

Humán szövetspecifikus DNS-szekvenciák hatása sejtkultúra modellekben

Doktori tézisek

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

1. Bevezetés

A szabad DNS felfedezése

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

A sejten kívüli DNS, mint szabályozó molekula

A keringő szabad DNS származhat apoptotikus/nekrotikus tumorsejtekből, de az élő sejtek is bocsátanak ki cf-DNA-t a sejten kívüli térbe. A tumorszövet eredetű cf-DNA kimutatható a plazma frakcióban és a szérumban is, és biomarkerként szolgálhat a daganatos betegségek diagnosztizálásában. A cf-DNA számos daganat-specifikus mintázatot hordozhat, beleértve a mutáns onkogéneket, tumorszuppresszor géneket, az aberráns mikroszatellitákat és kromoszomális DNS-t, valamint az egészségestől eltérő, daganat-specifikus metilációs mintázatot. A legújabb vizsgálatok megerősítették a tumorsejtekből származó DNS szakaszok recipiens sejtek intracelluláris terébe történő felvételét. Ezek a tumor-specifikus DNS motívumok szerepet játszhatnak a recipiens sejtekben jelátviteli utak aktiválásában (pl. MAPK és Akt jelátviteli útvonalak) és ezáltal fokozott sejtnövekedést és sejt morfológiai átalakulást is okozhatnak. Számos tanulmány szerint a tumor eredetű DNS fragmentumok (21-500 bázis hosszúságú DNS molekulák) szerepet játszanak a tumor kialakulását és terjedését támogató mikroörményzet létrejöttében és fenntartásában, azaz elősegítik a tumor invázióját, valamint a tumor-specifikus immunválaszt elkerülését.

A tumorprogresszió során felszabaduló DNS hatása legjobb ismereteink szerint eddig nem került leírásra.

A TLR9 szerepe a daganatprogresszióban

A szakirodalom szerint legjobban ismert DNS érzékelő receptor a Toll-like receptor 9 (TLR9), amely endogén illetve exogén eredetű nem-metilált DNS szakaszokat ismer fel. A globális hipometiláció a daganatokban - többek között a kolorektális daganatban is - jól ismert jelenség, ami a daganatsejtek genomjából származó hipo- és hipermetilált DNS szakaszok génexpresszióra gyakorolt eltérő hatását feltételezi. A TLR9 receptor fokozott expresszióját számos tumortípusban (pl. prosztatata, nyelőcső- és méhnyakrák) kimutatták, és erős kifejeződését fokozott invazivitással társították.

2. Célkitűzések

PhD munkám vizsgálati céljai

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

2. Módszerek

HT-29 sejt kultúra

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 (Simmelweis Egyetem) patogénmentes, steril szövettenyésztő laboratóriumban 37 °C hőmérsékleten, 5% CO₂ és 95% páratartalom mellett tartottuk fenn.

DNS izolálás HT-29 sejt kultúrából

A DNS kezelésekhez használt genomiális DNS-t ~5 x 10⁷ HT-29 sejtéből 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-xel (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 HT-29 sejt kultúrából kinyert DNS szekvenciák mesterséges metilációja és fragmentációja

A HT-29 sejt vonalból 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) bázisára egy metil csoportot helyez a kettősszálú DNS 5'...CG...3' CpG dinukleotidjain.

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 (Simmelweis Egyetem) biztosította. A vastagbél daganatban szenvedő betegek definitív szövettani diagnózissal rendelkeztek (Dukes B és C stádium) és nem részesültek operáció előtti

kemo- illetve radioterápiában. A DNS izolációt a High Pure PCR Template Preparation Kit-tel (Roche, Németország) végeztük el a gyártó előírása szerint. 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.

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

Genomiális DNS-t izoláltunk HT-29, SW480, Caco2 vastagbél karcinóma sejt kultúrákból és a műtétilag eltávolított egészséges és tumoros vastagbél szövetből. Az izolált DNS-ekből 100 ng 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 minták 5-mC százalékos értékeit ELISA lemezolvasón a pozitív és negatív kontroll minták értékeiből 450 nm-en mért abszorbanciából felállított standard számoltuk ki.

A DNS szekvenciákkal elvégzett kezelések módszertana

DNS szekvenciákkal történt kezeléseink során 15 µl szerkezetileg módosított, illetve egészséges és tumorszövetből izolált DNS-t használtunk, amelyeket külön-külön 200 µl steril pufferolt foszfát sóoldatban (PBS) oldottunk fel. A kontroll mintákat 200 µl steril PBS-sel kezeltük. Microarray vizsgálataink során 24 órás kezelést alkalmaztunk, míg sejtviabilitási vizsgálataink során 72 órás kezeléseket után végeztük el további vizsgálatainkat.

TLR9 jelátviteli útvonal vizsgálata qRT-PCR-rel

A TLR9 jelátviteli útvonal génjeire és az interleukin 8 (IL-8) citokint kódoló génre a Primer3 primertervező programmal terveztünk primereket. A NanoDrop 1000 spektrofotométerrel történt mennyiségi meghatározás után kapilláris gélelektroforézis módszerrel minőségi ellenőrzést végeztünk az izolált RNS mintákon (Bioanalyzer Pico 6000 RNS chip). A RIN (RNS integritási szám) egy a legintaktabb (10) mintától a legtöredezettebbig (1) felállított skála, amelyet a

BioAnalyzer készülék programjának algoritmus a 18S és 28S riboszómális RNS-ek alapján határoz meg. A továbbiakban csak 8-nál nagyobb mutatójú (RIN>8) rendelkező RNS mintákat használtuk a komplementer DNS-re (cDNS-re) történő átíráshoz és az RT-PCR vizsgálathoz. 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 RT-PCR-t LightCycler 480 q RT-PCR készüléken (Roche, Svájc), Probes Master (Roche GmbH, Németország) reagens és SYBR Green (Roche GmbH, Németország) zöld interkalálódó festék segítségével végeztük el.

A cél gének expresszióját a GAPDH referencia gén expressziójához viszonyítottuk és expressziós különbségeket a $2^{-\text{ddCt}}$ módszerrel számoltuk ki. Statisztikai elemzéseink során eredményeinket a Student-féle kétmintás t-próbával értékeltük ki.

Teljes genom mRNS expressziós array vizsgálatok

Az egészséges és tumor szöveti DNS-sel kezelt HT-29 kolorektális karcinóma sejtekből és egészséges önkéntesek perifériás vérének mononukleáris sejtjeiből microarray vizsgálatokat végeztünk. A statisztikai feldolgozás során elsőként előfeldolgozást alkalmaztunk, amely háttér korrekcióból, normalizációból és összegzésből állt. 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 eltérő génexpressziót mutató géneket tartalmazza.

Sejtviabilitási vizsgálatok

Sejtviabilitási vizsgálataink során 15 µg frissfagyasztott műtéti mintából kinyert tumor,-illetve egészséges vastagbéliszöveti DNS-t használtunk, amelyeket külön-külön 200 µl steril PBS-ben oldottunk fel. A kontroll mintákhoz 200 µl steril PBS-t adtunk hozzá. 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 a vizsgálat időpontjáig -20 °C-os hőmérsékleten tároltuk. Méréseinket három független párhuzamos sejt kultúra mintán végeztük el

Továbbiakban a HT-29 sejteken 72 órás viabilitási vizsgálatot végeztünk tripánkék festés alkalmazásával, 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.

Egészséges önkéntesek perifériás vérének mononukleáris sejtjein (PBMC) elvégzett kísérletek

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-eket 1100 percenkénti fordulatszámon 5 perc centrifugálással kétszer mostuk át steril PBS-ben.

A PBMC sejteken elvégzett LPS és DNS kezelések

1×10^6 PBMC-sejtet 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 hozzá. 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.

3. Eredmények

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

A nem metilált, nem fragmentált (nMnF) DNS-sel való kezelés a TLR9 gén szignifikáns felülexpresszióját eredményezte, ellentétben a MYD88 és TRAF6 génekkel, melyekben a kezelés csökkent génexpressziót okozott ($p \leq 0,05$).

A nem metilált, fragmentált (nMF) DNS szekvenciákkal történt kezelés a TLR9, MYD88 és TRAF6 gének növekvő expresszióját eredményezte ($p \leq 0,05$).

A metilált, nem-fragmentált (MnF) DNS szekvenciákkal történt kezelés az IRAK2, NFkB és az IL-8 gének fokozott expresszióját és a TRAF6 gén csökkenő expresszióját okozta ($p \leq 0,05$).

A metilált fragmentált (MF) DNS szekvenciákkal történt kezelés a MYD88, TRAF6 gének felülexpresszióját eredményezte, illetve az IRAK2, TNFSF10 és az IL-8 gének csökkent expresszióját váltotta ki ($p \leq 0,05$).

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

ELISA alapú 5-metilcitozin meghatározásunk során az 5-mC arány a DNS kezelésekhöz használt egészséges vastagbél-szövetekben 13,35%-nak adódott, míg a tumor szövetekben 8,35 %-os metiláltsági arányt mutattunk ki. A vastagbél-karcinóma sejtvonalakat nagyon alacsony metilációs arány jellemezte (1,54 %). Ezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a tumorszövetet általános hipometiláció jellemzi, az egészséges vastagbél-szövetben tapasztalt általános hipermetilációval szemben.

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

mRNS expressziós microarray eredmények

Az egészséges és tumor szöveti DNS kezelés hatására a metallotinén gének (MT1H, MT1P2, MT1X és MT2A) hasonló mértékű fokozott expresszióját figyeltük meg.

A tumorszöveti DNS kezelés hatására felülregulált gének közül kiemelendők az áttétképzéshez köthető gének, többek között a metasztázis-asszociált molekula 1 a vastagbél daganatokban (MACC1), 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); valamint a hírvivő molekulák génjei, mint a duál adaptor foszfortirozin és 3-foszfoinozitidek (DAPP1) és a cAMP hírvivő elem 3-szerű protein 2 (CREB3L2) is.

A TLR9 útvonal fő elemeinek vizsgálata egészséges és tumorszöveti DNS hatására qRT-PCR-rel HT-29 sejtekben

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 ($\log F_c \geq 1$; $p \leq 0,05$). A tumorszöveti DNS kezelés hatására az egészséges szöveti DNS kezeléssel összevetve magasabb IL-1 β szintet sikerült kimutatnunk.

A HT-29 sejteken elvégzett sejtviabilitási vizsgálatok eredményei

RNS expressziós eredményeink alátámasztására további kísérleteket végeztünk el a tumor és az egészséges szöveti DNS kezelés sejtviabilitásra és sejtosztódásra kifejtett hatásának a feltérképezésére. A PI (propidium jodid) sejtciklus analízis szignifikánsan magasabb élő (G1+S+G2+M) 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 $39,11 \pm 0,57\%$, a kontroll csoport élő sejtpopulációja $32,00 \pm 2,50\%$; $p \leq 0,05$). 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 festéssel vizsgáltuk meg, amelynek értékeit hemocitóméterben történt számlálás után statisztikailag elemeztünk. A tumor szöveti

DNS kezelés szignifikánsan magasabb élő sejtszámot eredményezett a kontroll csoporthoz képest (élő sejtek átlagos száma a tumor DNS kezelés hatására $54,22 \pm 3,03$, a kontroll csoportban $42,00 \pm 3,77 \times 10000$ sejt/ml; $p \leq 0,05$). Az egészséges szöveti DNS kezelés szignifikánsan alacsonyabb élő sejtszámot mutatott a PBS kezelt kontroll mintákkal történt összevetés során (átlagos sejtszám az egészséges szöveti DNS kezelés hatására $28,67 \pm 3,08$; a kontroll csoportban $42,00 \pm 3,77 \times 10\ 000$ sejt/ml; ($p \leq 0,05$).

A PBMC sejteken elvégzett mRNS expressziós microarray vizsgálatok eredményei

Az egészséges illetve tumor szöveti DNS kezelés hosszútávú (24 órás) hatásának a feltérképezésére az Affymetrix HGU 133 2.0 microarray rendszert használtuk. Az egészséges szöveti DNS-sel való kezelés 48 gén expressziójában míg a tumor szöveti DNS kezelés 12 génben okozott szignifikáns változást.

Az LPS-sel történt kezelés 1479 génben gén expressziójában 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 ($p \leq 0,05$).

4. Megbeszélés

A daganatszövet 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.

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.

ELISA alapú teljes genom 5-metilcitozin arány vizsgálattal továbbá kimutattuk az egészséges (hipermetilált-) és a tumor szöveti (hipometilált 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 gyulladáshoz vezető citokin (pl. IL-6), immunregulációért felelős gén (pl. IRG1), monocita marker (CD 163) és több kemokin (pl. CXCL1, CXCL5) mRNS-ének termelődését fokozta. Az egészséges szöveti DNS csökkentette az LPS kezelés által felülszabályozott érzékelő receptor (TLR4) és több kemokint kódoló gén (CXCL6, CXCL9 és CCL13) expresszióját. Eredményeink rámutatnak a PBMC sejteken található TLR-ek lehetséges antagonistá hatására.

5. Következtetések

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

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

A vastagbédaganatos betegekből izolált tumor (hipometilált) szöveti DNS fokozta az áttétképzéshez köthető gének, mint a metasztázis-asszociált molekula 1 a vastagbédaganatokban (MACC1) 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-foszfoinozítidek (DAPP1) és a cAMP hírvivő elem 3-szerű fehérje 2 (CREB3L2) mRNS expresszióját a HT-29 vastagbél karcinóma sejtekben, ami felveti a tumor szöveti DNS daganatprogressziót támogató hatását.

A vastagbédaganatos betegekből izolált szöveti (hipometilált) 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 (hipermetilált) 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.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció témájában nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Fűri 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**

Fűri 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**

Fűri 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**

Magyar folyóiratban megjelent közlemények

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

Az értekezetés témájához szorosan nem kapcsolódó, nemzetközi folyóiratban megjelent közlemények

Sipos F, Múzes G, **Fűri 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, **Fűri 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, **Fűri 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 ÁV, 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 ÁV, 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**

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 segítségével
- 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 segítségével
- Dr. Valcz Gábornak, Dr. Sipos Ferencnek, Kalmár Alexandrának és Dr. Krenács Tibornak vizsgálataimban nyújtott elengedhetetlen segítségükért;
- Udvardyné Dr. Galamb Orsolyának szakmai segítségével és tanácsaiért
- Dr. Wichmann Barnabásnak a statisztikai elemzésekben nyújtott segítségével;
- 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 Gézáné 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 segítségével, barátságáért és biztatásáért
- Családomnak és barátaimnak PhD munkám során nyújtott támogatásukért