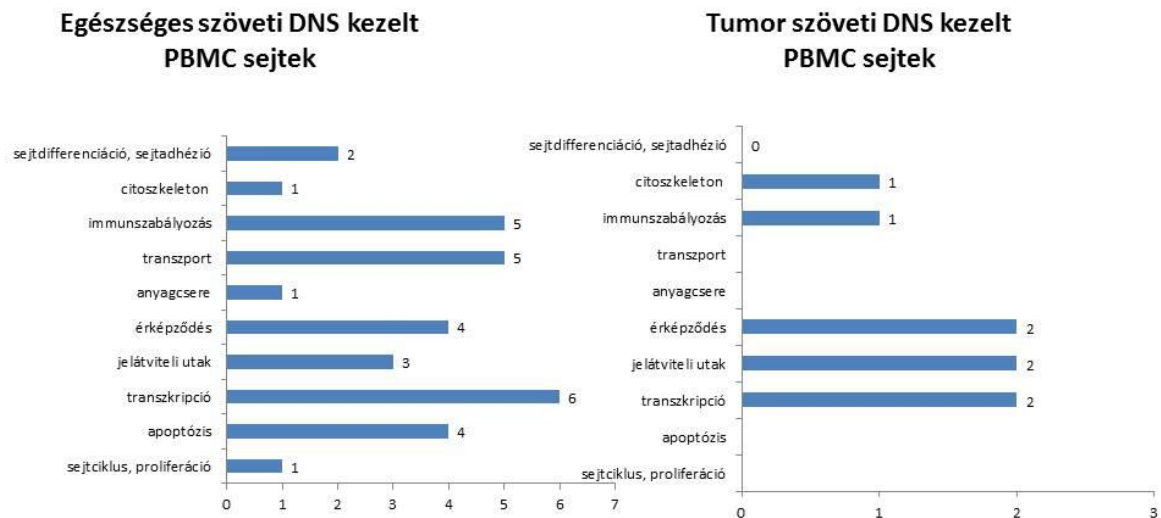


23. ábra: Szignifikáns génexpressziós eltérést mutató gének a PBMC sejteken egészséges szöveti DNS kezelés hatására ($\log FC \geq 0.75$; $p \leq 0.05$)

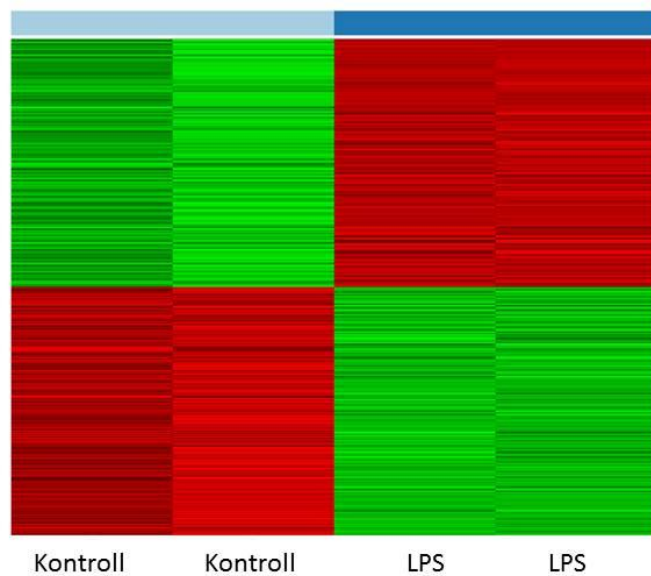


24. ábra: Szignifikáns génexpressziós eltérést mutató gének a PBMC sejteken tumor szöveti DNS kezelés hatására ($\log FC \geq 0.75$; $p \leq 0.05$)

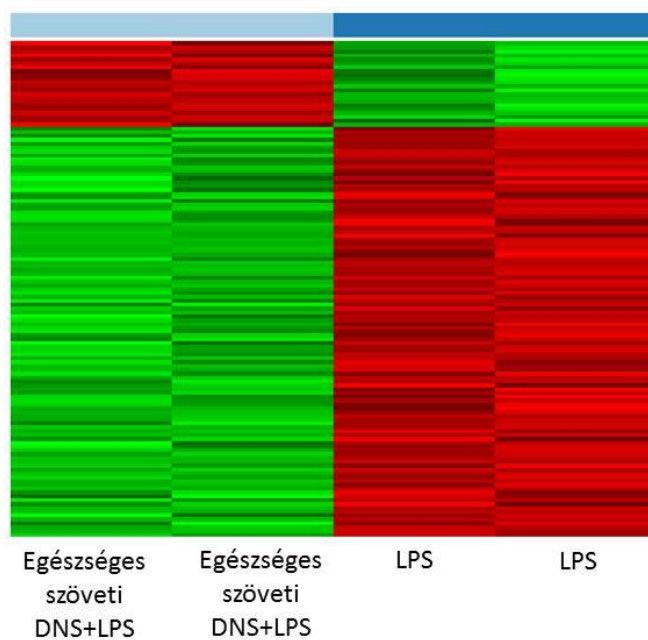
Az egészséges illetve tumoros DNS kezelés hatására megváltozott kifejeződést mutató gének funkció szerinti osztályozását a 25. ábra szemlélteti ($\log FC \geq 0.75$, $p \leq 0.05$).



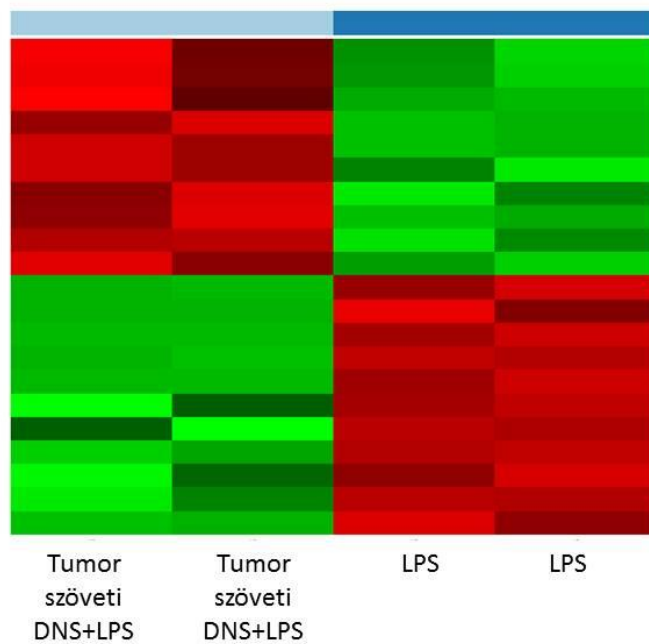
25. ábra: Az Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarray vizsgálati rendszerrel vizsgált egészséges és tumor szöveti DNS hatására változott gének sejtfunkció szerinti osztályozása ($\text{Log FC} \geq 0.75$; $p \leq 0.05$).



26. ábra: Szignifikáns génexpressziós eltérést mutató gének a PBMC sejteken LPS kezelés hatására a PBS kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva ($\log FC \geq 0.75$; $p \leq 0.05$)

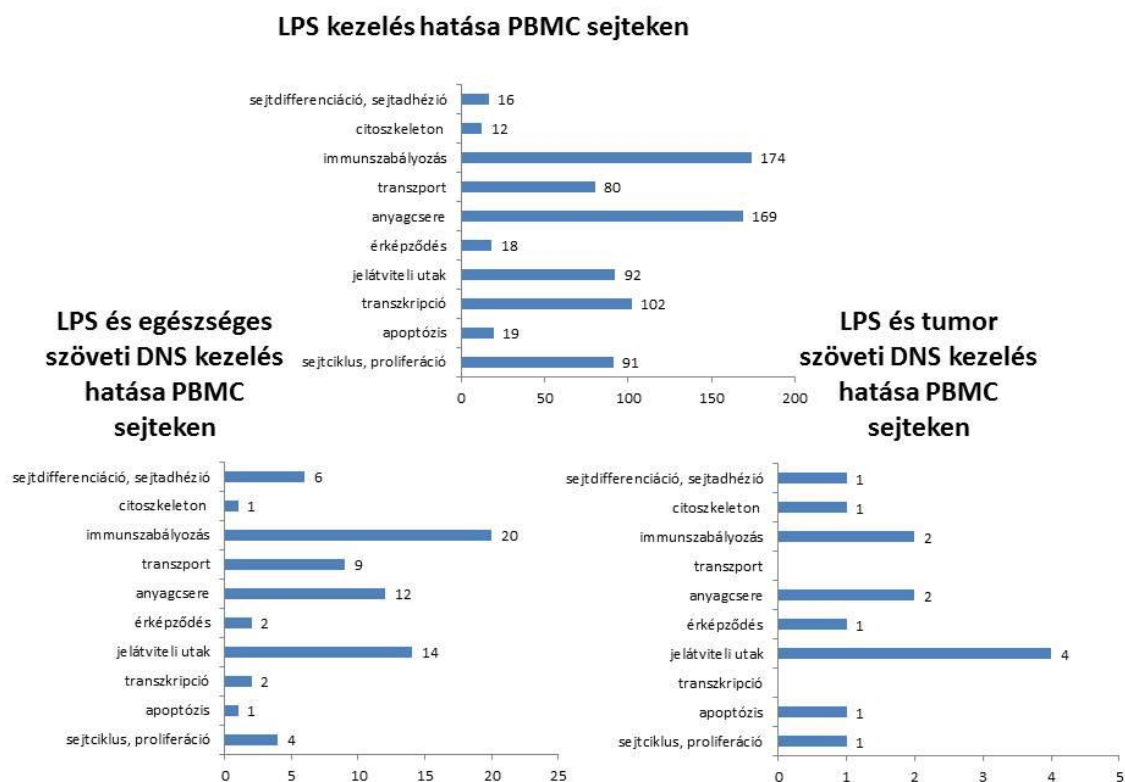


27. Ábra: Szignifikáns génexpressziós eltérést mutató gének PBMC sejteken LPS – egészséges szöveti DNS kezelés hatására az LPS-sel kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva ($\log FC \geq 0.75$; $p \leq 0.05$)



28. ábra: Szignifikáns génexpressziós eltérést mutató gének PBMC sejteken LPS – tumor szöveti DNS kezelés hatására az LPS-sel kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva ($\log FC \geq 0.75$; $p \leq 0.05$) .

Az LPS és egészséges illetve tumoros szöveti DNS együttes kezelés hatására megváltozott kifejeződést mutató gének funkció szerinti osztályozását a 29. ábra szemlélteti ($\log FC \geq 0.75$, $p \leq 0.05$).



29.ábra: Az Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarray vizsgálati rendszerrel vizsgált egészséges illetve tumor szöveti DNS LPS együttes kezelés hatására változott gének sejtfunkció szerinti osztályozása ($\text{Log FC} \geq 0.75$; $p \leq 0.05$).

6 MEGBESZÉLÉS

PhD munkám során a HT-29 vastagbél karcinóma sejteken a saját, illetve módosított (hipermetilált) DNS szekvenciáknak a génexpresszióra kifejtett hatását vizsgáltuk meg. A HT-29 vastagbél karcinóma sejtvonalon végzett első vizsgálatunk célja az volt, hogy tanulmányozzuk a HT-29 sejtvonalból izolált (saját), illetve mesterségesen metilált, fragmentált DNS szekvenciák hatását a TLR9 jelátviteli útvonal fő elemeire.

A HT-29 sejtvonalból kinyert saját és mesterségesen hipermetilált, fragmentált DNS szekvenciák eltérő hatásának az ismeretében a továbbiakban a daganatprogresszió során felszabaduló egészséges és vastagbélkarcinómás szöveti DNS szekvenciák autokrin hatását vizsgáltuk HT-29 vastagbél karcinóma sejtvonalon.

További vizsgálatainkban egészséges önkéntesek perifériás vérének mononukleáris sejteinek az egészséges, illetve tumoros szöveti DNS hatását T- és B –sejt aktivációs valós idejű PCR array rendszerrel és teljes genomot lefedő microarray módszerrel (Affymetrix HGU 133 2.0 microarray rendszer) vizsgáltuk meg. A fenti kísérlet során a qRT-PCR módszeren alapuló T- és B –sejt aktivációs array rendszer segítségével 84 gén expressziós változását vizsgáltam meg, amelyek között szerepelnek a T– és B sejtek proliferációját és differenciációját befolyásoló gének, valamint a Th1 és Th2 differenciációt és a T-sejt-polarizációt szabályozó gének. A génexpressziós panel használatával ezenkívül a makrofágok, a neutrofil sejtek, és az NK-sejtek aktivációs markereit is tanulmányoztam.

A TLR 9 jelátviteli rendszer a veleszületett és a szerzett immunitás fontos része, amely képes a DAMP és PAMP jelrendszerek molekuláris mintázatait ligandumként felismerni (35). A legújabb irodalmi adatok alapján az immunsejteken kívül TLR9 kifejeződés figyelhető meg különböző egészséges és daganatsejtekben, beleértve a HT-29 vastagbél karcinóma sejteket is (47, 51-54). A közelmúltban kimutatták, hogy a TLR9 aktivációja saját DNS és CpG agonista szekvenciák segítségével serkenti a daganatsejtek invázióját (51-54).

Teljes genom 5-metilcitozin mérési eredményeinkre támaszkodva sikerült bizonyítanunk azt a megfigyelést, miszerint a tumorszövetet általános hipometiláció és a tumor

szuppresszor promóter hipermetilációja jellemzi. A teljes genomot érintő hipometiláció fokozott daganatprogresszióval társul, melyet- többek között- petefészek karcinómában, és hepatocelluláris karcinómában is leírtak (81,82).

A gyomor-bélrendszeri daganatok vizsgálata során szintén DNS hipometilációt figyeltek meg a gyomordaganatok korai fázisaiban (83).

Három vastagbélkarcinóma sejtvonal (HT-29, SW480 és Caco 2) teljes genom 5-metilcitozin arányát határoztuk meg, ahol jelentős genomiális hipometilációt (1-2%) sikerült kimutatnunk. Eredményeink az irodalmi adatokkal összhangban arra utalnak, hogy a daganatszövetet általános hipometiláció jellemzi, ami CRC-s műtéti szöveti mintákban is kimutathatónak bizonyult, ugyanazon betegből származó egészséges szövettel összevetve (teljes genommetilációs arány CRC-ben: 8,75% és egészséges szövetben 13,35%). Többek között ez az eredmény is magyarázhatja az eltérő génexpressziós mintázatokat az egészséges és tumor szöveti DNS kezelés hatására.

6.1 A saját és módosított (hipermetilált, fragmentált) DNS szekvenciák hatása a TLR9 jelátviteli útvonal génjeinek működésére HT-29 adenokarcinóma sejtekben

Míg a saját genomiális DNS szekvenciákkal végzett kezelés a TLR9 / MYD88 függő útvonal elemeinek fokozott RNS szintű kifejeződését okozta, addig a hipermetilált DNS szekvenciák -MYD88 független útvonalon- az IL-8 mRNS fokozott expresszióját eredményezték. A mesterséges hipermetiláció és ultrahangos tördelés együttesen blokkoló hatást váltott ki a MYD88 függő útvonal elemeinek és az IL-8 gén expressziójára egyaránt. A MYD88A és a TRAF6 adaptorok mesterségesen hipermetilált és fragmentált DNS kezelés hatására csökkent mRNS szintje arra utalhat, hogy a TLR9 MYD88 úttól független jelátviteli útvonalak aktiválódnak.

Eredményeink azt támasztják alá, hogy a DNS-szerkezet- például metilációs állapottól és a fragmentumhossztól függően- jelentős szerepet játszik az eltérő génexpressziós mintázat létrehozásában. A különböző génexpressziós változásokat kiváltó DNS szekvenciák szerkezeti jellemzésére további biofizikai vizsgálatok szükségesek.

A HT-29 mesterségesen hipermetilált DNS szekvenciákkal végzett kezelés hatására a DNS metiltransferáz fehérjék fokozott termelődését észleltük, elsősorban a DNMT3a metilációs enzim fokozott kifejeződése volt kimutatható. A DNMT enzimek fokozott kifejeződését figyelték meg különböző rosszindulatú folyamatokban, többek között kolorektális, hepatocelluláris, és gyomor daganatokban (84-86). Korábban kimutatták, hogy a gyomor-bélrendszeri daganatokat magas DNMT aktivitás jellemezi (87), ami genetikai instabilitáshoz vezethet (88) és elősegíti a daganat progresszióját (89).

A HT-29 karcinóma sejtekből kinyert mesterségesen hipermetilált DNS szekvenciákkal végzett kezelés fokozott citokeratin expressziót váltott ki, ami alapján feltételezhető, hogy a metilált DNS szakaszok differenciációt fokozó hatásúak.

Ahhoz, hogy komplexebb képet kaphassunk az eltérő metiláltsági fokú DNS szekvenciák és más, szövet- és betegségspecifikus mintázatok sejtkinetikára kifejtett hatásairól, további vizsgálatok lennének szükségesek.

6.2 Az egészséges és tumor szöveti DNS eltérő hatása HT-29 vastagbél karcinóma sejtekben

A HT-29 sejteken elvégzett tumor, illetve egészséges szöveti DNS kezeléssel teljes genomot lefedő módszerrel a különböző élettani és kórélettani folyamatok során felszabaduló DNS szekvenciák autokrin hatását térképeztük fel. Mint a legjobban leírt DNS érzékelő TLR9 jelátviteli útvonal elemeinek génexpressziós változásait qRT-PCR módszerrel vizsgáltuk.

Génexpressziós eredményeink megerősítik a legfrissebb, irodalomban közölt eredményeket, amelyek azt mutatják, hogy az intakt tumor DNS a TLR9 receptorhoz ligandumként kötődik, de nem eredményezi a TLR9 jelátviteli útvonal aktivációját (90). A teljes genomot lefedő vizsgálataink eredményei arra engednek következtetni, hogy a daganat szöveti DNS szekvenciák áttétképzést elősegítő faktorként működnek, függetlenül a TLR9 és a STING jelátviteli útvonalaktól. A tumor szöveti DNS kezelés a daganatprogresszió során szerepet játszó metasztázis asszociált gének (MACC1, MALAT1, TACSTD2), setjadhéziós gének (CEACAM5), metabolikus gének (INSIG1, LIPG) és másodlagos hírvivő molekulákat kódoló gének (DAPP, CREB3L2) RNS szintű

felülszabályozását eredményezte. A tumor szöveti DNS kezelés több, áttétképzésben is jól leírt gén (MACC1, MALAT1, TACSTD2) fokozott expresszióját váltotta ki, amely rossz kórjósallal társul (74,75,76).

A daganatos szöveti DNS kezelés fokozta két vastagbél karcinómában is leírt metabolikus gén az INSIG1 és a LIPG kifejeződését [78,79]. Eredményeinkkel összhangban további vizsgálatok leírták a másodlagos hírvivő molekulák (DAPP, CREB3L2) vastagbeldaganatok növekedésében és inváziójában betöltött fontos szerepét a PI3K/Akt útvonal aktivációján keresztül [80].

Megfigyeltük, hogy a tumor szöveti DNS kezelés a citokeratin 20 hámmarker és az E-cadherin sejtadhéziót szabályozó molekula fokozott expresszióját eredményezte RNS és a fehérje szinten is. A tumor szöveti DNS kezelés után készített immuncitokémiai festések alapján valószínűsíthető az E-cadherin áthelyeződése (transzlokációja) a HT-29 vastagbél karcinómasejtek citoplazmájába, ami az E-cadherin funkcióvesztését okozhatja. A fenti jelenséget szájlaphámrákban is megfigyelték, ahol az E-cadherin funkcióvesztése a COX2 gén fokozott expresszióját, fokozott angiogenezist és fokozott daganatsejt inváziót okozott (91).

CK20 expresszió valószínűleg kompenzatorikus mechanizmusként jelentkezhet a daganatprogressziót fokozó génexpressziós változások indukáló hatására.

A génexpressziós eredményeink sejtkinetikára kifejtett hatásának bemutatása céljából fontos eredménynek tartjuk a tumor szöveti DNS daganatsejtek életképességét (viabilitását) vizsgáló kísérletünket, ahol szignifikánsan magasabb élő sejtszám volt megfigyelhető a tumor szöveti DNS kezelés hatására HT-29 vastagbélkarcinóma sejtekben a PBS kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva. Ez az eredmény rámutat a daganatprogresszió során felszabaduló tumor DNS tumornövekedést serkentő hatására.

6.3 Egészséges önkéntesek perifériás vérének mononukleáris sejtjein végzett génexpressziós kísérletek eredményei

A PBMC sejt-kísérleteink alátámasztják, hogy a TLR-ek jelentős szerepet játszanak az immunregulációban. A Qiagen T és B sejt aktivációs PCR array eredményeink az egészséges szöveti DNS T-sejt-proliferációra (CD1D expresszió fokozódás), a Th1/Th2 differenciációra (IL-2, IL-4, IL-6 mRNS szint növekedés) gyakorolt hatását igazolják.

Az egészséges szöveti DNS által kiváltott magas interleukin-2 (IL-2) expresszió a jövőre nézve ígéretes eredményként szolgálhat, mivel a prosztaták terápiajában az autológ antigén prezentáló sejtek által termelt citokinek (többek között az IL-2 és az IL-4) terápiás hatása klinikai vizsgálatok tárgyát képezi. Fujio és munkatársai kísérletesen bizonyították az autológ antigén prezentáló sejtek által szekretált citokinek T- és B –sejt proliferációt fokozó hatását (92).

A 24 órás lipopoliszacharid (LPS) kezelés az akut fázis gyulladásos citokinek (pl. IL-6), az immunregulációjáért felelős gének (pl. IRG1) kemokinek (pl. CXCL1, CXCL5) és a CD163 monocita marker termelődését fokozta RNS szinten.

Az egészséges szöveti DNS és az LPS együttes kezelés hosszútávon az LPS érzékelő receptor (pl. TLR4) és a CXCL6, a CXCL9 és a CCL13 kemokinek kódoló gének szignifikáns expresszió csökkenését okozta. A CXCL6 és a CXCL9 fokozott kifejeződését hepatocelluláris karcinómában korábbi tanulmányok is leírták. [90,91] A CXCL6 és a CXCL9 kemokinek fontos szerepet töltenek be a daganatsejtek migrációjában, valamint az ér- és áttétképzésben (93,94).

Az egészséges szöveti DNS többek között a fenti két faktor szintjének csökkentésével hozzájárulhat a daganatok lassabb növekedéséhez. Megállapíthatjuk, hogy az egészséges szövet eredetű DNS kezelés csökkenti az LPS kezelés által indukált kemokin választ. A különböző TLR ek PBMC populációkra gyakorolt hatásának feltérképezésére további vizsgálatok szükségesek.

7 KÖVETKEZTETÉSEK

A daganat szövet eredetű DNS biológiailag aktív molekula, amely többek között a DNS metilációtól és fragmenthosszúságtól függően hat vastagbél karcinóma sejtekben. A biológiai hatás nagymértékben függ a DNS szekvenciák metilációs státuszától, mivel a hipermetilált szekvenciák a MYD88-független DNS érzékelő jelátviteli útvonalak, míg a hipometilált szakaszok a MYD88-függő DNS érzékelő jelutak génjeinek működésében okoztak lényegességi szintet meghaladó változást a vastagbél karcinóma sejtekben.

A fenti eredményeink alapján a vastagbél karcinómás betegekből származó egészséges, illetve daganatos vastagbél szöveti DNS autokrin szabályozó hatását térképeztem fel HT-29 vastagbél karcinóma sejteken. A vastagbél daganat eredetű szöveti DNS kezelés HT-29 vastagbél karcinóma sejtekben bizonyos metasztázis-asszociált és metabolikus gének, valamint a daganatprogresszió során szerepet játszó másodlagos hírvivő molekulák fokozott mRNS expresszióját eredményezte. Kísérletünk eredményei rámutatnak arra, hogy a daganatprogresszió során a szöveti DNS fokozhatja több áttétképzésben és anyagcserében jelentős szerepet játszó gén expresszióját. A génexpressziós változások megerősítése szempontjából fontos eredménynek tartjuk a tumor szöveti DNS daganatsejtek életképességét (viabilitását) fokozó hatását, amely klinikai prognosztikai szereppel bírhat. A daganatprogresszió során felszabaduló szöveti DNS prognosztikai faktorként való alkalmazása mellett felvetődhet a DNS lebontását befolyásoló terápiás beavatkozás lehetősége is a daganatprogresszió korai fázisaiban (33).

Megvizsgáltuk továbbá az egészséges és a tumor szöveti DNS immunmoduláns hatását egészséges donorok perifériás vérének mononukleáris sejtjein. Az egészséges szöveti DNS PBMC-kre gyakorolt akut hatásának vizsgálata során erős IL-2 génexpresszió fokozódást tapasztaltunk és több T-sejt-proliferációt (pl. CD1D), Th1 / Th2 differenciációt (pl. IL-2, IL-4, IL-6) szabályozó citokint kódoló gén mutatott lényegességi szintet meghaladó expressziós változást. A 24 órás LPS kezelés számos akut fázisú gyulladásos citokin (pl. IL-6), immunregulációért felelő gén (pl. IRG1), monocita marker (CD 163) és több kemokin (pl. CXCL1, CXCL5) mRNS-ének termelődését fokozta. Az egészséges szövet eredetű

DNS csökkentette az LPS kezelés által felülregulált érzékelő receptor (TLR4) és több kemokint kódoló gén (CXCL6, CXCL9 és CCL13) expresszióját. Eredményeink rámutatnak a PBMC sejteken található TLR-ek lehetséges antagonistá hatására.

8 LEGFONTOSABB ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK ÉS MEGFIGYELÉSEK

A HT-29 vastagbél karcinóma sejtekből izolált DNS biológiailag aktív molekulaként génexpressziós változásokat eredményez a HT-29 sejteken.

A kezelő ágensként alkalmazott genomiális DNS metilációja a MYD88-függő TLR9 jelátviteli úttól független jelátviteli utak elemeiben okoz génexpressziós változásokat és fokozza az IL-8 citokint kódoló gén mRNS expresszióját.

A vastagbél-daganatos betegekből izolált tumor szöveti DNS fokozta az áttétképzéshez köthető gének, mint a metasztázis-asszociált molekula 1 (MACC1) a vastagbél-daganatokban és a tüdő adenokarcinóma-asszociált metasztázis transzkriptum 1 (MALAT1), a metabolikus gének mint az inzulin indukálta gén 1 (INSIG1) és az endoteliális lipáz (LIPG), valamint a másodlagos hírvivő molekulák, mint a duál adaptor foszfortirozin és 3-foszfoinozitidek (DAPP1) és a cAMP hírvivő elem 3-szerű fehérje 2 (CREB3L2) mRNS expresszióját HT-29 vastagbél karcinóma sejtekben, ami felveti a tumor szöveti DNS daganatprogressziót támogató hatását.

A vastagbél-daganatos betegekből izolált szöveti DNS fokozta a HT-29 vastagbél karcinóma sejtek életképességét, ami a jövőbeli kísérletekkel kiegészítve esetlegesen klinikai prognosztikus faktorrá emelheti a daganatprogresszió során felszabaduló szöveti DNS-t.

A perifériás vér mononukleáris sejtjeiben az egészséges szöveti DNS az IL-2 gén fokozott expresszióját eredményezte, és több T-sejt-proliferációt és Th1 / Th2 differenciációt szabályozó citokint kódoló gén működésében okozott változást. Hosszú távú kezelés során az egészséges szöveti DNS csökkentette az LPS kezelés által felülregulált érzékelő receptor (TLR4) és több kemokint kódoló gén kifejeződését. Eredményeink rámutathatnak a PBMC-ken található TLR-ek (TLR4 és TLR9) lehetséges antagonistá hatására.

9 ÖSSZEFOGLALÁS

9.1 Magyar összefoglaló

Phd munkám során saját- és módosított (hipermetilált és fragmentált), egészséges és tumor szöveti DNS szekvenciák hatását vizsgáltam HT-29 vastagbél karcinóma sejteken és egészséges önkéntesek perifériás vérének mononukleáris sejtjein.

Munkám során feltérképeztem a tumor szöveti DNS génexpresszióra gyakorolt hatását, illetve vizsgáltam a daganatsejtek életképességének változását a tumor szöveti DNS kezelés hatására, amely során megállapítottam, hogy a tumor szöveti DNS fokozza a karcinómasejtek életképességét.

A mesterségesen hipermetilált DNS szekvenciák a saját, nem módosított DNS szekvenciák hatásától eltérően befolyásolták a TLR9 jelátviteli útvonal génjeinek expresszióját. A kezelő ágensként alkalmazott DNS hipermetilációja - a MYD88-független úton - az IL-8 gén lényegességi szintet meghaladó felülregulációját eredményezte. A HT-29 sejtek saját, nem-metilált DNS fragmentjei a MYD88-függő TLR9 útvonal génjeinek működésében okoztak szignifikáns változást.

A vastagbél tumor szöveti DNS kezelés metasztázis-asszociált gének, metabolikus gének és daganatprogresszió során szerepet játszó másodlagos hírvivő molekulák mRNS-ének fokozott termelődését eredményezte HT-29 vastagbél karcinóma sejtekben. A fenti a génexpressziós változások nem voltak megfigyelhetők az egészséges szöveti DNS kezelés hatására. A tumor szöveti DNS szignifikánsan növelte a HT-29 vastagbél karcinóma sejtek viabilitását a PBS-sel kezelt kontroll csoporthoz viszonyítva.

A perifériás vér mononukleáris sejtjeiben az egészséges szöveti DNS az IL-2 gén fokozott expresszióját eredményezte, és több T-sejt-proliferációt, Th1 / Th2 differenciációt szabályozó citokint kódoló gén működésében okozott változást. Hosszú távú kezelés során az egészséges szöveti DNS lecsökkentette az LPS kezelés által felülregulált érzékelő receptor (TLR4) és több kemokint kódoló gén expresszióját.

9.2 Angol összefoglaló

In my PhD thesis I have examined the effects of HT-29 self- and modified (hypermethylated and fragmented) genomic DNA sequences, healthy colon and colon cancer tissue DNA sequences on HT-29 colon cancer cells and on peripheral blood mononuclear cells isolated from blood of healthy volunteers.

I have established the effect of tumor originated DNA on gene expression and in addition I have performed cell viability assays, where increased cell viability was detected after tumor DNA treatment compared to healthy tissue DNA treatment and PBS treated controls.

The artificially hypermethylated DNA sequences had different impact on the expression of TLR9 signaling pathway genes compared to the HT-29 self-, non-modified DNA sequences. While treatment by hypermethylated HT-29 DNA sequences induced the overexpression of IL-8 gene via MyD88-independent way, the HT-29 cell's own DNA fragments resulted in upregulation of the elements of TLR9 MyD88-dependent pathway.

In HT-29 colon cancer cells, the colon cancer tissue DNA caused the overexpression of several metastasis-associated genes, metabolic genes and second messenger molecule genes playing important role during tumor progression. The above-mentioned gene expression changes could not be observed after treatment with healthy tissue DNA. The tumor tissue DNA treatment significantly increased the viability of HT-29 colon carcinoma cells compared to the PBS-treated control group.

Healthy tissue DNA treatment resulted in elevated expression of IL-2 gene in the peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers, and affected several genes encoding cytokines involved in T cell proliferation and Th1 / Th2 differentiation. During long-term treatment, the healthy tissue DNA induced downregulation of the gene expression changes induced by LPS treatment, namely the expression of the LPS binding receptor (TLR4) and chemokines.

10 IRODALOMJEGYZÉK

- 1 Röchlich, P., Szövetan, Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, Budapest, 2006.
- 2 Shussman N, Wexner SD. (2014) Colorectal polyps and polyposis syndromes. *Gastroenterol Rep (Oxf)*, 2: 1-15
- 3 Fearon ER, Vogelstein B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61: 759-67.
- 4 Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319: 525-32.
- 5 Span M, Moerkerk PT, De Goeij AF, Arends JW. (1996) A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer*, 69: 241-5.
- 6 Ranaldi R, Gioacchini AM, Manzin A, Clementi M, Paolucci S, Bearzi I. (1995) Adenoma carcinoma sequence of colorectum. Prevalence of K-ras gene mutation in adenomas with increasing degree of dysplasia and aneuploidy. *Diagn Mol Pathol*, 4: 198-202.
- 7 Maywald RL, Doerner SK, Pastorelli L, De Salvo C, Benton SM, Dawson EP, Lanza DG, Berger NA, Markowitz SD, Lenz HJ, Nadeau JH, Pizarro TT, Heaney JD. (2015) IL-33 activates tumor stroma to promote intestinal polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 2487-96
- 8 Muralidharan-Chari V, Clancy JW, Sedgwick A, D'Souza-Schorey C (2010) Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. *J Cell Sci*, 123:1603-11.

- 9 Lázaro-Ibáñez E, Sanz-Garcia A, Visakorpi T, Escobedo-Lucea C, Siljander P, Ayuso-Sacido A, Yliperttula M. (2014) Different gDNA content in the subpopulations of prostate cancer extracellular vesicles: apoptotic bodies, microvesicles, and exosomes *Prostate*, 74: 1379-90.
- 10 Wysoczynski M, Ratajczak MZ. (2009) Lung cancer secreted microvesicles: underappreciated modulators of microenvironment in expanding tumors. *Int J Cancer*, 125: 1595-603.
- 11 Yamada N, Tsujimura N, Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Nakagawa Y, Naoe T, Akao Y. (2014) Colorectal cancer cell-derived microvesicles containing microRNA-1246 promote angiogenesis by activating Smad 1/5/8 signaling elicited by PML down-regulation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1839: 1256-72.
- 12 Bhowmick NA, Moses HL. (2005) Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev*, 15: 97-101.
- 13 Sharon C, Baranwal S, Patel NJ, Rodriguez-Agudo D, Pandak WM, Majumdar AP, Krystal G, Patel BB. (2015) Inhibition of insulin-like growth factor receptor/AKT/mammalian target of rapamycin axis targets colorectal cancer stem cells by attenuating mevalonate-isoprenoid pathway in vitro and in vivo. *Oncotarget*, 6: 15332-47.
- 14 Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmiecik TE, Vande Woude GF, Aaronson SA (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, 251: 802–4.
- 15 Hynes NE, MacDonald G. (2009) ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Curr Opin Cell Biol*, 21:177-84.
- 16 Krejsa C, Rogge M, Sadee W. (2006) Protein therapeutics: new applications for pharmacogenetics. *Nat Rev Drug Discov*, 5:507-21.
- 17 Blumenberg M. (2014) Differential transcriptional effects of EGFR inhibitors. *PLoS One*, 9(9):e102466.

- 18 Plesec TP, Hunt JL. (2009) KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Adv Anat Pathol*, 16:196-203.
- 19 Taylor MA, Parvani JG, Schiemann WP. (2010) The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15:169-90.
20. Kim YI. (1998) Diet, lifestyle, and colorectal cancer: is hyperinsulinemia the missing link? *Nutr Rev*. 56: 275– 279.
- 21 Leiszter K, Sipos F, Galamb O, Krenács T, Veres G, Wichmann B, Fűri I, Kalmár A, Patai ÁV, Tóth K, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. (2015) Promoter hypermethylation-related reduced somatostatin production promotes uncontrolled cell proliferation in colorectal cancer. *PLoS One*, 10(2):e0118332.
- 22 Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. (1998) Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, 391:357-62.
- 23 Valcz G, Patai AV, Kalmár A, Péterfia B, Fűri I, Wichmann B, Múzes G, Sipos F, Krenács T, Mihály E, Spisák S, Molnár B, Tulassay Z. (2014) Myofibroblast-derived SFRP1 as potential inhibitor of colorectal carcinoma field effect. *PLoS One*, 9(11):e106143.
- 24 Mandel P, Metais P. (1948) [Not Available]. *C R Seances Soc Biol Fil*, 142: 241–3.
- 25 Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. (1977) Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*, 37: 646–50.
- 26 Stroun M, Anker P, Lyautey J, Lederrey C, Maurice PA. (1987) Isolation and characterization of DNA of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 23:707–712.
- 27 Lo YM, Chan KC, Sun H, Chen EZ, Jiang P, Lun FM, Zheng YW, Leung TY, Lau TK, Cantor CR, Chiu RW. (2010) Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*, 2(61):61ra91.

- 28 Fleischhacker M, Schmidt B. (2007) Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer: A survey. *Biochimica Biophys Acta*, 1775: 181–232.
- 29 van der Vaart M, Pretorius PJ. (2008) Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta*, 395: 186–186.
- 30 Aggarwal SK, Wagner RW, McAllister PK, Rosenberg B (1975) Cell-surface-associated nucleic acid in tumorigenic cells made visible with platinum-pyrimidine complexes by electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72: 928-932.
- 31 Juckett DA, Rosenberg B (1982) Actions of cis-diamminedichloroplatinum on cell surface nucleic acids in cancer cells as determined by cell electrophoresis techniques. *Cancer Res*, 42: 3565-3573.
- 32 Russell JL, Golub ES (1978) Leukemia in AKR mice: a defined suppressor cell population expressing membrane-associated DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75: 6211-6214.
- 33 Wen F, Shen A, Choi A, Gerner EW, Shi J (2013) Extracellular DNA in pancreatic cancer promotes cell invasion and metastasis. *Cancer Res*, 73: 4256-4266.
- 34 Jinushi M. (2012) The role of innate immune signals in antitumor immunity. *Oncoimmunology*, 1: 189-194.
- 35 Fűri I, Sipos F, Germann TM, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B, Műzes G. (2013) Epithelial toll-like receptor 9 signaling in colorectal inflammation and cancer: clinico-pathogenic aspects. *World J Gastroenterol*, 19: 4119-4126.
- 36 Pinto A, Morello S, Sorrentino R (2011) Lung cancer and Toll-like receptors. *Cancer Immunol Immunother*, 60: 1211-1220.
- 37 Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. (2001) DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*, 61: 1659-1665.

- 38 Diehl F, Li M, Dressman D, He Y, Shen D, Szabo S, Diaz LA Jr, Goodman SN, David KA, Juhl H, Kinzler KW, Vogelstein B. (2005) Detection and quantification of mutations in the plasma of patients with colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 16368-16373.
- 39 Gormally E, Caboux E, Vineis P, Hainaut P (2007) Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance. *Mutat Res*, 635: 105-117.
- 40 Chen Z, Fadiel A, Naftolin F, Eichenbaum KD, Xia Y (2005) Circulation DNA: biological implications for cancer metastasis and immunology. *Med Hypotheses*, 65: 956-961.
- 41 Al-Nedawi K, Meehan B, Micallef J, Lhotak V, May L, Guha A, Rak J. (2008) Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nat Cell Biol*, 10: 619-24.
- 42 Yu D, Hamada J, Zhang H, Nicolson GL, Hung MC. (1992) Mechanisms of c-erbB2/neu oncogene-induced metastasis and repression of metastatic properties by adenovirus 5 E1A gene products. *Oncogene*, 7: 2263-70.
- 43 Lee TH, Chennakrishnaiah S, Audemard E, Montermini L, Meehan B, et al. (2014) Oncogenic ras-driven cancer cell vesiculation leads to emission of double-stranded DNA capable of interacting with target cells. *Biochem Biophys Res Commun* 451: 295-301.
- 44 Barber GN (2011) Innate Immune DNA Sensing Pathways: STING, AIMII and the Regulation of Interferon Production and Inflammatory Responses. *Curr Opin Immunol*, 23(1): 10.1016/j.coi.2010.12.015.
- 45 Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, Klinman DM. (2001) Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human cells. *J Immunol*, 167:3555-8.

- 46 Takeshita F, Gursel I, Ishii KJ, Suzuki K, Gursel M, Klinman DM. (2004) Signal transduction pathways mediated by the interaction of CpG DNA with Toll-like receptor 9. *Semin Immunol*, 16: 17-22.
- 47 Ewaschuk JB, Backer JL, Churchill TA, Obermeier F, Krause DO, et al. (2007) Surface expression of Toll-like receptor 9 is upregulated on intestinal epithelial cells in response to pathogenic bacterial DNA. *Infect Immun*, 75: 2572-2579.
- 48 Li J, Huang Q, Zeng F, Li W, He Z, Chen W, Zhu W, Zhang B. (2014) The prognostic value of global DNA hypomethylation in cancer: a meta-analysis. *PLoS One*, 9(9):e106290.
- 49 Hoshimoto S, Takeuchi H, Ono S, Sim MS, Huynh JL, Huang SK, Marzese DM, Kitagawa Y, Hoon DS. (2015) Genome-wide hypomethylation and specific tumor-related gene hypermethylation are associated with esophageal squamous cell carcinoma outcome. *J Thorac Oncol*, 10: 509-17.
- 50 Zelic R, Fiano V, Grasso C, Zugna D, Pettersson A, Gillio-Tos A, Merletti F, Richiardi L. (2015) Global DNA hypomethylation in prostate cancer development and progression: a systematic review. *Prostate Cancer Prostatic Dis Mar*, 18: 1-12.
- 51 Ilvesaro JM, Merrell MA, Swain TM, Davidson J, Zayzafoon M, Harris KW, Selander KS. (2007) Toll like receptor-9 agonists stimulate prostate cancer invasion in vitro. *Prostate*, 67: 774-781.
- 52 Merrell MA, Ilvesaro JM, Lehtonen N, Sorsa T, Gehrs B, Rosenthal E, Chen D, Shackley B, Harris KW, Selander KS. (2006) Toll-like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol Cancer Res*, 4: 437-447.
- 53 Zhang Y, Wang Q, Ma A, Li Y, Li R, Wang Y. (2014) Functional expression of TLR9 in esophageal cancer. *Oncol Rep*, 31: 2298-2304.
- 54 Sha HL, Ouyang WX, Lu G. (2010) Expression and clinical significance of TLR9 in ovarian cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 32: 913-916.

- 55 González-Reyes S, Marín L, González L, González LO, del Casar JM, Lamelas ML, González-Quintana JM, Vizoso FJ. (2010) Study of TLR3, TLR4 and TLR9 in breast carcinomas and their association with metastasis. *BMC Cancer*, 10: 665.
- 56 Lamphier MS, Sirois CM, Verma A, Golenbock DT, Latz E. (2006) TLR9 and the recognition of self and non-self nucleic acids. *Ann N Y Acad Sci*, 1082: 31-43
- 57 Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T, Heeg K, Lipford GB, Wagner H. (1998) CpG-DNA specific activation of antigen-presenting cells requires stresskinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J*, 17: 6230-6240
- 58 Zhu J, Mohan C. (2010) Toll-like receptor signaling pathways—therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm*; 2010: 781235
- 59 Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. (2015) The STING pathway and the T cell-inflamed tumor microenvironment *Trends Immunol*, 36:250-6.
- 60 Woo SR, Corrales L, Gajewski TF. (2015) Innate immune recognition of cancer. *Annu Rev Immunol*, 33: 445-74.
- 61 Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, Spranger S, Furdyna MJ, Leung MY, Duggan R, Wang Y, Barber GN, Fitzgerald KA, Alegre ML, Gajewski TF (2014) STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity*, 41:830-42.
- 62 Akhtar M, Watson JL, Nazli A, McKay DM (2003) Bacterial DNA evokes epithelial IL-8 production by a MAPK-dependent, NF-kappaB-independent pathway. *FASEB J*, 17: 1319-21.
- 63 Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J (2005) Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Exp Immunol*, 141: 298-306.

64 Kauppila JH1, Karttunen TJ, Saarnio J, Nyberg P, Salo T, Graves DE, Lehenkari PP, Selander KS. (2013) Short DNA sequences and bacterial DNA induce esophageal, gastric, and colorectal cancer cell invasion. *APMIS*, 121: 511-22.

65 Bauer M, Heeg K, Wagner H, Lipford GB (1999) DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology*, 97: 699-705.

66. Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. (1996) Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol*, 157: 2116–22.

67 Yi AK, Tuetken R, Redford T, Waldschmidt M, Kirsch J, Krieg AM. (1998) CpG motifs in bacterial DNA activate leukocytes through the pH-dependent generation of reactive oxygen species. *J Immunol*, 160: 4755–61.

68 Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM (1995) CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374 :546-9.

69 Krieg AM, Yi AK, Schorr J, Davis HL. (1998) The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol*, 6:23-7.

70 Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 168: 4531-4537.

71 Harada M, Okamoto T, Kurosawa S, Shinomiya Y, Ito O, Takenoyama M, Terao H, Matsuzaki G, Kimura G, Nomoto K. (1995) The antitumor activity induced by the in vivo administration of activated B cells bound to anti-CD3 monoclonal antibody. *Cell Immunol*, 161: 132-137.

72. Tumor Analysis Best Practices Working Group. (2004) Expression profiling-best practices for data generation and interpretation in clinical trials. *Nat Rev Genet*; 5: 229-37.

73. Parmigiani G, Garrett ES, Irizarry RA, Zeger SL. The Analysis of Gene Expression Data: An Overview of Methods and Software. Statistics for Biology and Health, Springer, New York, 2003: 1-45
74. Cui Z, Tang J, Chen J, Wang Z. (2014) Hsa-miR-574-5p negatively regulates MACC-1 expression to suppress colorectal cancer liver metastasis. Cancer Cell Int, 14: 47.
- 75 Yang MH, Hu ZY, Xu C, Xie LY, Wang XY, Chen SY, Li ZG. (2015) MALAT1 promotes colorectal cancer cell proliferation/migration/invasion via PRKA kinase anchor protein 9. Biochimica et Biophysica Acta, 1852: 166–74.
- 76 Xia Y, Li B, Gao N, Xia H, Men Y, Liu Y, Liu Z, Chen Q, Li L. (2014) Expression of tumor-associated calcium signal transducer 2 in patients with salivary adenoid cystic carcinoma: Correlation with clinicopathological features and prognosis. Oncology Letters, 8: 1670–74.
- 77 Blumenthal RD, Hansen HJ, Goldenberg DM. (2005) Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). Cancer research, 65: 8809–17.
- 78 König B, Koch A, Spielmann J, Hilgenfeld C, Hirche F, Stangl GI, Eder K. (2009) Activation of PPARalpha and PPARgamma reduces triacylglycerol synthesis in rat hepatoma cells by reduction of nuclear SREBP-1. Eur J Pharmacol, 605: 23-30.
- 79 Dong X, Wang G, Zhang G, Ni Z, Suo J, Cui J, Cui A, Yang Q, Xu Y, Li F. (2013) The endothelial lipase protein is promising urinary biomarker for diagnosis of gastric cancer. Diagn Pathol, 8: 45
- 80 Zhu Z, Zhang X, Guo H, Fu L, Pan G, Sun Y. (2015) CXCL13-CXCR5 axis promotes the growth and invasion of colon cancer cells via PI3K/AKT pathway. Molecular and cellular biochemistry, 400: 287–95.

- 81 Widschwendter M, Jiang G, Woods C, Müller HM, Fiegl H, Goebel G, Marth C, Müller-Holzner E, Zeimet AG, Laird PW, Ehrlich M. (2004) DNA hypomethylation and ovarian cancer biology. *Cancer Res*, 64: 4472-80.
82. Itano O, Ueda M, Kikuchi K, Hashimoto O, Hayatsu S, Kawaguchi M, Seki H, Aiura K, Kitajima M. (2002) Correlation of postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma with demethylation of repetitive sequences. *Oncogene*, 21: 789-97.
83. Cravo M, Pinto R, Fidalgo P, Chaves P, Glória L, Nobre-Leitão C, Costa Mira F. (1996) Global DNA hypomethylation occurs in the early stages of intestinal type gastric carcinoma. *Gut*, 39: 434-8.
- 84 Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, Laird PW. (1999) CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res*, 59: 2302-6.
- 85 Oh BK, Kim H, Park HJ, Shim YH, Choi J, Park C, Park YN. (2007) DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *Int J Mol Med*, 20: 65-73.
- 86 Ding WJ, Fang JY, Chen XY, Peng YS. (2008) The expression and clinical significance of DNA methyltransferase proteins in human gastric cancer. *Dig Dis Sci*, 53: 2083-9
- 87 Fang JY, Lu R, Mikovits JA, Cheng ZH, Zhu HY, Chen YX. (2006) Regulation of hMSH2 and hMLH1 expression in the human colon cancer cell line SW1116 by DNAmethyltransferase 1. *Cancer Letters*, 233: 124–130.
- 88 Geiman TM, Sankpal UT, Robertson AK, Chen Y, Mazumdar M, Heale JT, Schmiesing JA, Kim W, Yokomori K, Zhao Y, Robertson KD. (2004) Isolation and characterization of a novel DNA methyltransferase complex linking DNMT3B with components of the mitotic chromosome condensation machinery,” *Nucleic Acids Research*, 32: 2716–2729.

89 Fang JY, Cheng ZH, Chen YX, Lu R, Yang L, Zhu HY, Lu LG. (2004) Expression of Dnmt1, demethylase, MeCP2 and methylation of tumor-related genes in human gastric cancer. *World J Gastroenterol*, 10: 3394-8.

90 Tuomela J, Sandholm J, Kaakinen M, Patel A, Kauppila JH, Ilvesaro J, Chen D, Harris KW, Graves D, Selander KS. (2013) DNA from dead cancer cells induces TLR9-mediated invasion and inflammation in living cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*, 142: 477–87.

91 Santoro A, Bufo P, Russo G, Cagiano S, Papagerakis S, Bucci P, Aquino G, Longo F, Feola A, Giordano A, Di Carlo A, Di Domenico M, Pannone G (2015) Expression and clinical implication of cyclooxygenase-2 and e-cadherin in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Biol Ther*. Jul 28:0.

92 Fujio K, Watanabe M, Ueki H, Li SA, Kinoshita R, Ochiai K, Futami J, Watanabe T, Nasu Y, Kumon H. (2015) A vaccine strategy with multiple prostatic acid phosphatase-fused cytokines for prostate cancer treatment. *Oncology reports*. 33: 1585-92.

93 Tian H, Huang P, Zhao Z, Tang W, Xia J. (2014) HIF-1 α plays a role in the chemotactic migration of hepatocarcinoma cells through the modulation of CXCL6 expression. *Cell Physiol Biochem*, 34: 1536-46.

94 Lan X, Xiao F, Ding Q, Liu J, Liu J, Li J, Zhang J, Tian DA. (2014) The effect of CXCL9 on the invasion ability of hepatocellular carcinoma through up-regulation of PREX2. *J Mol Histol*. 45: 689-96.

11 SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

11.1 A disszertáció témájában megjelent közlemények

11.1.1 Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Fúri I, Sipos F, Germann TM, Kalmár A, Tulassay Z, Molnár B, Múzes G. Epithelial toll-like receptor 9 signaling in colorectal inflammation and cancer: clinico-pathogenic aspects. World J Gastroenterol. 2013; 19(26): 4119-26. **IF: 2.433**

Fúri I, Sipos F, Spisák S, Kiszner G, Wichmann B, Schöller A, Tulassay Z, Múzes G, Molnár B Association of self-DNA mediated TLR9-related gene, DNA methyltransferase, and cytokeratin protein expression alterations in HT29-cells to DNA fragment length and methylation status. ScientificWorldJournal. 2013; 2013: 293296. **IF: 1.219**

Fúri I, Kalmár A, Wichmann B, Spisák S, Schöller A, Barták B, Tulassay Z, Molnár B. Cell Free DNA of Tumor Origin Induces a 'Metastatic' Expression Profile in HT-29 Cancer Cell Line. PLoS One. 2015; 10(7): e0131699. **IF: 3.234**

11.1.2 Magyar folyóiratban megjelent közlemények

Fúri I, Sipos F, Spisák S, Kalmár A, Patai ÁV, Molnár B, Tulassay Zs: A Toll-like receptor rendszer aktiválása nukleinsavanalógokkal gyulladásos és daganatos betegségek terápiájában, Magyar Belorvosi Archívum 2012; 65(4): 5-11. **IF: 0**

11.2. A disszertáció témájától eltérő témában megjelent közlemények

11.2.1 Nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Sipos F, Múzes G, **Fúri I**, Spisák S, Wichmann B, Germann TM, Constantinovits M, Krenács T, Tulassay Z, Molnár B. Intravenous Administration of a Single-Dose Free-Circulating DNA of Colitic Origin Improves Severe Murine DSS-Colitis. Pathol Oncol Res. 2014; 20(4): 867-77. **IF: 1.855**

Múzes G, Sipos F, **Fúri I**, Constantinovits M, Spisák S, Wichmann B, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. Preconditioning with Intravenous Colitic Cell-Free DNA Prevents DSS-Colitis by Altering TLR9-Associated Gene Expression Profile. Dig Dis Sci. 2014; 59(12): 2935-46. **IF: 2.613**

Sipos F, Múzes G, Patai AV, **Fúri I**, Péterfia B, Hollósi P, Molnár B, Tulassay Z. Genome-wide screening for understanding the role of DNA methylation in colorectal cancer. *Epigenomics*. 2013; 5(5): 569-81. **IF: 5.215**

Muzes G, Constantinovits M, **Furi I**, Tulassay Z, Sipos F. Interaction Of Autophagy And Toll-Like Receptors: A Regulatory Cross-Talk - Even In Cancer Cells? *Curr Drug Targets*. 2014; 15(8): 743-52. **IF: 3.021**

Sipos F, **Fúri I**, Constantinovits M, Tulassay Z, Múzes G. Contribution of TLR signaling to the pathogenesis of colitis-associated cancer in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(36): 12713-21. **IF: 2.369**

Valcz G, Patai AV, Kalmár A, Péterfia B, **Fúri I**, Wichmann B, Múzes G, Sipos F, Krenács T, Mihály E, Spisák S, Molnár B, Tulassay Z. Myofibroblast-Derived SFRP1 as Potential Inhibitor of Colorectal Carcinoma Field Effect. *PLoS One*. 2014; 9(11): e106143. **IF: 3.234**

Kalmár A, Péterfia B, Wichmann B, Patai AV, Barták BK, Nagy ZB, **Furi I**, Tulassay Z, Molnár B. Comparison of Automated and Manual DNA Isolation Methods for DNA Methylation Analysis of Biopsy, Fresh Frozen, and Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Colorectal Cancer Samples. 2015; 20(6): 642-51. **IF: 1.855**

Leiszter K, Sipos F, Galamb O, Krenács T, Veres G, Wichmann B, **Fúri I**, Kalmár A, Patai AV, Tóth K, Valcz G, Tulassay Z, Molnár B. Promoter hypermethylation-related reduced somatostatin production promotes uncontrolled cell proliferation in colorectal cancer. *PLoS One*. 2015; 10(2): e0118332. **IF: 3.234**

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet szeretném kifejezni mindazoknak, akik PhD munkám elkészítésében segítségemre voltak:

- programvezetőmnek, Prof. Dr. Tulassay Zsolt egyetemi tanárnak, akadémikusnak, a II. sz. Belgyógyászati Klinika volt és jelenlegi igazgatójának, Prof. Dr. Rácz Károly egyetemi tanárnak, akadémikusnak, Prof. Dr. Tóth Miklós egyetemi tanárnak, akadémikusnak, hogy segítettek és támogattak munkámban a Semmelweis Egyetem II. sz. Belgyógyászati Klinikáján
- témavezetőmnek, Dr. Molnár Bélának, hogy irányítása alatt rengeteg tapasztalatot szerezhettem és egy nemzetközi szinten is korszerűen felszerelt laboratóriumban dolgozhattam
- Dr. Múzes Györgyi tanárnőnek a konzulensi munkája során nyújtott segítségéért
- Dr. Müllner Katalin és Dr. Nagy Géza házi opponenseimnek Phd dolgozatom házi bírálatának elkészítéséért;
- Dr. Spisák Sándornak a kísérletek tervezése és kivitelezése során nyújtott elengedhetetlen segítségéért
- Dr. Valcz Gábornak, Dr. Sipos Ferencnek, Kalmár Alexandrának és Dr. Krenács Tibornak vizsgálataimban nyújtott elengedhetetlen segítségükért;
- Udvardyné Dr. Galamb Orsolyának szakmai segítségéért és tanácsaiért
- Dr. Wichmann Barnabásnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségéért
- Dr. Tóth Kingának, Dr. Constantinovits Miklósnak, Barták Barbara Kingának, Nagy Zsófia Brigittának, Dr. Patai Árpádnak, Balla Péternek, Dr. Péterfia Bálintnak, Dr. Hollósi Péternek és Dr. Schöller Andreának a laboratóriumi munkában nyújtott segítségükért

- Kónyáné Farkas Gabriella, Csorba Gézőné és Tóth Bernadett asszisztenseknek és a Sejtanalitika Laboratórium többi dolgozója számára
- a Semmelweis Egyetem, II. sz. Belgyógyászati Klinika Endoszkópiájának személyzete részére, akik nélkül a klinikai minták gyűjtése nem valósulhatott volna meg
- Berczik Máriának az adminisztratív feladat megoldásában nyújtott segítségéért, barátságáért és biztatásáért
- Családomnak és barátaimnak PhD munkám során nyújtott támogatásukért

13. FÜGGELÉK

1.TÁBLÁZAT a 16. ábra szerint: A HT-29 sejtekben tumor szöveti DNS kezelés hatására azonosított $p \leq 0,05$, $\log FC \geq 1$ kritériumrendszernek megfeleltetett expressziós változást mutató gének listája (‘---’ nem annotált Probe set azonosító)

Probe Set azonosító	Génszimbólum	Génnev	Expressziós különbség Tumor DNS kezelt vs Kontroll FC
225207_at	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	3,94
212859_x_at	LOC100505584 /// MT1E	metallothionein-2-like /// metallothionein 1E	3,56
225239_at	LOC100653017 /// MIR612 /// NEAT1	uncharacterized LOC100653017 /// microRNA 612 /// nuclear paraspeckle assembly transcript 1	2,50
204326_x_at	MT1X	metallothionein 1X	2,38
208581_x_at	MT1X	metallothionein 1X	2,17
212185_x_at	MT2A	metallothionein 2A	2,08
206461_x_at	MT1H	metallothionein 1H	1,83
205552_s_at	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	1,73
1558378_a_at	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	1,68
212907_at	SLC30A1	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	1,62
207275_s_at	ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	1,59
201625_s_at	INSIG1	insulin induced gene 1	1,59
205660_at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	1,54
213629_x_at	MT1F	metallothionein 1F	1,54
230765_at	KIAA1239	KIAA1239	1,53
202286_s_at	TACSTD2	tumor-associated calcium signal transducer 2	1,49
39248_at	AQP3	aquaporin 3 (Gill blood group)	1,48
211456_x_at	MT1P2	metallothionein 1 pseudogene 2	1,47

202869_at	OAS1	2'-5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	1,44
227443_at	LURAP1L	leucine rich adaptor protein 1-like	1,35
222858_s_at	DAPP1	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	1,32
201963_at	ACSL1	acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	1,32
39249_at	AQP3	aquaporin 3 (Gill blood group)	1,28
212992_at	AHNAK2	AHNAK nucleoprotein 2	1,27
222859_s_at	DAPP1	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides	1,26
222209_s_at	TMEM135	transmembrane protein 135	1,20
201626_at	INSIG1	insulin induced gene 1	1,20
225929_s_at	RNF213	ring finger protein 213	1,20
235937_at	OCLN	occludin	1,19
210797_s_at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	1,19
219681_s_at	RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)	1,18
225931_s_at	RNF213	ring finger protein 213	1,18
228707_at	CLDN23	claudin 23	1,17
223541_at	HAS3	hyaluronan synthase 3	1,17
200710_at	ACADVL	acyl-CoA dehydrogenase, very long chain	1,16
219181_at	LIPG	lipase, endothelial	1,16
1553055_a_at	SLFN5	schlafen family member 5	1,15
212657_s_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	1,15
214135_at	CLDN18	claudin 18	1,14
201170_s_at	BHLHE40	basic helix-loop-helix family, member e40	1,13
228181_at	SLC30A1	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	1,12
212345_s_at	CREB3L2	cAMP responsive element binding protein 3-like 2	1,11
1557078_at	SLFN5	schlafen family member 5	1,10
225177_at	RAB11FIP1	RAB11 family interacting protein 1 (class I)	1,09
201884_at	CEACAM5	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5	1,08
217967_s_at	FAM129A	family with sequence similarity 129, member A	1,06
218833_at	ZAK	sterile alpha motif and leucine zipper containing kinase AZK	1,06

217966_s_at	FAM129A	family with sequence similarity 129, member A	1,05
232151_at	MACC1	metastasis associated in colon cancer 1	1,03
37152_at	PPARD	peroxisome proliferator-activated receptor delta	1,03
224826_at	GPCPD1	glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1 homolog (S. cerevisiae)	1,03
1566766_a_at	MACC1	metastasis associated in colon cancer 1	1,03
227622_at	PCF11	PCF11, cleavage and polyadenylation factor subunit, homolog (S. cerevisiae)	1,02
231735_s_at	MALAT1	metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1 (non-protein coding)	1,01
231022_at	OCLN	occludin	1,01
229441_at	PRSS23	protease, serine, 23	-1,00
218687_s_at	MUC13	mucin 13, cell surface associated	-1,01
206755_at	CYP2B6	cytochrome P450, family 2, subfamily B, polypeptide 6	-1,01
219056_at	RNASEH2B	ribonuclease H2, subunit B	-1,01
204731_at	TGFR3	transforming growth factor, beta receptor III	-1,01
203509_at	SORL1	sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats containing	-1,01
201288_at	ARHGDI3	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	-1,01
220311_at	N6AMT1	N-6 adenine-specific DNA methyltransferase 1 (putative)	-1,02
218872_at	TESC	tescalcin	-1,03
201904_s_at	CTDSPL	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like	-1,03
212256_at	GALNT10	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 10 (GalNAc-T10)	-1,03
1558487_a_at	TMED4	transmembrane emp24 protein transport domain containing 4	-1,04
202458_at	PRSS23	protease, serine, 23	-1,04
223447_at	REG4	regenerating islet-derived family, member 4	-1,05
202388_at	RGS2	regulator of G-protein signaling 2, 24kDa	-1,05

224361_s_at	IL17RB	interleukin 17 receptor B	-1,06
226986_at	WIP12	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 2	-1,06
204378_at	BCAS1	breast carcinoma amplified sequence 1	-1,08
240856_at	O3FAR1	omega-3 fatty acid receptor 1	-1,08
201566_x_at	ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	-1,08
214414_x_at	HBA1 /// HBA2	hemoglobin, alpha 1 /// hemoglobin, alpha 2	-1,09
219316_s_at	FLVCR2	feline leukemia virus subgroup C cellular receptor family, member 2	-1,10
227647_at	KCNE3	potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	-1,11
1552365_at	SCIN	scinderin	-1,11
228221_at	SLC44A3	solute carrier family 44, member 3	-1,12
212560_at	SORL1	sortilin-related receptor, L(DLR class) A repeats containing	-1,12
202206_at	ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	-1,13
206155_at	ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	-1,16
209735_at	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	-1,16
204112_s_at	HNMT	histamine N-methyltransferase	-1,16
218995_s_at	EDN1	endothelin 1	-1,16
208955_at	DUT	deoxyuridine triphosphatase	-1,16
222802_at	EDN1	endothelin 1	-1,17
227051_at	---	---	-1,19
202207_at	ARL4C	ADP-ribosylation factor-like 4C	-1,19
209937_at	TM4SF4	transmembrane 4 L six family member 4	-1,20
227231_at	KIAA1211	KIAA1211	-1,23
201427_s_at	SEPP1	selenoprotein P, plasma, 1	-1,23
204602_at	DKK1	dickkopf 1 homolog (Xenopus laevis)	-1,25
224156_x_at	IL17RB	interleukin 17 receptor B	-1,26
203323_at	CAV2	caveolin 2	-1,30
1554436_a_at	REG4	regenerating islet-derived family, member 4	-1,32
239680_at	WDR76	WD repeat domain 76	-1,33
221305_s_at	UGT1A8 /// UGT1A9	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A8 /// UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A9	-1,33
226279_at	PRSS23	protease, serine, 23	-1,41

237411_at	ADAMTS6	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 6	-1,46
212097_at	CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	-1,47
234219_at	---	---	-1,49
208170_s_at	TRIM31	tripartite motif containing 31	-1,50
203065_s_at	CAV1	caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	-1,56
209101_at	CTGF	connective tissue growth factor	-1,58
231154_x_at	TINAG	tubulointerstitial nephritis antigen	-1,59
201506_at	LOC100652886 /// LOC100653157 /// TGFBI	uncharacterized LOC100652886 /// uncharacterized LOC100653157 /// transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	-1,65
211919_s_at	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	-1,67
200762_at	DPYSL2	dihydropyrimidinase-like 2	-1,69
201906_s_at	CTDSPL	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase-like	-1,73
229777_at	CLRN3	clarin 3	-1,77
206785_s_at	KLRC1 /// KLRC2	killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 1 /// killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 2	-1,77
225295_at	SLC39A10	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	-1,94
238984_at	REG4	regenerating islet-derived family, member 4	-1,98
223509_at	CLDN2	claudin 2	-1,99
204818_at	HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	-2,12
213880_at	LGR5	leucine-rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	-4,12

2.TÁBLÁZAT a 16. ábra szerint: A HT-29 sejtekben egészséges szöveti DNS kezelés hatására azonosított $p \leq 0,05$, $\log FC \geq 1$ kritériumrendszernek megfeleltetett expressziós változást mutató gének listája

Probe Set azonosító	Génszimbólum	Génnév	Expressziós különbség Egészséges DNS
---------------------	--------------	--------	---

			kezelt vs Kontroll FC
212859_x_at	LOC10050558 4 /// MT1E	metallothionein-2-like /// metallothionein 1E	3,96
204326_x_at	MT1X	metallothionein 1X	2,62
225207_at	PDK4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	2,59
212185_x_at	MT2A	metallothionein 2A	2,57
208581_x_at	MT1X	metallothionein 1X	2,49
241681_at	---	---	2,21
206461_x_at	MT1H	metallothionein 1H	2,10
227062_at	LOC10065301 7 /// MIR612 /// NEAT1	uncharacterized LOC100653017 /// microRNA 612 /// nuclear paraspeckle assembly transcript 1	2,08
232174_at	---	---	1,96
212907_at	SLC30A1	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	1,87
234989_at	LOC10065301 7 /// MIR612 /// NEAT1	uncharacterized LOC100653017 /// microRNA 612 /// nuclear paraspeckle assembly transcript 1	1,81

213629_x_at	MT1F	metallothionein 1F	1,79
232541_at	---	---	1,77
211456_x_at	MT1P2	metallothionein 1 pseudogene 2	1,66
201294_s_at	WSB1	WD repeat and SOCS box containing 1	1,60
238558_at	---	---	1,60
241060_x_at	---	---	1,59
235879_at	---	---	1,56
225239_at	LOC100653017 /// MIR612 /// NEAT1	uncharacterized LOC100653017 /// microRNA 612 /// nuclear paraspeckle assembly transcript 1	1,56
204745_x_at	MT1G	metallothionein 1G	1,51
228181_at	SLC30A1	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 1	1,50
231199_at	---	---	1,43
232406_at	---	---	1,23
214132_at	ATP5C1	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	1,20

1558710_at	---	---	1,17
235757_at	---	---	1,16
39248_at	AQP3	aquaporin 3 (Gill blood group)	1,16
235138_at	---	---	1,15
215123_at	61E3.4 /// LOC10013224 7 /// LOC10065299 2 /// LOC613037 /// LOC728888 /// NPIPL3	nuclear pore complex interacting protein-like /// nuclear pore complex interacting protein related gene /// uncharacterized LOC100652992 /// nuclear pore complex interacting protein pseudogene /// nuclear pore complex-interacting protein-like 3-like /// nuclear pore complex interacting protein-like 3	1,13
223541_at	HAS3	hyaluronan synthase 3	1,13
236000_s_at	---	---	1,12
206548_at	---	---	1,11
228105_at	---	---	1,08
240146_at	---	---	1,06
210282_at	ZMYM2	zinc finger, MYM-type 2	1,05

227576_at	---	---	1,04
204112_s_at	HNMT	histamine N-methyltransferase	-1,01
203323_at	CAV2	caveolin 2	-1,04
204818_at	HSD17B2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2	-1,06
229441_at	PRSS23	protease, serine, 23	-1,06
204663_at	ME3	malic enzyme 3, NADP(+)- dependent, mitochondrial	-1,07
219056_at	RNASEH2B	ribonuclease H2, subunit B	-1,10
226279_at	PRSS23	protease, serine, 23	-1,19
225295_at	SLC39A10	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 10	-1,36

3.TÁBLÁZAT a 23. ábra szerint: A PBMC sejtekben egészséges szöveti DNS kezelés hatására azonosított $p \leq 0,05$, $\log FC \geq 0.75$ kritériumrendszernek megfeleltetett expressziós változást mutató gének listája

Probe Set azonosító	Génszimbólum	Génnév	Expressziós különbség Egészséges DNS kezelt vs Kontroll FC
209355_s_at	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type	2,92

		2B	
212230_at	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	2,12
212226_s_at	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	1,87
217546_at	MT1M	metallothionein 1M	1,72
1554018_at	GPNMB	glycoprotein (transmembrane) nmb	1,71
1553706_at	HTRA4	HtrA serine peptidase 4	1,66
204840_s_at	EEA1	early endosome antigen 1	1,48
204745_x_at	MT1G	metallothionein 1G	1,40
212859_x_at	MT1E	metallothionein 1E	1,39
213638_at	PHACTR1	phosphatase and actin regulator 1	1,36
216336_x_at	MT1E	metallothionein 1E	1,26
213629_x_at	MT1F	metallothionein 1F	1,20
206461_x_at	MT1H	metallothionein 1H	1,19

230170_at	OSM	oncostatin M	1,18
217165_x_at	MT1F	metallothionein 1F	1,08
209959_at	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	1,00
208581_x_at	MT1X	metallothionein 1X	0,99
211456_x_at	MT1HL1	metallothionein 1H-like 1	0,97
209571_at	CIR1	corepressor interacting with RBPJ, 1	0,97
204211_x_at	EIF2AK2	eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2	0,94
225922_at	FNIP2	folliculin interacting protein 2	0,94
1558692_at	C1orf85	chromosome 1 open reading frame 85	0,94
224797_at	ARRDC3	arrestin domain containing 3	0,86
222173_s_at	TBC1D2	TBC1 domain family, member 2	0,83
231835_at	FAM213B	family with sequence similarity 213, member B	0,83
226460_at	FNIP2	folliculin interacting protein 2	0,82

225924_at	FNIP2	folliculin interacting protein 2	0,82
208087_s_at	ZBP1	Z-DNA binding protein 1	0,81
210524_x_at	---	---	0,79
206907_at	TNFSF9	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9	0,79
219874_at	SLC12A8	solute carrier family 12, member 8	0,77
205888_s_at	JAKMIP2	janus kinase and microtubule interacting protein 2	0,76
244523_at	MMD	monocyte to macrophage differentiation-associated	-0,73
231823_s_at	SH3PXD2B	SH3 and PX domains 2B	-0,76
1556314_at	RP11-389C8.2	---	-0,76
219506_at	C1orf54	chromosome 1 open reading frame 54	-0,77
227015_at	ASPHD2	aspartate beta-hydroxylase domain containing 2	-0,78
236646_at	TMEM52B	transmembrane protein 52B	-0,82
209729_at	GAS2L1	growth arrest-specific 2 like 1	-0,83

213566_at	RNASE6	ribonuclease, RNase A family, k6	-0,84
203485_at	RTN1	reticulon 1	-0,85
228918_at	SLC43A2	solute carrier family 43 (amino acid system L transporter), member 2	-0,85
214269_at	MFSD7	major facilitator superfamily domain containing 7	-0,96
211429_s_at	SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	-1,00
210222_s_at	RTN1	reticulon 1	-1,00
210118_s_at	IL1A	interleukin 1, alpha	-1,01
206765_at	KCNJ2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	-1,24
207075_at	NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3	-1,28
231513_at	---	---	-1,29

4.TÁBLÁZAT 24. ábra szerint: A PBMC sejtekben tumor szöveti DNS kezelés hatására azonosított $p \leq 0,05$, $\log FC \geq 0.75$ kritériumrendszernek megfeleltetett expressziós változást mutató gének listája

Probe	Set	Génszimbólum	Génnév	Expressziós
-------	-----	--------------	--------	-------------

azonosító			különbség Tumor szöveti DNS kezelt vs Kontroll FC
212226_s_a t	PPAP2B	phosphatidic acid phosphatase type 2B	1,08
228108_at	PPM1L	protein phosphatase, Mg ²⁺ /Mn ²⁺ dependent, 1L	0,99
241773_at	---	---	0,88
226267_at	JDP2	Jun dimerization protein 2	0,85
230183_at	EXT1	exostosin glycosyltransferase 1	0,78
244187_at	---	---	-0,77
214007_s_a t	TWF1	twinfilin actin-binding protein 1	-0,79
229128_s_a t	ANP32E	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E	-0,84
1554333_at	DNAJA4	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	-0,90
202627_s_a t	SERPINE1	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	-0,95

204580_at	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	-1,12
214279_s_a	NDRG2	NDRG family member 2	-2,10

5.TÁBLÁZAT a 27. ábra szerint: A PBMC sejtekben egészséges szöveti DNS és LPS együttes kezelés hatására azonosított $p \leq 0,05$, $\log FC \geq 0.75$ kritériumrendszernek megfeleltetett expressziós változást mutató gének listája az LPS kontroll csoporthoz viszonyítva

Probe Set azonosító	Génszimbólum	Génnév	Expressziós különbség LPS és Tumor szöveti DNS kezelt vs LPS kontroll FC
207442_at	CSF3	colony stimulating factor 3 (granulocyte)	1,47
1565762_at	---	---	1,23
239673_at	---	---	1,23
239861_at	---	---	1,06
206569_at	IL24	interleukin 24	1,03
230446_at	LOC101927811	uncharacterized LOC101927811	1,02
217546_at	MT1M	metallothionein 1M	1,02

242457_at	---	---	1,01
1558732_at	MAP4K4	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4	0,96
235925_at	---	---	0,95
231455_at	LINC00487	long intergenic non-protein coding RNA 487	0,89
207840_at	CD160	CD160 molecule	0,86
1556657_at	---	---	0,85
237001_at	---	---	0,83
237310_at	---	---	0,82
243810_at	---	---	0,80
243280_at	---	---	0,78
241413_at	---	---	0,78
229141_at	SFT2D3 /// WDR33	SFT2 domain containing 3 /// WD repeat domain 33	0,78
1555872_a_ at	GLIDR /// LOC728903	glioblastoma down-regulated RNA /// uncharacterized LOC728903	0,78
232180_at	UGP2	UDP-glucose	0,77

		pyrophosphorylase 2	
207156_at	HIST1H2AG /// HIST1H2AH /// HIST1H2AI /// HIST1H2AK /// HIST1H2AL /// HIST1H2AM	histone cluster 1, H2ag /// histone cluster 1, H2ah /// histone cluster 1, H2ai /// histone cluster 1, H2ak /// histone cluster 1, H2al /// histone cluster 1, H2am	0,76
214181_x_at	LST1	leukocyte specific transcript 1	-0,76
204112_s_at	HNMT	histamine N-methyltransferase	-0,76
206120_at	CD33	CD33 molecule	-0,76
201888_s_at	IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	-0,76
239196_at	ANKRD22	ankyrin repeat domain 22	-0,76
224225_s_at	ETV7	ets variant 7	-0,77
208407_s_at	CTNND1 /// TMX2-CTNND1	catenin (cadherin-associated protein), delta 1 /// TMX2-CTNND1 readthrough (NMD candidate)	-0,77
219806_s_at	SMCO4	single-pass membrane protein with coiled-coil domains 4	-0,77

204204_at	SLC31A2	solute carrier family 31 (copper transporter), member 2	-0,78
210145_at	PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)	-0,78
229584_at	LRRK2	leucine-rich repeat kinase 2	-0,78
219895_at	TMEM255A	transmembrane protein 255A	-0,78
218451_at	CDCP1	CUB domain containing protein 1	-0,79
210660_at	LILRA1	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 1	-0,79
212763_at	CAMSAP2	calmodulin regulated spectrin-associated protein family, member 2	-0,79
213537_at	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	-0,80
225045_at	CCDC88A	coiled-coil domain containing 88A	-0,80
208161_s_a t	ABCC3	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 3	-0,80
204619_s_a	VCAN	versican	-0,80

t			
221266_s_a t	DCSTAMP	dendrocyte expressed seven transmembrane protein	-0,81
243894_at	SLC41A2	solute carrier family 41 (magnesium transporter), member 2	-0,81
210889_s_a t	FCGR2B	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	-0,81
238452_at	FCRLB	Fc receptor-like B	-0,81
221698_s_a t	CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	-0,82
222217_s_a t	SLC27A3	solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 3	-0,82
226436_at	RASSF4	Ras association (RalGDS/AF- 6) domain family member 4	-0,82
213566_at	RNASE6	ribonuclease, RNase A family, k6	-0,83
223798_at	SLC41A2	solute carrier family 41 (magnesium transporter), member 2	-0,83
1568619_s_ at	ITPRIPL2	inositol 1,4,5-trisphosphate receptor interacting protein-like	-0,83

		2	
225603_s_a t	TRIQQ	triple QxxK/R motif containing	-0,84
1554406_a_ at	CLEC7A	C-type lectin domain family 7, member A	-0,84
229968_at	---	---	-0,84
221211_s_a t	MAP3K7CL	MAP3K7 C-terminal like	-0,84
1555021_a_ at	SCARF1	scavenger receptor class F, member 1	-0,85
1568638_a_ at	IDO2	indoleamine 2,3-dioxygenase 2	-0,85
223454_at	CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	-0,86
212741_at	MAOA	monoamine oxidase A	-0,86
212192_at	KCTD12	potassium channel tetramerization domain containing 12	-0,86
205174_s_a t	QPCT	glutaminy-peptide cyclotransferase	-0,86
215049_x_a	CD163	CD163 molecule	-0,86

t			
1555349_a_at	ITGB2	integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)	-0,86
229391_s_at	FAM26F	family with sequence similarity 26, member F	-0,86
204761_at	USP6NL /// USP6NL-IT1	USP6 N-terminal like /// USP6NL intronic transcript 1 (non-protein coding)	-0,86
212188_at	KCTD12	potassium channel tetramerization domain containing 12	-0,87
205676_at	CYP27B1	cytochrome P450, family 27, subfamily B, polypeptide 1	-0,87
201798_s_at	MYOF	myoferlin	-0,88
219574_at	MARCH1	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1, E3 ubiquitin protein ligase	-0,89
201647_s_at	SCARB2	scavenger receptor class B, member 2	-0,90
205715_at	BST1	bone marrow stromal cell antigen 1	-0,91

215078_at	LOC100129518 /// SOD2	uncharacterized LOC100129518 /// superoxide dismutase 2, mitochondrial	-0,91
216950_s_a t	FCGR1A /// FCGR1B /// FCGR1C	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor (CD64) /// Fc fragment of IgG, high affinity Ib, receptor (CD64) /// Fc fragment of IgG, high affinity Ic, receptor (CD64), pseudogene	-0,92
220187_at	STEAP4	STEAP family member 4	-0,92
214511_x_a t	FCGR1B	Fc fragment of IgG, high affinity Ib, receptor (CD64)	-0,92
210772_at	FPR2	formyl peptide receptor 2	-0,92
213095_x_a t	AIF1	allograft inflammatory factor 1	-0,93
207533_at	CCL1	chemokine (C-C motif) ligand 1	-0,93
1556314_a_ at	RP11-389C8.2	---	-0,94
203167_at	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	-0,94

204836_at	GLDC	glycine dehydrogenase (decarboxylating)	-0,94
210072_at	CCL19	chemokine (C-C motif) ligand 19	-0,94
225987_at	STEAP4	STEAP family member 4	-0,94
206978_at	CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2	-0,96
44673_at	SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	-0,98
201042_at	TGM2	transglutaminase 2	-0,99
223939_at	SUCNR1	succinate receptor 1	-0,99
202953_at	C1QB	complement component 1, q subcomponent, B chain	-0,99
204036_at	LPAR1	lysophosphatidic acid receptor 1	-0,99
41644_at	SASH1	SAM and SH3 domain containing 1	-1,00
206488_s_a t	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	-1,00
206765_at	KCNJ2	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member	-1,01

		2	
209615_s_at	PAK1	p21 protein (Cdc42/Rac)- activated kinase 1	-1,01
231513_at	---	---	-1,01
221724_s_at	CLEC4A	C-type lectin domain family 4, member A	-1,02
222866_s_at	FLVCR2	feline leukemia virus subgroup C cellular receptor family, member 2	-1,02
240287_at	IRG1	immunoresponsive 1 homolog (mouse)	-1,03
1552773_at	CLEC4D	C-type lectin domain family 4, member D	-1,05
206022_at	NDP	Norrie disease (pseudoglioma)	-1,06
218454_at	PLBD1	phospholipase B domain containing 1	-1,06
228450_at	PLEKHA7	pleckstrin homology domain containing, family A member 7	-1,07
203104_at	CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor	-1,07
201506_at	TGFBI	transforming growth factor,	-1,08

		beta-induced, 68kDa	
209392_at	ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	-1,09
203915_at	CXCL9	chemokine (C-X-C motif) ligand 9	-1,09
211864_s_at	MYOF	myoferlin	-1,10
213624_at	SMPDL3A	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3A	-1,10
230422_at	FPR3	formyl peptide receptor 3	-1,12
1552807_at	SIGLEC10	sialic acid binding Ig-like lectin 10	-1,12
221541_at	CRISPLD2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2	-1,13
232068_s_at	TLR4	toll-like receptor 4	-1,13
222833_at	LPCAT2	lysophosphatidylcholine acyltransferase 2	-1,14
204580_at	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	-1,16

205404_at	HSD11B1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	-1,20
203485_at	RTN1	reticulon 1	-1,21
227265_at	FGL2	fibrinogen-like 2	-1,21
214146_s_a t	PPBP	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)	-1,21
226804_at	FAM20A	family with sequence similarity 20, member A	-1,24
210119_at	KCNJ15	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 15	-1,25
225353_s_a t	C1QC	complement component 1, q subcomponent, C chain	-1,28
205237_at	FCN1	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	-1,31
206407_s_a t	CCL13	chemokine (C-C motif) ligand 13	-1,37
210222_s_a t	RTN1	reticulon 1	-1,40
235385_at	MARCH1	membrane-associated ring finger (C3HC4) 1, E3 ubiquitin	-1,44

		protein ligase	
210839_s_at	ENPP2	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2	-1,44
214455_at	HIST1H2BC /// HIST1H2BE /// HIST1H2BF /// HIST1H2BG /// HIST1H2BI	histone cluster 1, H2bc /// histone cluster 1, H2be /// histone cluster 1, H2bf /// histone cluster 1, H2bg /// histone cluster 1, H2bi	-1,44
204834_at	FGL2	fibrinogen-like 2	-1,47
58780_s_at	ARHGEF40	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 40	-1,58
206336_at	CXCL6	chemokine (C-X-C motif) ligand 6	-1,64

6.TÁBLÁZAT a 28. ábra szerint: A PBMC sejtekben tumor szöveti DNS és LPS együttes kezelés hatására azonosított $p \leq 0,05$, $\log FC \geq 0.75$ kritériumrendszernek megfeleltetett expressziós változást mutató gének listája az LPS kontroll csoporthoz viszonyítva

Probe Set azonosító	Génszimbólu m	Génnév	Expressziós különbség LPS és Tumor szöveti DNS kezelt vs LPS Kontroll FC
206569_at	IL24	interleukin 24	1,45
209278_s_at	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	1,09
202878_s_at	CD93	CD93 molecule	1,06
208791_at	CLU	clusterin	1,01
224835_at	GPCPD1	glycerophosphocholine phosphodiesterase GDE1 homolog (S. cerevisiae)	0,87
244786_at	SCARNA13 /// SNHG10	small Cajal body-specific RNA 13 /// small nucleolar RNA host gene 10 (non-protein coding)	0,86
226498_at	FLT1	fms-related tyrosine kinase 1	0,81
207840_at	CD160	CD160 molecule	0,81
206115_at	EGR3	early growth response 3	0,78

209277_at	TFPI2	tissue factor pathway inhibitor 2	0,76
206120_at	CD33	CD33 molecule	-0,79
230559_x_at	FGD4	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 4	-0,83
204580_at	MMP12	matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase)	-0,84
239438_at	RAPGEF6	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	-0,84
225603_s_at	TRIQQ	triple QxxK/R motif containing	-0,84
1570541_s_at	GBP1P1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible pseudogene 1	-0,87
236191_at	---	---	-0,92
1569583_at	EREG	epiregulin	-0,99
205404_at	HSD11B1	hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 1	-1,06
210222_s_at	RTN1	reticulon 1	-1,06
210390_s_at	CCL15 CCL15- CCL14	chemokine (C-C motif) ligand 15 CCL15-CCL14 readthrough (NMD candidate)	-1,64

