

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**HUMÁN PAPILLOMAVÍRUS FERTŐZÉS HATÁSA AZ
EPIGENETIKAI ÉS JELÁTVITELI SZABÁLYOZÓ
FOLYAMATOKRA KERATINOCITÁKBAN**

Szalmás Anita

Témavezető: Dr. Kónya József



DEBRECENI EGYETEM

GYÓGYSZERÉSZETI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Debrecen, 2013

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
BEVEZETÉS	6
CÉLKITŰZÉSEK	8
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
A papillomavírusok általános jellemzése	9
A papillomavírus proteinek szerepe a vírus vegetatív életciklusában valamint a gazdasejt malignus fenotípusának kialakításában	10
A lokálisan termelődő IL-10 hatása a HPV fertőzés progressziójára a hámszövetben	16
Epigenetikai szabályozó mechanizmusok szerepe a génexpresszió szabályozásában	18
Az Src családba tartozó citoplazmatikus kinázok szerepe malignus folyamatokban	21
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	25
Anyagok	25
Módszerek	26
Primer sejtek, sejtvonalak és betegminták	26
RNS izolálás és RT-PCR	26
DNS izolálás és modifikálás nátrium-biszulfittal a metilációs mintázat vizsgálatához	27
Kromatin immunprecipitáció (ChIP)	29
Kvantitatív valós idejű PCR	30
Plazmid konstruktok	31
Plazmid konstruktok SssI metiláz kezelése	33
Metilációs kazetta assay	33
Tranziens transzfekció és luciferáz teszt	34
Fehérje izolálás	34
Western blot	35
Protein foszforiláció vizsgálata	35
Statisztikai analízis	36

EREDMÉNYEK	37
Az IL-10 expresszió epigenetikai gátlásának vizsgálata humán keratinocitákban és epiteliális sejtekben	37
Az IL-10 promoter CpG metilációs mintázatának és az IL-10 mRNS expresszió összefüggésének vizsgálata epiteliális illetve leukocita eredetű humán sejtekben	37
A proximális IL-10 promoter CpG metilációs mintázatának vizsgálata egészséges exfoliált cervikális epiteliális sejtekben és méhnyakrák eredetű szövetmintákban	39
IL-10 promoter szakaszok in vitro CpG metilációjának hatása a promoter expressziós aktivitására	40
Az IL-10 promoterhez társuló hiszton fehérjék acetilációs állapotának vizsgálata	43
HPV 16 onkoproteinek hatásának vizsgálata az Src családba tartozó kinázok expressziójára és aktivitására humán keratinocitákban	44
A HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok fehérje expressziójára	44
A HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok mRNS expressziójára	45
A HPV 16 E6 és E7 hatása az egyes Src kinázok foszforilációs állapotára	46
A keratinociták differenciálódásának a hatása az Src kinázok aktivitására HPV 16 onkoproteinek expresszálo sejtvonalakban	49
MEGBESZÉLÉS	52
ÖSSZEFOGLALÁS	59
SUMMARY	60
IRODALOMJEGYZÉK	61
TÁRGYSZAVAK	69
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	70
FÜGGELÉK	71
A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár által hitelesített publikációs lista.	71
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai.	71

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BSA	borjú szérum albumin (bovine serum albumin)
CBP	CREB (cAMP response element-binding protein) kötő fehérje
CDK	ciklin dependens kináz
ChIP	kromatin immunprecipitáció (chromatin immunoprecipitation)
CoA	koenzim-A
CpG	citozin-guanin dinukleotid
Csk	C-terminális kináz
DK-SFM	szérummentes keratinocita tápfolyadék (Defined Keratinocyte-Serum Free Medium)
DMEM	Dulbecco-féle módosított Eagle tápfolyadék (Dulbecco's modified Eagle's medium)
DNMT	DNS metiltranszferáz
DNS	dezoxiribonukleinsav
Ets1	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1
EDTA	etiléndiamin-tetraacetát
EGFR	epidermális növekedési faktor receptor (epidermal growth factor receptor)
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FAK	fokális adhézíós kináz
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GM-CSF	granulocita-makrofág kolónia stimuláló faktor (granulocyte macrophage - colony stimulating factor)
H3	hiszton 3
H4	hiszton 4
hADA3	élesztő “alteration/deficiency in activation” fehérje humán homológ
HDAC	hiszton deacetiláz
HFK	primer humán keratinocita (human foreskin keratinocyte)
HPV	human papillomavírus
HRP	torma peroxidáz (horseradish peroxidase)
Ig	immunglobulin
IL	interleukin
IFN	interferon
IRF	interferon reszponzív faktor
kb	kilobázis
kDa	kilodalton

LCR	long control region
mRNS	hírvivő (messenger) ribonukleinsav
mM	millimól
μ M	mikromól
NaF	nátrium-fluorid
Na ₃ VO ₄	nátrium-ortovanadát
NK sejt	természetes ölő (natural killer) sejt
ORF	nyitott olvasási keret (open reading frame)
PBMC	perifériás mononukleáris sejt (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	foszfát puffer (phosphate buffered saline)
PBST	foszfát puffer Tween-nel kiegészítve (phosphate-buffered saline–Tween)
PCR	polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)
PDGFR	vérlemezke eredetű növekedési faktor receptor (platelet-derived growth factor receptor)
pHKC	primer humán keratinocita
Rb	retinoblasztóma protein
rRNS	riboszómális ribonukleinsav
RT	reverz transzkripció
SDS	nátrium-dodecilszulfát (sodium dodecyl sulfate)
SH2	Src-homológia domén 2 (Src homology 2 domain)
SH3	Src-homológia domén 2 (Src homology 3 domain)
Sp1	Specificity Protein 1
Src	eukarióta szarkóma tirozin kináz (eukaryotic sarcoma tyrosine kinase)
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
TE	Tris-EDTA puffer
Th	helper T sejt
TNF	tumor nekrosis faktor
TNFR	tumor nekrosis faktor receptor
Treg	regulátor T sejt
U	egység (unit)
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)

BEVEZETÉS

A genitális traktus humán papillomavírus (HPV) fertőzése az egyik leggyakoribb szexuális úton terjedő betegség, és az utóbbi évtizedek kutatásai egyértelműen igazolták, hogy a magas onkogén kockázatú HPV típusok által okozott perzisztens fertőzés tekinthető a legfontosabb etiológiai faktornak a méhnyakrák és a méhnyak rákmegelőző állapotainak kialakulásában (zur Hausen, 1994; Bosch és mtsai., 2008; Faridi, 2011). Az anogenitális régió HPV fertőzései során tumoros progresszió ritkán következik be, ugyanis az esetek döntő többségében még tartósan fennálló HPV fertőzés esetében is a kialakuló hámléziók spontán visszafejlődnek vagy progressziójuk megáll (Doorbar, 2006). A HPV fertőzések magas prevalenciája miatt azonban a HPV fertőzéshez köthető tumorok a leggyakoribb malignus folyamatok közé tartoznak, így a *cervix carcinoma* világviszonylatban a nők második leggyakoribb tumoros betegsége, mintegy 450000 új esetet fedeznek fel évente, amelyből 25000 esetet az Európai Unió országaiban diagnosztizálnak (Waggoner, 2003).

A méhnyakrák kialakulásában és progressziójában a vírus jelenlétén kívül számos más tényező is szerepet játszhat. A fertőzött egyén szexuális szokásai, genetikai háttere és immunológiai jellemzői elősegíthetik a vírusfertőzés perzisztálását, valamint a gazdasejtben lejátszódó epigenetikai és jelátviteli regulációs folyamatok a HPV onkoproteinekkel kölcsönhatva elindíthatják vagy felgyorsíthatják a tumoros folyamatot (Doorbar, 2006; Huh, 2009).

Munkacsoportunk egy korábbi tanulmányában a gyulladásos folyamatok és a kórokozók elleni immunválasz szabályozásában központi szerepet játszó citokin, az interleukin-10 (IL-10) promotor polimorfizmusának kofaktor szerepét vizsgálta a magas onkogén kockázatú HPV fertőzések iránti fogékonyság illetve a *cervicalis intraepiteliális neoplasiák* kialakulásának kockázata kapcsán (Szőke és mtsai., 2004). Ismert ugyanis, hogy fiziológiás körülmények között a méhnyak transzformációs zónájában, amely a *cervicalis neoplasiák* kialakulásának leggyakoribb helye, emelkedett IL-10 szint figyelhető meg, amely tovább fokozódik a HPV indukálta hámlváltozásokban (Giannini és mtsai., 1998; Hazelbag és mtsai., 2001). Feltételezések szerint az IL-10 lokálisan képes csökkenteni a sejtes immunválasz hatékonyságát, így elősegítheti a kórokozók túlélését és a perzisztens vírusfertőzés kialakulását (Giannini és mtsai., 1998; Kobayashi és mtsai., 2008). Ezt támasztja alá, hogy a HPV indukálta *cervix carcinomában* az IL-10 fokozott expressziója korrelál az onkológiai progresszióval (de Gruijl és mtsai., 1999). Az utóbbi években megjelent közlemények arra utalnak, hogy sem a humán keratinociták és epiteliális sejtek, sem a belőlük

származó immortalizálódott sejtvonalak nem képesek IL-10 termelésére (Teunissen és mtsai., 1997; Steinke és mtsai., 2004), így a HPV indukálta *cervix carcinoma* estében megfigyelt magas IL-10 expresszió valószínűleg a tumoros szövetbe infiltrálódó leukocitákból származik (Wolk és mtsai., 2002). Ismert, hogy az IL-10 gén aktivitását befolyásoló transzkripciósfaktorok (Sp1, Ets-1, CCAAT/enhancer kötő protein- β és STAT3) konstitutívan jelen vannak a keratinocitákban illetve epiteliális eredetű sejtekben is (Benkhart és mtsai., 2000; Grinstein és mtsai., 2002; Brenner és mtsai., 2003), ezért munkánk során először arra kerestük a választ, hogy ezekben a sejtekben az IL-10 expresszió konzervatív hiánya epigenetikai inaktivációs mechanizmusok által valósul-e meg. Vizsgáltuk továbbá azt is, hogy az epiteliális sejtekben befolyásolja-e a magas onkogén kockázatú HPV genom jelenléte ezeket a folyamatokat.

A méhnyakrák és rákmegelőző állapotainak kialakulását elősegítő celluláris tényezők lehetnek azok a jelátviteli molekulák, amelyek a sejtek túlélésében, proliferációjában, migrációjában résztvevő folyamatokat szabályozzák. Jól ismert, hogy a papillomavírusok E6 és E7 onkoproteinjei nem transzkripciósfaktorként hatva és a sejtciklusban résztvevő fehérjék génexpresszióját befolyásolva készítetik osztódásra – ezáltal a virális genom replikálására - a gazdasejtet, hanem magukkal a sejtciklust, sejtproliferációt és adhéziót befolyásoló celluláris fehérjékkel képesek kölcsönhatni, így azok aktivitását közvetlenül befolyásolni (Doorbar, 2006; Moody és Laimins, 2010). A malignus folyamat kialakulásához hozzájárulhat vagy felgyorsíthatja azt, ha a HPV fertőzés hatására ezeknek a regulátor fehérjéknek a működése abnormálissá válik. A virális onkoproteinek által befolyásolt jelátadó fehérjéknek az azonosítása azért jelentős, mert egyre több ilyen protein aktivitása befolyásolható farmakológiai szerekkel, így a malignus folyamatok mérsékelhetőek vagy megállíthatóak.

Szolid tumorokban gyakran megfigyelték a nem receptor protein tirozin kinázok családjába tartozó Src kinázok emelkedett expresszióját és aktivitását, amely korrelációban állt a tumor előrehaladott állapotával és áttétképző hajlamával (Guarino, 2010). Néhány közelmúltban publikált közlemény emelkedett Src kináz aktivitást írt le méhnyakrák eredetű szövetmintákban is (Kong és mtsai., 2011b). Megfigyelték továbbá, hogy méhnyakrák eredetű sejtvonalak kezelése az Src kinázok kismolekulájú gátlószereivel csökkentette a sejtek motilitását és invazivitását (Yasmeen és mtsai., 2010; Kong és mtsai., 2011a). Nem ismert azonban az, hogy *cervix carcinoma* eredetű szövetmintákban és sejtvonalakban az Src kinázok az onkogén papillomavírusok hatására aktiválódnak-e. Kísérleteink során ezért arra kerestük a választ, hogy a magas onkogén kockázatú HPV-k E6 és E7 fő virális onkoproteinjei hatással vannak-e az epiteliális sejtekben expresszálandó Src kinázok aktivitására.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkám során a méhnyakrák kialakulásához szükséges perzisztens HPV fertőzést elősegítő kofaktorok közül az immunmodulátor interleukin-10 (IL-10) termelésének mechanizmusát kívántam tanulmányozni. Céлом volt továbbá az Src családba tartozó citoplazmatikus protein tirozin kinázok aktivációjának vizsgálata, amely hozzájárulhat a HPV fertőzött sejtek malignus fenotípusának kialakításához.

Munkám során az alábbi két témakörbe tartozó kérdések megválaszolását céloztam meg:

Az epigenetikai regulációs folyamatok szerepének tanulmányozása az IL-10 expresszió gátlásában keratinocitákban.

1. Különbözik-e az IL-10 termelésére nem képes keratinocitákban az IL-10 promoter metilációs mintázata az IL-10 termelő fehérvérsejtektől?
2. Van-e különbség az IL-10 promoterhez asszociálódó hisztonok acetilációs állapotában a keratinociták és a leukociták között?
3. Megváltozik-e a magas kockázatú HPV genomi szekvenciákat hordozó méhnyakrák eredetű sejtvonalakban az IL-10 promoter CpG metiláció mintázata illetve a hisztonok acetilációs állapota?
4. Hogyan függ össze az IL-10 promoter CpG metilációja annak expressziós aktivitásával az IL-10 proximális promoter szakaszokat tartalmazó reporter plazmid konstruktokban?

A magas kockázatú HPV onkoproteinek hatásának vizsgálata a keratinocitákban expresszálnódó citoplazmatikus Src kinázok expressziójára és aktivitására.

1. Van-e hatása a HPV 16 E6 és E7 onkoproteineknek az ubiquiter Src kinázok (Src, Yes, Fyn) mRNS és fehérje expressziójára keratinocitákban?
2. Megváltozik-e a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek jelenlétében az Src kinázok aktivitása (foszforilált állapota) keratinocitákban?
3. Befolyásolja-e a keratinociták differenciációja az Src kinázok expresszióját és aktivitását?

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A papillomavírusok általános jellemzése

A Papillomaviridae családba tartozó humán papillomavírusok (HPV) kisméretű DNS vírusok. A virionok 52-55 nm átmérőjű burok nélküli, ikozahedrális felépítésű partikulumok. A 72 kapszomerből álló víruskapszidot az L1 és L2 struktúrfehérjék építik fel (Schiffman és mtsai., 2007). A vírusgenom hozzávetőleg 8 kb méretű cirkuláris duplaszálú DNS molekula, a különböző papillomavírusok genomszerveződésének közös tulajdonsága, hogy a virális fehérjéket kódoló gének a duplaszálú DNS egyik szálára lokalizálódnak. A vírusgenom három fő részre tagolódik: a vírus életciklusának korai szakaszában kifejeződő, a vírus replikációját és transzkripcióját szabályozó fehérjéket kódoló korai („E, early”) régióra, a strukturális fehérjéket kódoló késői („L, late”) régióra, valamint a fehérjéket nem kódoló, virális replikációt és transzkripciót szabályozó szakaszra (long control region, LCR). Mind a korai, mind a késői régióban több olvasási keretet (ORF) található, amelyek átfedhetik egymást (Doorbar, 2006). A papillomavírusokat a DNS genom konzervatív szekvenciáinak hasonlósága alapján rendszerezik. Egy HPV akkor számít új genotípusnak, ha az L1 kapszidfehérjét kódoló gén bázissorrendje kevesebb, mint 90%-ban egyezik meg a már ismert típusok megfelelő szekvenciáival (Bernard és mtsai., 2010).

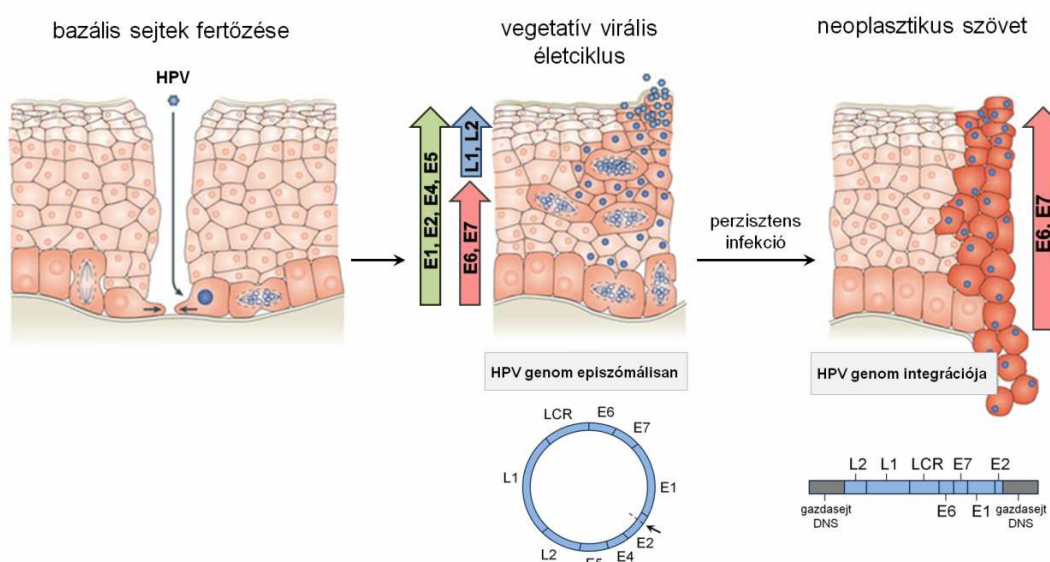
A papillomavírusok a többrétegű felszíni hámok bazális sejtrétegét fertőzik meg feltételezhetően mikrosérüléseken keresztül (Doorbar, 2006; Kines és mtsai., 2009). Szaporodási ciklusuk szorosan kapcsolódik a hámsejtek differenciálódási folyamatához (Pyeon és mtsai., 2009; Kajitani és mtsai., 2012). Tropizmusuk alapján megkülönböztetünk a többrétegű elszarusodó hámokban kialakuló kután HPV fertőzést, valamint a nemi szervek illetve a légzőrendszer nyálkahártyáján létrejövő mukózális fertőzést. A kután papillomavírus fertőzések többsége morfológiailag és szövettanilag eltérő szemölcsök kialakulását eredményezi. Ezen benignus elváltozások közül leggyakoribb a HPV 1, 2 és 4 által indukált közönséges szemölcs (*verruca vulgaris*). Bizonyos papillomavírusok (pl. HPV 3, 6, 7, 10, 11) ritkább szemölcsfajtákban is megjelenhetnek. Az *epidermodysplasia verruciformis* olyan HPV 5, 8, 9, 12, 14, 17 által okozott örökletes betegség, amely szintén szemölcsszerű elváltozásokat okoz, de ezek a napfénynek kitett helyeken malignusan elfajulhatnak. A nyálkahártyát fertőzők közül az ún. alacsony kockázatú („low risk”) típusok (pl. HPV 6, 11) benignus elváltozásokban (pl. *condyloma acuminatum* és *laryngealis papilloma*) fordulnak elő. A magas kockázatú („high risk”) típusokat (pl. HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39) többnyire az

alsó genitális traktus malignus daganataiból, elsősorban méhnyakrákból és annak rákmegelőző állapotaiból, a *cervicalis intraepiteliális neoplasiákból*, mutatták ki (Bosch és mtsai., 2008; Faridi és mtsai., 2011). Eddig több mint 150 különböző HPV típust sikerült elkülöníteni, amelynek mintegy 1/3-a képes a genitális traktus nyálkahártyáját megfertőzni (Faridi és mtsai., 2011).

A papillomavírus proteinek szerepe a vírus vegetatív életciklusában valamint a gazdasejt malignus fenotípusának kialakításában

Az anogenitálisan fertőző HPV-k a leggyakoribb szexuális úton terjedő ágensek közé tartoznak. A cervikális karcinogenezis elhúzódó folyamat, a HPV évekig perzisztálhat tünetmentesen a méhnyak nyálkahártyájában, majd kumulálódó kofaktorok hatására rosszindulatú folyamatok indulhatnak meg. Az invazív karcinómát a méhnyakhám rendellenességeinek progresszív stádiumai előzik meg (Doorbar, 2006).

Korábbi vizsgálatokban kimutatták, hogy benignus elváltozásokban és a rákmegelőző állapotokban a vírus genom általában episzómálisan található, és a vírusfertőzés produktív. Ezekben az esetekben az episzómális virális genom a bazális sejtrétegben alacsony, a differenciált felszíni sejtekben pedig magas kópiaszámban található. Ezzel szemben az invazív karcinómákból származó mintákban gyakran a gazdasejt genomjába integrálódva helyezkedik el a HPV DNS (Pett és Coleman, 2007; Bosch és mtsai., 2008) (1. ábra).



1. ábra A HPV fertőzés progressziója (Banks és mtsai. (2012) ábrája, módosítva.)

(HPV: humán papillomavírus, E: korai virális fehérje illetve azt kódoló gén, L: késői virális fehérje illetve azt kódoló gén, LCR: long control region)

A cirkuláris vírusgenom hat korai virális proteint (E1, E2, E4, E5, E6 és E7) és kettő késői (L1 és L2) fehérjét kódol. Az LCR régió a replikációs origót, illetve a virális gének expresszióját szabályozó transzkripció faktorok kötőhelyeit tartalmazza (Faridi és mtsai., 2011).

Az E1 és E2 korai fehérjék az episzómális vírusgenom replikációjának szabályozásában és a víruszaporodásnak a laphámsejtek differenciálódásával történő egybehangolásában játszanak szerepet (Münger és Howley, 2002). Az E1 ORF génterméke egy ATP-dependens DNS-helikáz aktivitással rendelkező foszfoprotein. A replikációs kezdőponthoz önmagában kis aktivitással kapcsolódik, az E2 proteinnel komplexben viszont erősen kötődik. A virális DNS szintézis iniciációjához és az elongációhoz is szükséges. Az E2 represszálja az E6 és E7 gének transzkripcióját a virális „early” promoter gátlásán keresztül (Bellanger és mtsai., 2011; Moody és Laimins, 2010). A papillomavírusok genomja benignus illetve premalignus léziókban episzómális formában van jelen és az E2 gén expresszálódik. Ezzel szemben rosszindulatú daganatsejtekben az episzómális vírusgenom egy szegmentje a gazdasejt genomjába integrálódik (Pett és Coleman, 2007). Az integrálódott szegmens tartalmazza az LCR-t és a korai géneket kódoló régió egy részét, amiben megtalálható az E6 és E7 teljes ORF-je (1. ábra). Az E2 ORF szekvenciának viszont nagy része elvész az integráció során.

Az E4 fehérjét kódoló ORF szintén a korai régióban helyezkedik el, de maga a fehérje csak a fertőzés késői szakaszában keletkezik és kizárólag a fertőzött epitélium differenciálódott rétegeiben található meg. Szerepe a virionok kiszabadulásában van, ugyanis a citokeratin lebomlását segíti elő a gazdasejtben (Moody és Laimins, 2010).

Alacsony kockázatú HPV típusok által okozott benignus elváltozásokban az E5 fehérje vesz részt a hámsejt proliferációjának kiváltásában. Az E5 fehérje növekedési faktorok receptoraihoz (pl. EGFR, PDGF-R) képes kötődni és azokat szubsztrátjuk hiányában is aktiválni. Magas kockázatú HPV típusok által okozott fertőzésekben az E5 fehérje segítheti az E6 és E7 virális onkoproteineket gazdasejt malignus fenotípusának kialakításában habár megfigyelések szerint expressziója megszűnik a transzformált hámsejtekben (Venuti és mtsai., 2011).

A papillomavírusok produktív szaporodási ciklusa során az E6 és E7 gének expressziója az E2 virális fehérje szigorú kontrollja alatt áll. Perzisztáló HPV fertőzés a virális DNS gazdasejt genomba történő integrációjához vezethet. Az integráció során cirkuláris vírusgenom felnyílásakor sérül az E2 ORF, ami az E2 fehérje hiányában az E6 és E7 onkogének transzkripcionális aktivációját eredményezi (Pett és Coleman, 2007) (1. ábra).

Az E6 onkoprotein egy hozzávetőleg 150 aminosav hosszú, 18 kDa molekulatömegű fehérje. Az E6 legfontosabb célpontja a p53 tumorsuppresszor fehérje, amelynek funkcióját többféle módon képes gátolni (Doorbar, 2006). A legfőbb mechanizmus, amellyel a magas kockázatú HPV típusok E6 fehérjei inaktiválják a p53 proteint, az ubiquitin-proteasóma útvonalon keresztüli lebontás (Ganguly és mtsai., 2009; Moody és Laimins, 2010). Mind a magas, mind az alacsony kockázatú HPV típusok E6 proteinje képes kötődni a p53 fehérjéhez, azonban nem ugyanazzal a régiójával. Mindkettő HPV típus köti a p53 C-terminális régióját, de a „core” régiót csak a magas kockázatú vírusok E6 fehérjeje, a p53 lebontásához pedig az E6 fehérjének ehhez a centrális régióhoz való kötődése szükséges (Moody és Laimins, 2010). Az E6 képes továbbá a p53 jelátviteli útvonalat gátolni azáltal, hogy a p53 fehérjét a citoplazmában tartja a p53 C-terminális részén található nukleáris lokalizációs szignál kötésével, illetve a p53 nukleáris exportjának serkentésével (Mantovani és Banks, 2001). Az E6 továbbá kiválthatja a p53 által szabályozott gének transzkripciójának gátlását a CBP/p300 vagy a hADA3 hiszton-acetiltransferázokkal való interakció révén (Kumar és mtsai., 2002). Normális esetben DNS-károsodás esetén a p300 acetilálja a p53 fehérjét, és ezáltal segíti kötődését az általa szabályozott gének promoteréhez. Az E6 kapcsolódása a p300 fehérjéhez azt eredményezi, hogy a p53 nem tud acetilálódni. Mind a magas, mind az alacsony kockázatú HPV típusok E6 proteinjeinél megfigyelték ezt, de az utóbbiak E6 fehérjeje nagyobb affinitással köti a p300 fehérjét.

Az E6 fehérje képes kölcsönhatásba lépni számos tumorsuppresszorként, transzkripció faktoraként és koaktivátorként ható celluláris proteinnel, továbbá az intracelluláris jelátvitelt, a sejtpolaritást és proliferációt szabályzó fehérjével, amelyeket az 1. táblázat ismertet.

1. táblázat Az onkogén HPV E6 fehérjével kölcsönhatásba lépő celluláris fehérjék

(Mantovani és Banks, 2001; Münger és Howley, 2002; Moody és Laimins, 2010 összefoglaló közleményei alapján.)

Celluláris partner	Celluláris partner funkciója	Kötődés hatása a partnerre	E6 kötődés hatása a gazdasejtre
Sejtciklust és apoptózist szabályozó fehérjék:			
p53	Tumorsupresszor, sejtválasz szabályozása mitogén stimulusokra.	degradáció, transzport gátlása	Apoptózis gátlása, sejtciklus kontroll elvesztése.
CBP/p300	p53 koaktivátor, jelátviteli folyamatok szabályozása (sejtciklus kontroll, sejt differenciáció, immunválasz befolyásolása gének expressziójának aktiválásával).	p53 koaktivátor hatás elvesztése	p53-dependens gének transzkripciójának gátlása.
AMF-1 / Gps2	p300 aktivitás növelése, G-protein közvetítette útvonalak gátlása.	degradáció	Gsp2 által gátolt gének transzkripciója aktiválódik.
BAK, BAX	Bcl-2 családba tartozó proapoptotikus fehérje.	degradáció	Apoptózis intrinsic útvonalának gátlása.
c-Myc	Transzkripciós faktor, proapoptotikus fehérjéket kódoló gének aktiválása.	degradáció	Apoptózis gátlása.
TNFR-1, FADD, kaszpáz-8	Proapoptotikus fehérjék.	degradáció	Apoptózis extrinsic útvonalának gátlása.
Sejtproliferációt, sejt differenciációt és adhéziót szabályozó fehérjék:			
E6AP	Proliferáló sejtekben jelátvitel regulátora.	degradáció	A jelátviteli folyamatok deregulációja, esszenciális az E6-nak a fehérjék degradációját kiváltó hatásához.
E6TPI	GTPáz aktivátor fehérje, Rab útvonal gátlása.	degradáció	Rab által közvetített mitogén szignalizáció aktiválása.
tuberin	GTPáz aktivátor fehérje, Rheb és mTOR útvonalak gátlása.	degradáció	Rheb és mTOR által közvetített mitogén szignalizáció aktiválása.
E6BP	Kalcium-kötő fehérje, az epiteliális sejtek differenciációjában és az apoptózis kiváltásában van szerepe.	funkció gátlása	Epiteliális sejtek terminális differenciációjának gátlása, apoptózis gátlása.
hDLG	Tumorsupresszor, epiteliális sejtek polaritásának, differenciációjának, sejtek közti tight junction kapcsolatok kialakításának regulátora.	degradáció	Sejtadhézió, polaritás és differenciáció változása, transzformált sejt invazivitásának növelése.
hScrib	Tumorsupresszor, epiteliális sejtek közötti tight junction-ok kialakítása, sejtproliferáció gátlása.	degradáció	Epiteliális sejtek adhéziójának és polaritásának elvesztése.
Paxillin	Fokális adhéziós fehérje, sejtadhézió és aktin citoszkeleton szabályozása.	funkció gátlása	Aktin citoszkeleton struktúra és sejt-extracelluláris mátrix kapcsolatok zavara.
MAGI-1/2/3	Tight junction fehérjék, komplex képzése béta-cateninnel, PTEN tumor szupresszor szabályozói	degradáció	Sejtadhézió, polaritás és differenciáció változása, transzformált sejt invazivitásának növelése. Apoptózis gátlása.
Kromoszómális stabilitás fenntartásában, DNS károsodások javításában résztvevő fehérjék:			
telomeráz	Ribonukleoprotein, a telomerek fenntartásáért felelős eukariótákban.	funkció segítése	E6-E6AP komplex hatására a telomeráz katalitikus alegységének (hTERT) expressziója aktiválódik. Transzformált sejtek proliferációja hatékonyabb.
hMCM7	Kromoszóma kópiaszám fenntartása sejtosztódás során.	funkció gátlása, degradáció	Kromoszóma aberrációk kialakulása.
XRCC1, MGMT	Egyszálú DNS törések javítása.	funkció gátlása, degradáció	DNS károsodások javításának hatékonysága csökken.

Celluláris partner	Celluláris partner funkciója	Kötődés hatása a partnerre	E6 kötődés hatása a gazdasejtre
Vírusfertőzések elleni természetes immunvédelemben résztvevő fehérjék:			
IRF-3	Az IFN- β transzkripció aktivátora.	funkció gátlása	Antivirális immunválasz hatékonysága csökken.

(AMF: autokrin motilitás faktor, BAK: Bcl-2 homologous antagosit / killer, BAX: Bcl-2 asszociált X protein, Bcl-2: B-cell lymphoma 2, CBP: CREB kötő fehérje, c-Myc: madár myelocytomatosis vírus onkogén homológ, E6AP: E6 asszociált protein, E6BP: E6 kötő (binding) protein, E6TP1: E6 targeted protein 1, Gsp2: G-protein útvonal (pathway) szupresszor 2, hDLG: Drosophila disc large protein humán homológ, hMCM7: human minichromosome maintenance 7 protein, IFN: interferon, IRF: IFN reszponzív faktor, MAGI: membrán asszociált guanilát kináz, MGMT: O-6-metil-guanin DNS metiltranszferáz, p: protein, PTEN: foszfatáz és tenzin homológ, XRCC1: X-ray repair cross-complementing protein 1)

Az E7 protein a sejtciklus aktivátora, a hipofoszforilált (aktív) retinoblasztóma fehérje (pRb) megkötésével és degradációjának kiváltásával az ubiquitin-proteasoma útvonal által (Münger és mtsai., 2001). A Rb a sejtprolifерáció negatív regulátora a G1/S átmeneti ponton, mivel aktivált formája köti az E2F transzkripciós faktort, így gátolja a sejt S fázisba lépését. Az E7-Rb komplex viszont nem tud kapcsolódni az E2F-hez, így az kifejezheti transzkripciót aktiváló hatását, amely a sejtciklus aktivációjához vezet (Ganguly és mtsai., 2009). Ezen kívül az E7 onkoprotein a p27 és p21 ciklin dependens kináz (CDK) inhibitorokat is képes kötni és így a G1/S átmenetnél lévő sejtciklus ellenőrzőpont kontrolljának elvesztését okozza, amely a sejtciklus progressziójához vezet. A p27 és p21 CDK gátló hatása alól felszabaduló CDK2/ciklinA és CDK2/ciklinE kinázok foszforilálják a Rb-t és indukálják az S-fázis géneinek transzkripcióját (Cho és mtsai., 2002).

Holland és mtsai. (2008) kimutatták továbbá, hogy a HPV 16 E7 proteinje indukálja a hiszton lizin metil transzferáz EZH2 fehérje transzkripcióját az E2F transzkripciós faktorokon keresztül. Az EZH2 serkenti a HPV fertőzött tumorsejtek proliferációját a G1/S ellenőrzési pont megkerülésével és gátolja az apoptózist. Az E6 fehérjéhez hasonlóan az E7 protein is számos egyéb celluláris fehérjével képes asszociálódni, amelyek közül a legfontosabbakat a 2. táblázat foglalja össze. Ez a két virális onkoprotein tehát nem transzkripciós faktorként hatva, közvetlenül befolyásolja a génexpressziót, hanem celluláris partnereiken keresztül, amelyek vagy maguk a transzkripciós regulátorok vagy transzkripciós faktorok aktivitását szabályozzák.

Az L1 és L2 késői fehérjék génei csak a produktívan fertőzött sejtekben fejeződnek ki. Az L1 a fő kapszidfehérjét kódoló, igen konzervatív génszakasz. Az L1 fehérje hordozza a típuspecifikus epitópokat, és képes az L2 minor kapszid protein nélkül is natív kapszidot formálni. Az L1 fehérje segíti elő a virionok kapcsolódását a gazdasejt felszínéhez. Az L2 a virális genom virionba beépülését segíti elő (Bosch és mtsai., 2008; Pyeon és mtsai., 2009).

2. táblázat Az onkogén HPV E7 fehérjével kölcsönhatásba lépő celluláris fehérjék

(Münger és mtsai., 2001; Münger és Howley, 2002; Moody és Laimins, 2010 összefoglaló közleményei alapján.)

Celluláris partner	Celluláris partner funkciója	Kötődés hatása a partnerre	E7 kötődés hatása a gazdasejtre
Sejtciklust és apoptózist szabályozó fehérjék:			
Rb (p105) p107, p130	A sejtciklus negatív regulátorai a G1/S átmeneti ponton az E2F transzkripció faktor kötése által.	funkció gátlása, degradáció	Sejtciklus progressziója, sejtproliferáció, apoptózis gátlása.
p600	Citoplazmatikus ubiquitin ligáz, antiapoptotikus fehérje.	funkció segítése	Apoptózis gátlása, transzformáció elősegítése.
p21, p27 CDK inhibitorok	A sejtciklus gátlói a G1/S átmeneti ponton a differenciálódó hámsejtekben.	funkció gátlása	Sejtciklus progressziója, sejtproliferáció.
CDK2/ciklin A CDK2/ciklin E	A sejtciklus aktivátorai a G1/S átmeneti ponton.	aktiváció (p21 és p27 gátló hatása alól felszabadul)	Rb foszforilációja, sejtciklus progressziója, sejtproliferáció, apoptózis gátlása.
CDC25A	Foszfoproteáz, CDC2 aktiválása (tirozin – defoszforiláció által).	expresszió fokozása	Sejtciklus progressziója, sejtproliferáció, apoptózis gátlása.
pCAF	Acetiltranszferáz, számos transzkripció faktor koaktivátora.	funkció gátlása	Sejtproliferáció, apoptózis gátlása.
Kromatinszerkezet kialakításában résztvevő fehérjék (sejtciklus, sejtproliferáció szabályozása):			
HDAC-1	Hisztonok deacetilálása, heterokromatin létrehozása.	funkció aktiválása és gátlása is lehet E7-Rb-HDAC komplex	S-fázis gének transzkripciója. Az epitélium szuprabazális rétegeiben a vírus produktív szaporodási ciklusának biztosítása. Episzómális vírusgenom fenntartása. Differenciálódó hámsejtek S-fázisba lépése.
E2F6	E2F által aktivált promoterek transzkripcióját gátolja a polycomb csoportba (PcG) tartozó fehérjekomplexek által.	funkció gátlása	S-fázis gének transzkripciója.
Kromoszómális stabilitás fenntartásában, DNS károsodások javításában résztvevő fehérjék:			
ATM	DNS törések javítása.	aktiváció	Genom instabilitása, DNS törések.
claspin	DNS repair mechanizmusok szabályozása, mitózis gátlása.	degradáció	A sejtek mitózissal osztódnak a DNS károsodások ellenére. Genom instabilitása.
Vírusfertőzések elleni természetes immunvédelemben résztvevő fehérjék:			
IRF1 IRF9/p48	Az IFN jelátviteli útvonalban vesznek részt.	funkció gátlása	Antivirális immunválasz hatékonysága csökken.

(ATM: ataxia telangiectasia mutated, CDC25A: cell division cycle 25 homolog A, CDK: ciklin dependens kináz, E2F6: E2F transzkripció faktor 6, HDAC: hiszton deacetiláz, IFN: interferon, IRF: IFN reszponzív faktor, p: protein, pCAF: p300/CBP-associated factor, Rb: retinoblasztóma protein)

A lokálisan termelődő IL-10 hatása a HPV fertőzés progressziójára a hámszövetben

Az anogenitális HPV fertőzések döntő többsége tranziens jellegű, tehát az immunválasz eliminálja a vírust a szervezetből, továbbá a perzisztens HPV fertőzések következtében kialakuló neopláziás elváltozások 80-90%-a idővel visszafejlődik feltehetőleg a később aktiválódó antivirális immunválasz hatására (Stanley, 2012). Klinikai megfigyelések a lokális celluláris immunvédekezés fontosságát támasztják alá, ugyanis a vírus életciklusa során nem következik be virémia, a teljes virális életciklus a hámsejtekben zajlik le (Bosch és mtsai., 2008). A fertőzés helyén a vírus ellen elsőként fellépő immunsejtek a makrofágok, NK sejtek és NK T-sejtek. Az immunválasz második vonalát képviselik a citotoxikus T-limfociták, amelyek az E2 és E6 virális fehérjékre reagálnak. Ennek ellenére a HPV fertőzésekben nem mindig alakul ki immunválasz a fertőzött sejtek ellen. Ennek egyrészt az az oka, hogy a HPV fertőzés nem jár a gazdasejt pusztulásával, tehát nincs sejtkárosodás és lokális gyulladás az infekció helyén, másrészt az E6 és E7 onkoproteinek hatékonyan képesek gátolni az interferonok közvetítte antivirális immunválaszt (Kanodia és mtsai., 2007; Moody és Laimins, 2010) (1. és 2. táblázat).

Az epitéliumban is a sejtek közötti kommunikáció citokinek termelése útján valósul meg. A HPV fertőzésekhez társuló neopláziás és diszpláziás elváltozásokban a citokin profil megváltozása figyelhető meg (El-Sherif és mtsai., 2001; Peghini és mtsai. 2012). A fertőzött epitéliumban lokálisan termelődő antiinflammatorikus illetve immunszuppresszív hatású citokinek elősegíthetik a perzisztens vírusfertőzés kialakulását, amelynek talaján kialakulhat a fertőzött sejtek malignus transzformációja.

Az IL-10 citokin alapvető szerepet játszik a kórokozók elleni immunválasz és a gyulladásos folyamatok regulációjában. 1989-ben két, egymással kapcsolatban álló kutatócsoport közel egyidőben azonosította az IL-10 fehérjét. Míg az egyik megfigyelte, hogy a Th2 sejtek képesek a Th1 sejtek aktivációjának és citokin termelésének gátlására, addig a másik csoport egy B-sejtek által termelt, a timociták osztódását serkentő fehérjét mutatott ki. A fehérjéket kódoló gének klónozása és szekvenálása után derült ki, hogy ugyanazt a citokint fedezték fel (Moore és mtsai., 2001).

A humán IL-10 génje az 1. kromoszómán található, 5 exon kódolja. Az IL-10 fehérje szerkezetét tekintve nem kovalens kötéssel kapcsolódó homodimer, melynek mindkét monomerje 178 aminosavból áll. IL-10 termelésére képes a T-limfociták minden alpopulációja, a monociták, a makrofágok, az NK-sejtek, a B-lymphocyták és a dendritikus sejtek (Moore és mtsai., 2001; Mocellin és mtsai., 2003). A különböző sejttípusokban eltérő

módon szabályozódhat termelődése (Im és mtsai., 2004; Saraiva és mtsai., 2005; Staples és mtsai., 2007), azonban az IL-10 gén expresszióját reguláló transzkripció faktorok (Sp1, CCAAT/enhancer kötő fehérje és STAT3) számos sejttípusban konstitutív módon expresszálódnak (Benkhart és mtsai., 2000; Grinstein és mtsai., 2002; Brenner és mtsai., 2003). A termelő sejt által szekretált IL-10 a két alegységből (α és β lánc) álló IL-10 receptorhoz (IL-10R) kötődik. A receptor–ligand komplex létrejötte a JAK-STAT intracelluláris jelátviteli útvonalat aktiválva váltja ki a célsejt válaszát (Moore és mtsai., 2001).

Az IL-10 egy pleiotrop hatású citokin. Gátolja a Th1 sejtek és az aktivált makrofágok effektor funkcióját elsősorban a proinflammatorikus citokinek (IL-2, IL-3, TNF- α), adhéziós molekulák és kemokinek expressziójának gátlásán keresztül. Elősegíti viszont a B-sejtek, granulociták, dendritikus sejtek, hízósejtek és endoteliális sejtek növekedését és differenciálódását. Az IL-10 képes az NK-sejtek stimulálására is, elősegítve azok citotoxikus működését. Hatására fokozódik az NK sejtek GM-CSF, IFN- γ és TNF- α termelése, valamint a CD56⁺ NK sejt szubpopuláció differenciálódása. A professzionális antigén prezentáló sejtek számos funkcióját gátolja, például megakadályozza a dendritikus sejtek endogén vagy exogén faktorok által kiváltott érését (Mocellin és mtsai., 2003). Az IL-10-nek kulcsszerepe van azoknak a Treg sejteknek a differenciálódásában is, amelyek később az immuntolerancia kialakításában vesznek részt (Bolpetti és mtsai., 2010). Az IL-10 immunszuppresszív hatása elősegítheti malignus folyamatok kialakulását és progresszióját (Csiszár és mtsai., 2004; Todaro és mtsai., 2006).

Az IL-10 emberi többrétegű laphámban is termelődik, és fokozott kiválasztása megfigyelhető a HPV indukálta hámelváltozásokban (El-Sherif és mtsai., 2001). Termelődésének helyén lokálisan képes csökkenteni a sejt (Th1) immunválasz hatékonyságát, így elősegítheti a kórokozók túlélését (Giannini és mtsai., 1998). Az epitéliumban az IL-10 forrásai lehetnek elméletileg a hámsejtek, illetve az infiltráló mononukleáris sejtek. Az utóbbi években közölt kísérletekből azonban az valószínűsíthető, hogy sem a humán keratinociták és epiteliális sejtek, sem a belőlük származó immortalizálódott sejtek nem képesek IL-10-et termelni (Teunissen és mtsai., 1997; Steinke és mtsai., 2004). A HPV indukálta cervix carcinoma estében megfigyelt magas IL-10 szint valószínűleg a tumorba infiltráló leukocitákból származik (Wolk és mtsai., 2002).

Epigenetikai szabályozó mechanizmusok szerepe a génexpresszió szabályozásában

Epigenetikai szabályozás alatt azokat a folyamatokat értjük, amelyek során a gén expressziós aktivitásában olyan átörökíthető változások mennek végbe, amelyek nem járnak a DNS szekvencia megváltozásával. A genomi DNS és a hiszton fehérjék posztisztetikus módosításain alapuló epigenetikai mechanizmusok kulcsszerepet játszanak a génexpresszió szabályozásában az embriogenezis és a szöveti differenciáció során és ezek a mechanizmusok állnak a háttérben annak, hogy miért leszármazási-vonal specifikus számos génnek az expressziója (Berger, 2007). Ezen folyamatok megismerése adott magyarázatot arra is, hogy milyen módon képesek a már differenciálódott sejtek megváltoztatni génexpressziós aktivitásukat. A kromatin konformáció függ továbbá a különféle ritkább hiszton variánsok jelenlététől, illetve ATP-függő kromatin átrendező fehérje-komplexek (pl. Polycomb represszor fehérje komplexek) is módosíthatják a hiszton-DNS kölcsönhatásokat. Jelenleg az epigenetikai szabályozási folyamatok közé sorolják a géncsendesítésben szerepet játszó miRNS-eket is (Berger, 2007; Esteller, 2008).

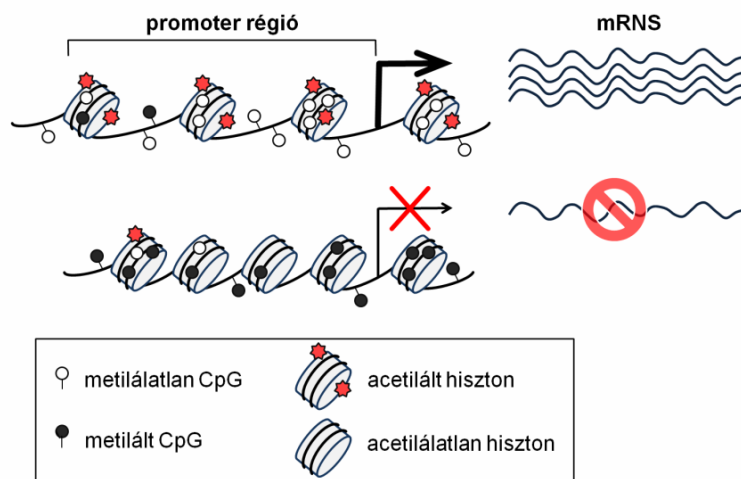
A transzkripciót szabályozó fehérjék DNS-hez kapcsolódását a kromatin állapota határozza meg. A kromatin két állapotot vehet fel: lehet kondenzált (transzkripció aktivitást nem mutató) heterokromatin és lehet dekonzenzált (transzkripciósan aktív) eukromatin. A kromatin állapotát meghatározó egyik alapvető mechanizmus a DNS metilációja (Bird, 2002; Berger, 2007). A metiláció elsődleges helyei azok a citozin nukleotidok, amelyeket közvetlenül guanin követ (ún. CpG dinukleotidok). Ez CpG szekvenciában található citozin bázis kovalens módosítását jelenti. A genom globális metilációs mintázatának kialakításáért, fenntartásáért és dinamikus változtatásáért DNS-metiltranszferázok (DNMT) felelősek, amelyek egy metil csoportot illesztenek a citozin bázis gyűrűjének 5-ös szénatomjára (Klose és Bird, 2006). A DNMT fehérjecsalád tagjait emlősökben három osztályba sorolják: DNMT1, DNMT2 és DNMT3. A DNS replikáció során a metilációs mintázat fenntartását végző DNMT1 enzim szubsztátja a hemimetilált DNS. A DNMT3A és DNMT3B enzimek *de novo* metil-transzferáz aktivitással is rendelkeznek, tehát az addig mindkét szálon metilálatlan DNS új metilációs mintázatát alakíthatják ki (Bird, 2002; Klose és Bird, 2006).

A humán genomban a CpG dinukleotidok statisztikailag ritkábban fordulnak elő, mint a véletlen bázissorrend esetén várható lenne. Ennek oka feltételezhetően az 5-metilcitozin timinné történő dezaminációja. Ez a magyarázata annak, hogy a C/T változás egyedi nukleotid polimorfizmus a leggyakoribb a humán populációban. Ahol a CpG dinukleotidok változatlanul megőrződnek a genetikai állományban, ott feltételezések szerint fontos

szabályozó szerepet töltenek be (Weber és mtsai., 2007). Az emberi genom hozzávetőleg 29000 úgynevezett CpG szigetet tartalmaz, amelyek kb. 1-2 kb méretű CG dinukleotidokban gazdag területek. Ezek a CG gazdag szekvenciák többsége konstitutívan expresszálódó háztartási génekkel asszociált, általában azok promoter régiójában található, tehát metilálatlan. A metiláció a humán genomban nagyrészt a nem kódoló DNS-ben fordul elő. A sejtosztódás során az erősen metilált DNS szakaszok replikációja időben később következik be, mint a kevésbé metilált DNS szakaszoké. Bizonyítást nyert továbbá az is, hogy a későn replikálódó gének az inaktív heterokromatinban helyezkednek el. Ez a mechanizmus segíti elő az integrált virális genomok, endogén retrovírusok és transzpozonok transzkripciójának gátlását, illetve játszik szerepet az X kromoszóma inaktiválásában (Bird, 2002; Klose és Bird, 2006).

Génexpressziós vizsgálatok során megfigyelték, hogy számos gén promoterében található CpG dinukleotidok metilációjának mértéke fordított arányban áll az adott gén transzkripció aktivitásával (2. ábra). A CpG metiláció direkt módon akadályozhatja egyes transzkripció faktorok kötődését a promoterhez, gátolva ezzel az RNS transzkripcióját (Setoguchi és mtsai., 2006). Ez a mechanizmus azonban csak azon transzkripció faktorok esetében tudja magyarázni a gátlást, amelyek kötőhelyei tartalmaznak CpG szekvenciát. A metilált DNS hatással van a környezetében elhelyezkedő hiszton fehérjék állapotára is, így a kromatin-szerkezet megváltoztatásával indirekt módon befolyásolhatja a promoterek hozzáférhetőségét a transzkripció faktorok számára (Klose és Bird, 2006).

A hiszton fehérjéket érintő poszttranszlációs kovalens módosítások (metiláció, acetiláció, foszforiláció, ubiquitináció, ADP-riboziláció) befolyásolják a kromatin állapotát (Jenuwein és Allis, 2001). A legtöbbet tanulmányozott hiszton modifikáció a H3 és H4 hisztonok acetilációja, amelyet a hiszton-acetiltranszferáz enzimek végeznek acetyl-csoport(ok) áthelyezésével az acetyl-CoA-ról a hisztonok N-terminális oldalláncaiban található bizonyos lizin aminosavak ϵ -amino-csoportjára. A H3 és H4 hisztonok acetilációja általában a transzkripció aktivitást segíti elő (2. ábra). Ennek egyik magyarázata az, hogy a lizin oldallánc pozitív töltését az acetyl-csoport semlegesíti, ezáltal megszűnik a vonzás a DNS negatív töltésű foszfát-csoportjai és a hisztonok lizin oldallánca között, valamint a nukleoszóma magjában található egyéb hisztonok oldalláncainak negatív töltésű aminosavai és a lizin között, aminek következményeként lazábbá válik a kromatinstruktúra, és a DNS hozzáférhetővé válik a transzkripció aktivátor fehérje-komplexek számára. A lazább kromatinban a nukleoszómák változtathatnak pozíciójukon, ami szintén addig hozzáférhetetlen transzkripció iniciációs helyeket tehet szabaddá (Jenuwein és Allis, 2001).



2. ábra A promoteraktivitásra utaló epigenetikai markerek

A hiszton acetiláció reverzibilis folyamat. A lizin oldalláncokról az acetil-csoportok eltávolítását a hiszton deacetiláz (HDAC) enzimek katalizálják, amelyeket az emlős-sejtekben három osztályba sorolnak (Berger, 2007).

A genomi DNS CpG metilációja és a DNS-hez asszociálódó hisztonok acetilációja között szoros kapcsolat van (Berger, 2007). A metilált CpG dinukleotidok ugyanis közvetve a környezetükben elhelyezkedő hiszton fehérjék deacetilációját válthatják ki: a metil-citozinhoz a MeCP2 metilkötő fehérje és a mSIN3A korepresszor fehérje komplex kötődik, a mSIN3A protein pedig képes hiszton deacetilázok (HDAC1 és HDAC2) kötésére. Ennek következtében a H3 és H4 hisztonok deacetilálódnak és a fehérjék elektrosztatikus töltésének megváltozása miatt kialakuló kompakt kromatinszerkezet miatt a genomi DNS a transzkripció és egyéb szabályozó faktorok számára hozzáférhetetlenné válik, így a génexpresszió gátolt. Ezzel szemben a gének expresszióját aktiváló folyamat során az adott DNS-szakasz demetilációját követően aktivációs fehérje-komplex kötődése mehet végbe, a H3 és H4 hisztonok acetilációját eredményezheti és így a transzkripció faktorok számára hozzáférhetővé válik az adott genom-régió (Berger, 2007) (2. ábra).

A malignus folyamatok kialakulásához és progressziójához hozzájárulhat, ha a kromatin állapotában bekövetkező változások miatt a sejtek túlélésében, proliferációjában résztvevő regulátor gének expressziója abnormálissá válik (Baylin és mtsai., 2001; Esteller, 2008). A promoterek metilációs mintázatának és a környező hiszton fehérjék állapotának megváltozása tumorszupresszor gének gátlásához és protoonkogének aktivációjához vezethet (Baylin és mtsai., 2001).

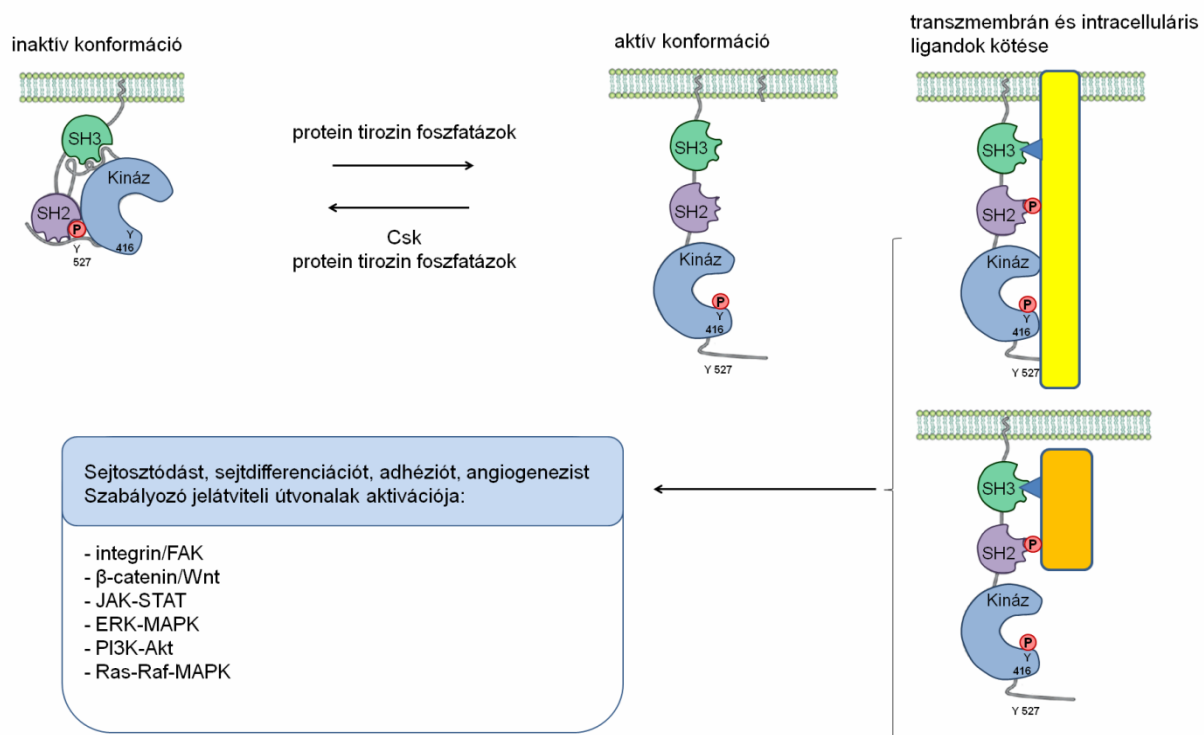
Más tumorokhoz hasonlóan, a HPV fertőzésekhez társuló méhnyakrákban és rákmegelőző elváltozásaiban is megfigyelték, hogy a tumoros progresszió során nagymértékben változik a malignusan transzformált sejtekben a DNS metilációs mintázata (Virmani és mtsai., 2001; de Capoa és mtsai., 2003; Duenas-Gonzalez és mtsai., 2005; Wisman és mtsai., 2006; Yang és mtsai., 2006; Lai és mtsai., 2008). A cervikális karcinogenezis során a transzformált sejtekben változásokat figyeltek meg a hisztonfehérjék állapotában és a kromatinszerkezet kialakításában résztvevő fehérjék aktivitásában is, amely szintén abnormalis génaktivitást eredményezhet (Szalmás és Kónya, 2010). Ismert, hogy a magas kockázatú onkogén papillomavírusok E6 és E7 onkoproteinjei fehérje interakciók útján képesek a genom stabilitásának és a hisztonok acetilációs állapotának (a kromatinszerkezetnek) a befolyásolására (Longworth és Laimins 2004; Zhang és mtsai., 2004; Longworth és mtsai., 2005; Korzeniewski és mtsai., 2011).

Az Src családba tartozó citoplazmatikus kinázok szerepe malignus folyamatokban

A nem receptor protein-tirozinkinázok közé tartozó c-Src volt az elsőként felfedezett protoonkogén, valamint az elsőként azonosított intrinsic protein tirozin kináz aktivitással rendelkező géntermék (Stehelin és mtsai. 1976; Hunter és Sefton, 1980). Az Src kináz családba jelenleg 11 kináz tartozik (Src, Fyn, Yes, Blk, Yrk, Frk (Rak), Fgr, Hck, Lck, Srm, Lyn), amelyek közül az Src, Yes és Fyn ubiquiter módon expresszálódik különféle szövetekben. A családba tartozó többi enzim elsősorban hemopoetikus eredetű sejtekben termelődik (Sen és Johnson, 2011).

Az Src családba tartozó citoplazmatikus kinázok nagyon hasonló szerkezetűek: a hozzávetőleg 60 kDa méretű fehérjében a C-terminális katalitikus domént egy SH2 és egy SH3 domén követi. Az Src kinázok mirisztül-csoportjukon keresztül a plazmamembránhoz kapcsolódnak és nyugalmi állapotukban katalitikus (kináz) doménjük a membránhoz közeli SH3 doménhez kötődik, míg a C-terminálisan elhelyezkedő szabályozó, foszfortirozint tartalmazó régiójuk az SH2 doménhez kapcsolódik (Roskoski, 2004). Ebben a zárt molekulaszervezetben inaktívak, nem rendelkeznek enzimatis aktivitással. Aktivációjuk során a C-terminális foszfo-tirozin defoszforilálódik, a molekulaszervezet kinyílik, és így az SH2 domén alkalmas az enzim szubsztátjainak megkötésére. Ezzel egyidejűleg az aktivációs hurokban elhelyezkedő tirozin autofoszforilációja következik be, ami az aktivitás növekedését eredményezi (Roskoski, 2005) (3. ábra). Az Src kinázok aktivitásának szabályozásában a C-terminális tirozin foszforilációjáért (az enzimaktivitás gátlásáért) elsősorban a C-terminális

kináz (Csk), míg a C-terminális tirozin defoszforilációjáért (aktív konformáció kialakításáért) a CD45 illetve egyéb protein tirozin foszfatázok felelősek (Sen és Johnson, 2011).



3. ábra Az Src kinázok aktiválódása (Shvartsman és mtsai., (2007) ábrája alapján)

(Akt: v-akt egér thyoma virális onkogén homológ, Csk: C-terminális kináz, ERK: extracelluláris szignál regulált kináz, FAK: fokális adhéziós kináz, JAK: Janus kináz, MAPK: mitogén-aktivált protein kináz, PI3K: foszfatidilinozitol-3 kináz, Raf: „rapidly accelerated fibrosarcoma”, Ras: „rat sarcoma”, STAT: Signal transducer and activator of transcription, Wnt: Wingless type)

Az Src kinázok szerepe sokrétű: a sejtek morfológiáját, adhézióját, migrációját, invazivitását, proliferációját, differenciációját és viabilitását meghatározó intracelluláris jelátviteli folyamatok kulcsfontosságú résztvevői (Bradshaw és mtsai., 2010; Sen és Johnson, 2011) (3. ábra). Transzmembrán tirozin kináz receptorok, citokin receptorok, integrin receptorok aktivációja által indított szignalizációs folyamatok a leggyakoribb aktivátoraik (Cabodi és mtsai., 2010).

Aktivációjuk gyakran megfigyelhető különféle malignus elváltozásokban annak ellenére, hogy mutációkat illetve kromoszóma-rendellenességeket nagyon ritkán sikerül igazolni abnormális aktivitásuk háttérében (Guarino, 2010; Sen és Johnson, 2011). Ennek ismeretében feltételezhetően az aktivitásukat szabályozó kinázok és/vagy foszfatázok

működésében bekövetkező változások vezethetnek aktivációjukhoz tumorokban (Sen és Johnson, 2011). Az Src kinázok aktivitása és a malignus progresszió közötti korrelációt igazolták többféle tumoros elváltozásban, így többek között petefészek, prosztata, bőr, mell, máj, hasnyálmirigy és tüdőrákban (Kim és mtsai., 2009). Ezen kívül klinikai megfigyelésekkel és *in vitro* kísérletekben is kimutatták, hogy az Src család kinázai többféleképpen hozzájárulhatnak a tumoros sejtek malignus fenotípusának kialakításához:

- Befolyásolják a sejtekek adhézióját és migrációját, invazivitását (Summy és Gallick, 2003). Ismert, hogy az Src kináz fontos szerepet játszik a sejtek közötti (adherens) kapcsolatok valamint a sejtek és az extracelluláris mátrix közötti kapcsolatok kialakulásának és megszűnésének szabályozásában. Az adherens kapcsolatokat a szomszédos sejtek E-kadherin molekulái közötti interakciók hozzák létre. Az E-kadherin molekuláknak a csökkent expressziója ezért a sejtek megnövekedett invazivitását és metasztázis képző képességét eredményezi. Kísérletekkel igazolták, hogy az Src kináz emelkedett aktivitása korrelál az E-kadherin expresszió csökkenésével (Nam és mtsai., 2002). A sejtmembrán közelében az aktív Src komplexet képezhet a fokális adhézis kináz (FAK) fehérjével, így az extracelluláris mátrix - integrin komplexek által kiváltott szignálok közvetítve befolyásolja a sejt motilitását, viabilitását és proliferációját. Az Src-FAK komplex többféle olyan szubszttráttal is kapcsolatba léphet (paxillin, p190RhoGAP), amelyek központi szerepet játszanak az aktin sejtváz átépülésének és a sejtmigrációnak a fokozásában (Mitra és Schlaepfer, 2006; Guarino, 2010). Petefészekrákban és mellrákban kimutatták, hogy a FAK szignalizáció zavara korrelál a tumor megnövekedett invazivitásával és metasztatikus potenciáljával, valamint a betegek életbenmaradási esélyének csökkenésével (Zhao és Guan, 2009).
- Ismert, hogy a növekedési hormon receptorok fontos aktivátorai a Src családba tartozó kinázoknak. Számos olyan tumorban (pl. mell-, petefészek-, prosztatarák), amelyben túlzott mértékben expresszálódnak vagy konstitutívan aktiválódnak a növekedési hormon receptorok (EGFR, PDGF-R), egyidejűleg megfigyelhető az Src expresszió és aktivitás növekedése is (Biscardi, 2000). Epiteliális és fibroblaszt sejtekkel végzett *in vitro* kísérletek demonstrálták, hogy az Src és az EGFR aktiváció szinergista módon hatva fokozza a sejtproliferációt és invazivitást (Tice és mtsai., 1999).

- Egyre több adat támasztja alá, hogy az Src kinázok közvetlenül részt vesznek a sejtciklus és a mitózis szabályozásában. Kimutatták például, hogy az Src emelkedett expressziója függetleníti a G0/G1 sejtciklus átmenetet a Myc hatásától (Prathapam és mtsai., 2006). Ezen túl azt is megfigyelték, hogy az Src aktivitásának gátlása a β -catenin csökkent kötődését eredményezi a ciklin D1 és Myc promoterekhez, ami ezen promoterek transzkripciós aktivitását csökkenti (Chang és mtsai., 2008). Igazolták továbbá, hogy az Src tranziensen aktiválódik a G1/S sejtciklus átmenetnél is és szükséges az eredményes sejtosztódáshoz (Roche és mtsai., 1995).
- Tumoros folyamatokban az angiogenezis regulációja gyakran zavart szenved. Az érképzés szabályozása olyan citokinek (pl. VEGF, IL-8) elválasztása révén valósul meg, amelyek az endotél sejtek migrációját és proliferációját befolyásoló intracelluláris jelátviteli útvonalakat indítanak el. Az Src kinázok aktivitása petefészek tumorokban elősegítheti az angiogenezist, mivel mind a VEGF, mind az IL-8 fokozott expresszióját eredményezheti. Az Src, Fyn és Yes kinázok gátlása csökkenti az endotél sejtek VEGF által kiváltott migrációját (Werdich és Penn, 2005).

Az Src kinázok ezért a daganatok kezelésének ígéretes kemoterápiás célpontjai és több kismolekulájú Src kináz inhibitor fejlesztettek ki és teszteltek sikeresen a petefészek-, prosztata-, hepatocelluláris-, hasnyálmirigy-, bőrrák és bizonyos típusú tüdőrákok kezelésére (Kim és mtsai., 2009; Konecny és mtsai., 2009; Klunger és mtsai., 2011; Montero és mtsai., 2011). A közelműltban megjelent közlemények felvetették a klinikai kipróbálás alatt álló kismolekulájú Src kináz inhibitorok alkalmazását a méhnyakrák kezelésében (Al Moustafa és mtsai., 2011). Más tumoros elváltozáshoz hasonlóan a méhnyak rosszindulatú elváltozásaiból származó szövetmintákban is az Src kináz emelkedett aktivitása mutatható ki (Kong és mtsai., 2011a). *Cervix carcinoma* eredetű sejtvonalak kezelése kismolekulájú Src kináz inhibitorral a sejtek invazivitását szignifikánsan csökkentette (Kong és mtsai., 2011b). Nem ismert azonban, hogy méhnyakrákban milyen folyamat áll a Src aktiváció hátterében. Megválaszolásra vár, hogy a *cervix carcinoma* legfontosabb etiológiai faktorának számító magas kockázatú papillomavírusok onkoprotei aktiválják-e a Src kinázt vagy az enzim aktivációja a rákos sejtek klonális szelekciója során következik be a HPV jelenlététől függetlenül.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Anyagok

Vegyszerek: transzfektáló reagens (Invitrogen), S-adenozil-metionin (NEB), 100 bp DNS létra (Fermentas), proteáz inhibitor koktélt tartalmazó tabletták (Roche), nagy érzékenységű kemilumineszcens detektálást biztosító szubsztrát (Thermo Fisher Scientific), fehérje molekulatömeg standard marker (Bio-Rad), nitrocellulóz membrán (GE Healthcare Life Sciences), röntgenfilm (Thermo Fisher Scientific), streptavidinnel fedett mágneses gyöngyök (Dyna), lazac sperma DNS / protein G agaróz (Upstate). A kísérletek során használt minden egyéb vegyszert a Sigma-Aldrich-től rendeltük.

Enzimek: proteináz-K, RNáz-A (Sigma-Aldrich), T4 DNS ligáz (Promega); restrikciós endonukleázok: *Bgl*II, *Eco*RI, *Eco*RV, *Hind*III, *Kpn*I, *Sac*I, *Sma*I (Promega), Fast Digest™ *Hpa*II, Fast Digest™ *Msp*I (Fermentas); SssI CpG metiláz (NEB); DNS polimeráz enzimek: JumpStart™ AccuTaq™ LA DNA polymerase (Sigma-Aldrich), GoTaq DNS Polymerase (Promega), Eppendorf Hot Master Mix (Merck), TaqMan és SYBR Green PCR master mix-ek (Life Technologies).

Plazmidok: PinPoint™ Xa-2 vector (Promega), pGL2-Basic vector (Promega).

Kitek: PCR termék tisztító kit (Qiagen), Qiaquick gélextrakciós kit (Qiagen), DNS tisztító GeneClean kit, (Qiagen), plazmid tisztító kit (Promega), luciferáz szubsztrát lízis pufferrel (Promega), foszfokináz array (R&D Systems) Allexpress Autoread Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech); reverz transzkripció kit-ek (Sigma-Aldrich, Life Technologies)

Tápfolyadékok és adalék-anyagaik: DMEM (Sigma-Aldrich), RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), DK-SFM tápfolyadék (Invitrogen), OptiMEM tápfolyadék (Invitrogen); borjúsavó, penicillin, streptomycin, L-glutamin, ampicillin (Gibco).

Antitestek: anti-acetil-hisztón H3 (Upstate), 5 µg anti-acetil-hisztón H4 (Upstate), anti-Src (Santa Cruz Biotech), anti-Yes (Santa Cruz Biotech), anti-Fyn (Santa Cruz Biotech), anti-p53 (Santa Cruz Biotech), anti-Rb (Santa Cruz Biotech), anti-Y416-Src (Cell Signaling), anti-actin (Sigma-Aldrich), anti-egér-HRP (Santa Cruz Biotech), anti-nyúl-HRP (Santa Cruz Biotech).

PCR oligonukleotidok (Sigma-Aldrich), TaqMan Gene Expression Assay-k (Life Technologies).

Módszerek

Primer sejtek, sejtvonalak és betegminták

A perifériális mononukleáris sejteket (PBMC) egészséges donorok perifériás vénájából vett vérből illetve köldökszinórból nyert vérből izoláltuk Hypaque-Ficoll gradiens centrifugálással. Az izolált sejteket RPMI 1640 tápfolyadékban tenyésztettük, amelyet 100 U/ml penicillinnel, 100 µg/ml streptomycinnel, 2 mM L-glutaminnal és 10% borjúsavóval egészítettük ki.

A *cervix carcinoma* eredetű sejtvonalakat (HeLa, SiHa, CaSki, HT-3 és C-33A) és az *in vitro* transzformált, szövettanilag egészséges bőrből származó keratinocita HaCaT sejtvonalat DMEM tápfolyadékban tenyésztettük, amelyhez 10% borjúsavót, 2 mM L-glutamint és 1 % antibiotikumot adtunk (100 U/ml penicillin és 100 µg/ml streptomycin végkoncentrációban). A *cervix carcinoma* eredetű sejtvonalak közül a C-33A és HT-3 epiteliális sejtvonalak nem hordoznak HPV DNS-t, míg a SiHa 1-2 kópia integrálódott HPV 16 genomot, a CaSki hozzávetőleg 600 kópia integrálódott HPV 16 genomot hordoz sejtenként, a cervix adenocarcinoma eredetű HeLa pedig HVP 18 szekvenciákat tartalmaz.

A primer humán keratinocitákat speciális szérummentes DM-SFM tápfolyadékban tenyésztettük.

A kontroll LXSXN retrovírus vektorral illetve a HPV 16 E6 vagy E7 illetve mindkét virális onkogénnel transzdukált humán keratinocitákat Dr. Veress Györgytől kaptuk kísérleteinkhez. Ezeket a sejtvonalakat a sejtprolifерációt elősegítő szérummentes DM-SFM tápfolyadékban, valamint a sejtek differenciációját kiváltó 1,8 mM kalciummal és 10% borjúsérummal kiegészített DMEM tápfolyadékban tenyésztettük. A sejteket 37 °C-on, 95%-os páratartalom és 5%-os CO₂ koncentráció mellett tartottuk.

A *cervix carcinoma* eredetű szövetmintákból (n=10) és az exfoliált cervikális epiteliális sejtekből (n=3) izolált archivált DNS minták munkacsoportunk korábbi vizsgálataiból származtak (Szarka és mtsai., 2000; Szőke és mtsai., 2004).

RNS izolálás és RT-PCR

Az RNS-t trizol (Tri-Reagent, Sigma-Aldrich) alkalmazásával izoláltuk a sejtekből. Hozzávetőleg 10⁶ db sejtet 500 µl trizolban felfuszpendáltunk, majd szobahőmérsékleten inkubáltunk 10 percig. Ezt követően 100 µl kloroformot adtunk a mintához és ismét inkubáltunk 10 percig szobahőmérsékleten. Ezután a mintákat centrifugáltuk 13000 g fordulatszámon, 15 percig, 4 °C -on. A centrifugálás során a minta három fázisra vált szét, a

felső vizes fázisból az RNS-t 250 µl izopropanollal 10 percen át, szobahőmérsékleten precipitáltuk. Centrifugálást (13000 g, 15 perc, 4 °C) követően az RNS üledéket mostuk 75%-os etanollal, szárítottuk, végül pedig 50 µl dietil-pirokarbonátot tartalmazó desztillált vízben oldottuk fel. Az izolált RNS koncentrációját spektrofotométerrel határoztuk meg.

Az IL-10 mRNS expresszió vizsgálatához a reverz transzkripció reakciót Enhanced Avian HS RT-PCR kit (Sigma-Aldrich) alkalmazásával végeztük: 2 µg RNS mintát 20 pmol antiszenz primerrel inkubáltuk 75 °C-on 10 percen keresztül majd reverz transzkriptáz enzimet tartalmazó master mixet adtunk mintához és 48 °C -on 20 percig, ezt követően pedig 50 °C -on 30 percig inkubáltuk. A cDNS-PCR-hez a JumpStart™ Accu Taq™ LA DNA polimeráz enzimet alkalmaztunk. Kontrollként a konstitutívan expresszálódó savanyú riboszómális foszfoprotein P0 (RPLP2) mRNS kimutatását használtuk. Az oligonukleotid primerek szekvenciáit, valamint a reakciók körülményeit az 3. táblázat tartalmazza.

3. táblázat IL-10 cDNS PCR primer szekvenciák és kondíciók

Célgén		Primer szekvenciája (5'→3')	Amplikon méret	PCR kondíciók			
				Hőmérsékleti profil			Ciklusok
IL-10	f	TCAAGGCGCATGTGAACTCC	241 bp	94 °C	60 °C	68 °C	35×
	r	GTCGCCACCCTGATGTCTCA		15 sec	30 sec	60 sec	
RPLP2	f	AGATGCAGCAGATCCGCAT	151 bp	95 °C	58 °C	68 °C	30×
	r	ATATGAGGCAGGAGTTCTCCAG		15 sec	30 sec	60 sec	

f: forward primer, r: reverz primer

Az Src, Yes és Fyn kinázok mRNS expressziójának vizsgálatához az RNS-t a fent leírtakkal megegyezően trizollal izoláltuk (Tri-Reagent, Sigma-Aldrich), majd a reverz transzkripciót 2 µg RNS mintából random hexamer oligonukleotidokkal a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies) alkalmazásával végeztük a gyártó utasításainak megfelelően.

DNS izolálás és modifikálás nátrium-biszulfittal a metilációs mintázat vizsgálatához

A sejtekből a genomi DNS izolálásához hozzávetőleg 10⁶ db sejtet 2 ml TBE pufferben felszuszpendáltunk majd három órán át emésztettünk 400 µg proteináz-K és 100 µg RNáz-A kezeléssel. Ezt követően a nukleinsavak elkülönítéséhez egy mintatérfogatnyi fenol:kloroform:izoamil-alkohol elegyet használtunk, majd 2,5 térfogatnyi 96%-os etanol és 1/10 térfogatnyi 2,5 M-os nátrium-acetát (pH 5,5) elegyével precipitáltuk a DNS-t. A precipitátumot 100 µl TE pufferben (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) oldottuk fel.

5-5 µg DNS-t 100 µl térfogatra hígítottunk desztillált víz segítségével, majd 11 µl 3M nátrium-hidroxidot adtunk a mintákhoz és 42 °C -on 20 percen át denaturációt végeztünk. Ezt követően 60 µl Hidroquinon és 1000 µl 3,6 M nátrium-biszulfit hozzáadása után 55 °C -on 16 órán keresztül inkubáltuk a mintákat. A modifikált DNS-t GeneClean kit (Qiagen) felhasználásával tisztítottuk a gyártó utasításainak megfelelően, majd 96%-os etanollal precipitáltuk és 50 µl TE pufferben oldottuk fel.

A modifikált DNS szekvenálásához a Frommer és mtsai. által kifejlesztett eljárást alkalmaztuk, amelyet Myöhänen és mtsai. adaptált automata szekvenátorhoz. A nátrium-biszulfittal módosított DNS-ből a proximális IL-10 promoter átfedő szakaszait amplifikáltuk nested PCR módszerrel a 4. táblázatban feltüntetett primerek és kondíciók alkalmazásával.

4. táblázat Nátrium-biszulfittal modifikált DNS-ből IL-10 promoter szakaszok amplifikálására alkalmazott PCR primerek és kondíciók

Célgén		Primer szekvenciája (5' → 3')	Primer pozíciója	PCR kondíciók			
				Hőmérsékleti profil			Ciklusok
IL-10 első kör	f	GGTAGGGGTTATGGTGAGTATTATTGA		95 °C	56 °C	68 °C	34×
	r	CCTAAACTAACCTCACCCCAATC		30 sec	45 sec	60 sec	
IL-10 belső kör, szekvenáló primerek	f	GTAAAACGACGGCCA-GAATGAGAATTATAGTTGAGGGTTT	-349/-324	95 °C	63 °C	68 °C	34×
	f	GTAAAACGACGGCCA-GGATAGTTGAAGAGGTGGAATATG	-681/-657	30 sec	45 sec	60 sec	
	r	CCCTAATATATAAACCTTCACCTCTC	-39/-14				

f: forward primer, r: reverz primer

Az 50 µl végtérfogatú első körös reakcióelegy az alábbiakat tartalmazta: 2 µl Na-biszulfittal módosított DNS, 20 pmol mindkét primerből, 2× Eppendorf HotMasterMix (Merck). Az első PCR során létrejött amplimereket a második PCR során templatként használtuk fel. A nested reakcióhoz használt antiszenz primer biotinnal volt jelölve az 5' végén, a szenz primerek 5' végéhez pedig az M13 univerzális primer 15 nukleotidból álló szakasza (GTAAAACGACGGCCA) volt kapcsolva. Az 50 µl végtérfogatú második reakcióelegy az alábbiakat tartalmazta: 5 µl első körös PCR amplimer, 20 pmol mindkét primerből, 2× Eppendorf HotMasterMix (Merck).

A belső („nested”) PCR reakció termékeit streptavidinnel fedett mágneses gyöngyök (Dyna) segítségével tisztítottuk, majd az amplimereket Alflexpress Autoread Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech) segítségével szekvenáltuk a gyártó által megadott protokoll szerint. A szekvenálásnál alkalmazott primerek az M13 univerzális oligonukleotiddal voltak

komplementerek. A reakciótermékeket akrilamid gélen elemeztük automata DNS szekvenáló alkalmazásával (ALF express Genetic analyzer, Amersham Pharmacia Biotech).

Kromatin immunprecipitáció (ChIP)

A kromatin immunprecipitációt a Kuo és Allis (1999) által kidolgozott eljárás alapján végeztük, kisebb módosításokkal.

PBMC, HaCat, HeLa és pHKC sejteket 1%-os formaldehydben fixáltunk 25 °C -on 10 percig, majd 0,125 M glicin hozzáadásával állítottuk le a DNS-fehérje keresztkötések kialakulását. A sejteket kétszer mostuk jéghideg PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM foszfát puffer, pH 8,0) oldattal, amely proteáz inhibitorokkal volt kiegészítve (Complete Protease Inhibitor Cocktail; Roche). Ezt követően a sejteket lízis-pufferben (1% SDS, 10 mM EDTA, és 50 mM Tris-HCl és proteáz inhibitorok, pH 8,0) lizáltuk, majd a lizátumból szonikálással hoztunk létre 200 és 1000 bázispár közötti fragmentumokat 10x 10 másodperces impulzusok alkalmazásával. 100 µl lizátumból DNS-t izoláltunk fenol-kloroformos extrakcióval a korábban leírt eljárásnak megfelelően és agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a szonikálás hatékonyságát.

A sejt-lizátumot dilúciós pufferrel (0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1,2 mM EDTA, 167 mM NaCl, 16,7 mM Tris-HCl, pH 8,0) hígítottuk és lazac sperma DNS/protein G agaróz gyöngyökkel 3 órán át 4 °C -on inkubálva távolítottuk el protein G agarózhoz nem specifikusan kötődő fehérjéket. 10 µl előtisztított kromatint eltettünk -70 °C-ra („input” kromatin). A kromatin mintákat három részre osztottuk majd 5 µg anti-acetil-hisztón H3, 5 µg anti-acetil-hisztón H4 antitest, valamint egérben termeltetett IgG jelenlétében inkubáltuk egy éjszakán keresztül, 4 °C-on. A DNS-protein-ellenanyag komplexeket lazac sperma DNS/Protein G agaróz gyöngyök segítségével kötöttük meg 500 µl térfogatú reakcióelegyet inkubálva 4 °C -on 3 órán át. Ezt követően a mintákat mostuk egyszer 1 ml alacsony só-tartalmú pufferrel (1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl és 150 mM NaCl, pH 8,0), egyszer 1 ml magas só-tartalmú pufferrel (0,1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 8,0), egyszer 1 ml LiCl tartalmú pufferrel (0,25 M LiCl, 1% NP-40, 1% deoxikólsav, 1 mM EDTA, pH 8,0), és végül kétszer TE (pH 8,0) pufferrel. A mosott gyöngyökhöz 100 µl TE puffert adtunk, illetve a korábban eltett „input” mintát is 100 µl-re egészítettük ki TE pufferrel, majd éjszakán át 65 °C -on 1 µg RNázal inkubáltunk. Következő nap a mintákhoz 2 µl 0,5% SDS-t és 20 µg proteináz K-t adtunk, és 3 órán keresztül 45 °C -on inkubáltuk őket. A DNS-t PCR tisztító kittel (Qiagene) tisztítottuk. A

kinyert DNS fragmentumokat újra feloldottuk 50 µl TE pufferben (pH 8.0) és valós idejű PCR módszerrel analizáltuk.

Kvantitatív valós idejű PCR

Az immunprecipitátumból az IL-10 promoter-specifikus DNS szakaszok meghatározását valós idejű PCR-rel végeztük az ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Life Technologies) alkalmazásával. Az 5. táblázatban felsorolt PCR primereket úgy terveztük meg, hogy az IL-10 promoterének olyan 100-150 bázispárnyi szakaszait amplifikálják, amelyek ismert, az IL-10 promoter aktivitását szabályozó ismert transzkripció faktor kötőhelyeket tartalmaznak.

5. táblázat *Immunprecipitátumokból IL-10 promoter szakaszok amplifikálására alkalmazott PCR primerek és kondíciók*

Primer neve		Primer szekvenciája (5'→3')	Amplifikált régió	PCR kondíciók		
				Hőmérsékleti profil		Ciklusok száma
10CH1	f	GGGACAGCTGAAGAGGTGGA	-669/-531	95 °C	60 °C	40×
10CH1R	r	CCTCAAAGTTCCCAAGCAGC		20 sec	60 sec	
10CH7	f	AGGGAGGCCTCTTCATTCA	-233/-70	95 °C	60 °C	40×
10CH7R	r	GGGACAGCTGAAGAGGTGGA		20 sec	60 sec	

f: forward primer, r: reverz primer

A 20 µl végtérfogatú reakcióelegy az alábbi komponenseket tartalmazta: 5 µl immunprecipitátum, 5 pmol mindkét primerből, 2× SYBR Green PCR MasterMix (Life Technologies). A minták denaturálását (95 °C, 10 perc) követően a 3. táblázatban feltüntetett paraméterek alkalmazásával végeztük a DNS amplifikációt. A fluoreszcens jel detektálása a 60 °C-on 1 percig végzett inkubálási lépés során történt. Az input DNS-ből tízszeres hígítási sort készítettünk, ennek a segítségével állapítottuk meg az immunprecipitátumokból felszaporodó amplimerek mennyiségét.

Az Src, Yes és Fyn kinázok mRNS expressziójának vizsgálatát TaqMan valós idejű PCR-rel végeztük az ABI Prism 7500 Sequence Detection System (Life Technologies) alkalmazásával. A 20 µl végtérfogatú reakcióelegy az alábbi komponenseket tartalmazta: 2 µl cDNS, 2× TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), 1 µl TaqMan Gene Expression Assay [Src: Hs01082246_m1, Yes: Hs01080041_g1, Fyn: Hs00941600_m1, GAPDH: 0711024 (Life Technologies)].

Plazmid konstrukciók

A proximális IL-10 promoter 1089 bp és 618 bp hosszúságú szakaszait amplifikáltuk AccuTaqLA DNS polimeráz enzim (Sigma-Aldrich) és a 6. táblázatban feltüntetett primerek segítségével. A PCR termékeket preparatív agaróz gélben elektroforetizáltuk majd az agaróz gélből kivágva tisztítottuk Quiaquick Gel Extraction Kit (Qiagene) segítségével a gyártó utasításai szerint.

6. táblázat Plazmid konstrukciók készítéséhez IL-10 promoter szakaszok amplifikálására alkalmazott PCR primerek és kondíciók

Primer neve		Primer szekvenciája (5'→3')	Amplifikált régió	PCR kondíciók			
				Hőmérsékleti profil			Ciklusok
IL-10G	f	CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG	-1102/-14	95 °C	58 °C	68 °C	35×
10CH8R	r	CCCTGATGTGTAGACCTTCACC		15 sec	30 sec	60 sec	
10CH2	f	GGTAAAGGAGCCTGGAACACA	-631/-14	95 °C	58 °C	68 °C	35×
10CH8R	r	CCCTGATGTGTAGACCTTCACC		15 sec	30 sec	60 sec	

f: forward primer, r: reverz primer

A PCR termékeket először Xa-2 plazmidba ligáltuk (PinPoint™ Xa-2 Vector, Promega), majd az Xa-2 plazmidból helyeztük át pGL2 reporter plazmidba (pGL2-Basic Luciferase Reporter Vector, Promega).

A ligálási reakció előtt 2 µg Xa-2 plazmidot emésztettünk tompa véget eredményező EcoRV (20 U) restrikciós enzimmal 37 °C-on 3 órán át, majd a restrikciós emésztés után a hasított Xa-2 plazmidok 3' tompa végére 1-1 túlnyúló timidin nukleotidot illesztettünk a Taq polimeráz enzim segítségével (Go Taq DNS Polymerase, Promega). A 2 µg plazmid DNS, 5 U Taq polimeráz, 5 mM dTTP, 25 mM MgCl₂ és 5× PCR puffer tartalmú, 50 µl végtérfogatú T-addíciós reakcióelegyet 30 percen át inkubáltuk 72 °C-on. Ezáltal könnyebbé vált az inzertek vektorba ligálása, mivel a Taq polimeráz azok PCR amplifikációja során az amplimerek 3' végeire 1-1 adenint illesztett. A reakciótermékeket preparatív agaróz gélben elektroforetizáltuk, majd az amplimereket a megfelelő sáv kivágása után a Quiaquick Gel Extraction Kit (Qiagene) segítségével tisztítottuk.

A tisztított PCR termékeket az Xa-2 vektorba ligáltuk T4 DNS ligáz enzim segítségével. A 0,5 µl Xa-2 vektort, 1 U T4 ligáz enzimet, 2 µl tisztított PCR terméket tartalmazó reakcióelegyet éjszakán át 16 °C-on inkubáltuk. Másnap a ligációs, valamint a kontroll elegyeket olvadó jégen lehűtöttük, majd a ligált plazmiddal, valamint az inzertet nem

tartalmazó vektorokkal XL1 *Escherichia coli* kompetens baktériumokat transzformáltunk az alábbi módon:

100-100 µl baktériumszuszpenziót adtunk a ligációs és a kontroll elegyekhez és kevergetés mellett 10 percig olvadó jégen tartottuk, majd glükózzal kiegészített 900 µl TSB (Trypton Soy Broth) [Luria-Bertani (LB) tápfolyadék, 10 % polietilén-glikol, 5 % DMSO, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 2,0 mM glükóz] mértünk az elegyekhez és 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk 400 rpm-en rázatva. Ezt követően 13000 rpm-en centrifugáltuk az elegyeket és a felülúszót részlegesen leöntöttük, majd az üledéket szuszpendáltuk. 100-100 µl-t szélesztettünk 100µl/ml ampicillin tartalmú szilárd agar táptalajra és a baktériumokat 37 °C-on tenyésztettük éjszakán át.

A kinőtt telepekből 1-1 kacsnyi baktériumot oltottunk 2-2 ml folyékony, 100 µg/ml ampicillin tartalmú LB táptalajba, majd 6 órán át 37 °C -on rázatva tenyésztettük a baktériumokat. Az alábbi eljárás szerint izoláltuk a plazmid DNS-t: 1 ml baktériumszuszpenziót 1,5 ml-es Eppendorf csőbe mértünk, majd 30 másodpercig 13000 g-n centrifugáltuk a sejteket. Ezt követően a pelletet szuszpendáltuk 100-100 µl P1 oldatban (50 mM glükóz, 25 mM TrisHCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,1 mg/ml RNáz) majd 5 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Ezután 200-200 µl P2 oldatot (0,2 N NaOH, 1 % SDS) mértünk a szuszpenzióhoz és 5 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. 150-150 µl P3 oldat (3M kálium-acetát, pH 4,8) hozzáadása után 2 másodpercig vortexeltük az elegyet és olvadó jégen inkubáltuk 5 percig. Újabb centrifugálást követően (3 perc, 13000 g) a felülúszóhoz 800 µl 96 %-os etanolt adva kicsaptuk a DNS-t, majd ismét centrifugáltunk (3 perc, 13000 g). Ezt követően 1 ml 70 % -os etanollal mostuk a csapadékot, végül 1 percig centrifugáltunk 13000 g-n. A felülúszót eltávolítottuk, a pelletet megszárítottuk, majd 30-30 µl TE pufferben visszaoldottuk a DNS-t. *EcoRI* és *BglIII* restriktációs enzimek együttes alkalmazásával állapítottuk meg, hogy mely transzformánsokba épült be a klónozott PCR termék, *SacI* hasítással pedig meg tudtuk állapítani a beépült termék irányultságát.

Az inzerteket ezután az Xa-2 plazmidból pGL2 reporter plazmidba klónoztuk át. Az IL-10 promoter szakaszokat 3 µg Xa-2 plazmid-konstruktokból *KpnI* és *BglIII* restriktációs enzimek (1U enzim/ µg plazmid DNS) segítségével vágtuk ki, ugyanezen enzimekkel hasítottunk 3 µg pGL2 plazmid poliklónozó régiójában is. Ezt követően az Xa-2 vektorból kivágott IL-10 promoter szakaszokat és az emésztett pGL2-Basic plazmidot ligálási reakció során egyesítettük T4 ligáz enzim alkalmazásával a korábban leírt protokollnak megfelelően.

A ligálási elegyekkel XL-1 *E. coli* kompetens baktériumokat transzformáltunk, majd a sikeresen transzformált, IL-10 promotert tartalmazó plazmid-konstruktot tartalmazó klónokat a plazmid DNS izolálását követő restrikciós hasításokkal határoztuk meg. Az 1089 bp inzertet hordozó transzformáns baktérium telepek meghatározását *Hind*III restrikciós enzimmel végeztük (10 U enzimmel emésztettünk 1 µg plazmid DNS-t), a 618 bp inzertet hordozó transzformáns baktérium telepek identifikálását pedig *Sac*I és *Sma*I enzimekkel hajtottuk végre (10-10 U enzimmel emésztettünk 1 µg plazmid DNS-t).

A sikeresen transzformált baktérium klónokból nagy mennyiségben izoláltuk a plazmid DNS-t: 100 µl baktériumszuszpenziót 100 ml ampicillin tartalmú LB táptalajba oltottunk és éjszakán át 37 °C-on rázatva tenyésztettük, majd másnap Wizard Plus Midipreps DNA Purification System (Promega) alkalmazásával a plazmid DNS-t a gyártó utasításainak megfelelően. Az izolált plazmid DNS-t 100 µl TE pufferben oldottuk.

Plazmid konstruktok SssI metiláz kezelése

Az IL-10 proximális promoter 1089 és 613 bp hosszúságú szakaszait tartalmazó pGL2 expressziós vektorokat S-adenozin metionin (metil-csoport donor) jelenlétében kezeltünk SssI metiláz enzimmel. A 10 µg plazmid DNS-t, 10U SssI metiláz enzimet és 1 µl S-adenozin-metionint tartalmazó metilálási reakcióelegyet 37 °C-on tartottuk 4 órán át. A plazmid DNS-t fenol-kloroform-izoamilalkohol segítségével tisztítottuk a korábban leírt eljárás szerint, majd 40-40 µl TE pufferben oldottuk fel a mintákat.

Metilációs kazetta assay

Az IL-10 proximális promoter 1089 és 613 bp hosszúságú szakaszait tartalmazó pGL2 expressziós vektorokat (20-20 µg), valamint inzertet nem tartalmazó pGL2-Basic plazmidot (60 µg) hasítottunk FastDigest™ *Kpn*I és *Bgl*II restrikciós enzimekkel (1 U enzim/µg plazmid DNS). Az emésztést 37 °C-on, 20 percen át végeztük. A hasítási reakció után a plazmid DNS-t precipitáltuk végeztünk 2,5x térfogatú 96% etanol és 1/10x térfogatú 2,5 M Na-acetát jelenlétében, amit 70% etanolos mosás követett. A tisztított DNS-t 20-20 µl TE pufferben oldottuk vissza. Agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük a hasítások hatásfokát.

Az emésztett pGL2 plazmid konstruktok fele mennyiségét (10 µg) SssI metiláz enzimmel kezeltük, a hasított minták másik felét enzimmentes elegyben inkubáltuk. A reakció során az enzim segítségével *in vitro* metiláltuk a CpG-dinukleotidokat. A 10 µg hasított plazmidot (vektor + inzert), 10 U SssI metiláz enzimet és 1 µl S-adenozin-metionint tartalmazó metilálási reakcióelegyet 37 °C -on tartottuk 4 órán át. Ezt követően preparatív

agarózban végzett gélelektroforézissel választottuk el a plazmidból kihasított metilált ill. metilálatlan inzerteket a plazmid DNS-től. A fragmentek kivágása után az inzert DNS-t QIAquick Gel Extraction Kit (Promega) segítségével nyertük vissza a gélből a gyártó utasításai szerint. A mintákat 30 µl TE pufferben eluáltuk.

Az agarózból visszanyert, tisztított metilált illetve metilálatlan inzerteket a *KpnI* és *BglII* restrikciós endonukleázokkal emésztett, metilálatlan pGL2-Basic plazmidba ligáltuk vissza T4 ligáz enzim alkalmazásával a korábban leírt eljárás szerint. A ligált plazmid DNS-t fenol-kloroform-izoamilalkohol segítségével tisztítottuk a korábban leírt eljárás szerint, majd 40-40 µl TE pufferben oldottuk fel a mintákat. A ligálás hatékonyságát agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük.

Tranziens transzfekció és luciferáz teszt

A szentjánosbogár luciferáz enzime egy kemilumineszcens reakciót katalizál, amely során az enzim a szubsztrátjával (luciferin) ATP jelenlétében fotonfelszabadulást eredményező oxidációs reakcióban reagál. A fotonfelszabadulás luminométerrel mérhető. A kísérleteinkhez használt pGL2 reporter plazmid konstruktok tartalmazzák a luciferáz enzimet kódoló *luc* gént, amelynek átíródását – így a luciferáz aktivitását is – a *luc* gén elé helyezett promoter aktivitása határozza meg. Ez a rendszer tehát alkalmas annak a megállapítására, hogy a CpG metiláció hatással van-e a *luc* gén elé ligált IL-10 promoter aktivitására.

6 cm átmérőjű sejtenyészítő plate-eken tenyésztett cervix carcinoma eredetű HeLa sejteket transzfektáltunk 10-10 µg metilált illetve metilálatlan IL-10 promoter szakaszokat tartalmazó metilált vagy metilálatlan pGL2 reporter plazmid konstrukttal LipofectamineTM 2000 reagens (Invitrogen) alkalmazásával. A transzfektálást követő 48 óra múlva vizsgáltuk a promoterek expressziós aktivitását luciferáz teszt alkalmazásával (Luciferase Assay System with Reporter Lysis Buffer, Promega). A sejtlizátum luciferáz aktivitását luminométer (Digene Diagnostics, DCR-1) segítségével mértük. Ezt követően Bradford-féle fehérjekoncentráció mérést végeztünk, így normalizáltuk adatainkat a sejtszámra.

Fehérje izolálás

Az Src családba tartozó kinázok (Src, Fyn, Yes) fehérje expressziójának meghatározása és aktív állapotukat jelző tirozin-foszforilációjuk vizsgálata Western blot módszerrel történt. A HPV 16 E6-tal, E7-tel vagy mindkét onkogénnel, illetve a kontroll LXSXN vektorral transzdukált proliferáló vagy differenciálódó HFK sejteket tripszines kezeléssel elválasztottuk a tenyésztőflaskák aljától, majd a teljes celluláris fehérjetartalom

izolálását végeztünk proteáz gátló (Complete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail, Roche) és foszfatáz gátló szereket (1 mM Na_3VO_4 , 1 mM NaF) tartalmazó RIPA lízis pufferrel (150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,5% (w/v) Na-dezoxikolat, 0,1% (w/v) SDS, 0,01% Na-azid (pH 7.4), 1,0 mM EDTA). A lízis pufferben a sejteket 15 percig jégen inkubáltuk, majd centrifugáltuk 13000 rpm-en 15 percig 4 °C -on. A fehérjéket tartalmazó felülúszók összfehérje koncentrációját Bradford teszt segítségével határoztuk meg.

Western blot

A fehérje izolátumokat Laemmli pufferrel inkubáltuk 95°C -on 5 percig, majd a fehérjéket vertikális gélelektroforézissel választottuk el 10%-os SDS-poliakrilamid gélben Bio-Rad Mini Protean II készülék alkalmazásával. Ezt követően a fehérjéket nitrocellulóz membránra blottoltuk át Bio-Rad transzfer rendszer segítségével 90 V-on, 90 percig [transzfer puffer: 25 mM Tris-HCl (pH 8,3), 192 mM glicin, 0,02% 10% (v/v) metanol]. A nitrocellulóz membrán apecifikus kötő helyeit az elsődleges antitestek alkalmazása előtt 3% BSA-t tartalmazó PBST oldattal [PBS (pH 7,2), 0,05% (v/v) Tween20] blokkoltuk. Ezt követően a membránokat éjszakán át 4 °C-on vagy két órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a 3% BSA-t tartalmazó PBST oldatban hígított elsődleges antitestekkel (egér monoklonális anti-p53, egér monoklonális anti-Rb, egér monoklonális anti-Src, egér monoklonális anti-Yes, egér monoklonális anti-Fyn, nyúl poliklonális anti-Y416 Src, nyúl poliklonális anti-aktin). A membránokat 3×10 percig mostuk PBST-vel, majd 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a torna-peroxidázzal jelölt másodlagos antitestekkel. Az immunreakciók detektálását nagy érzékenységgű, kemilumineszcens detektáláson alapuló előhívó oldattal végeztük (Super Signal® West Dura Chemiluminescent Substrate, Pierce) röntgenfilm alkalmazásával.

Protein foszforiláció vizsgálata

Az Src kináz család tagjainak egyedi foszforilációs állapotának vizsgálatára a Human Phospho-Kinase Array Kit-et (Proteome Profiler Array, R&D Systems) alkalmaztuk, amely 43 kináz és 2 egyéb fehérje specifikus pozíciókban elhelyezkedő tirozin vagy szerin aminosavakon foszforilált állapotának egyidejű detektálását teszi lehetővé. A teszthez alkalmazott nitrocellulóz membránok felületére az egyes kinázok foszforilált állapotára specifikus „capture” antitestek vannak kötve meghatározott pozícióban elhelyezkedő spot-ok területén. Minden egyes „capture” antitestet tartalmazó spot duplikátumban található a membránokon.

A HPV 16 E6, E7 vagy mindkét onkogénnel illetve a kontroll LXS_N vektorral transzdukált proliferáló HFK sejteket lizáltuk a tesztben található lízis puffert alkalmazva. A sejtlyázumokat a foszfokináz teszt nitrocellulóz membránjaira mértük és éjszakán át inkubációt végeztünk 4 °C-on. Mosási lépéseket követően a membránokat 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk a torma-peroxidázzal jelölt anti-humán másodlagos antitestekkel. Az immunreakciók detektálását nagy érzékenységű, kemilumineszcens detektáláson alapuló előhívó oldattal végeztük (Super Signal[®] West Dura Chemiluminescent Substrate, Pierce) röntgenfilm alkalmazásával. A foszfokináz array eredményeinek kiértékeléséhez denzitometriával határoztuk meg a spot denzitásokat (NIH ImageJ software, version 1.46). Egy mérési sorozaton belül az üres üres LXS_N vektort hordozó sejtvonalban két párhuzamosban mért denzitás értékek átlagát vettük viszonyítási alapként.

Statisztikai analízis

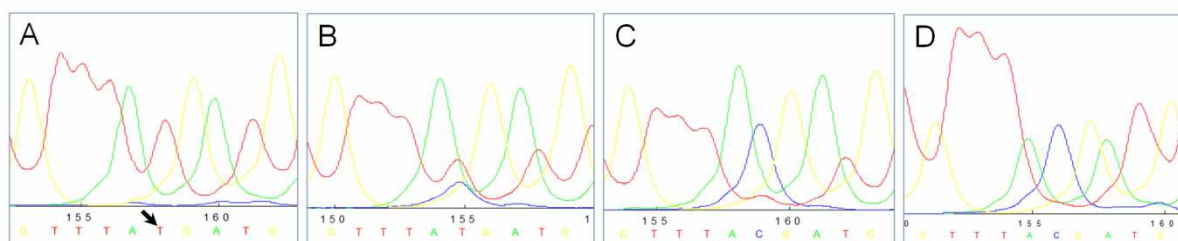
A TaqMan valós idejű PCR eredmények kiértékelésekor a komparatív Ct módszert alkalmaztuk relatív kvantifikációra (7500 System SDS Software, version 1.4, Life Technologies). A szignifikancia meghatározására Student t tesztet használtunk a $P < 0,05$ értéket tekintve szignifikánsnak.

EREDMÉNYEK

Az IL-10 expresszió epigenetikai gátlásának vizsgálata humán keratinocitákban és epiteliális sejtekben

Az IL-10 promoter CpG metilációs mintázatának és az IL-10 mRNS expresszió összefüggésének vizsgálata epiteliális illetve leukocita eredetű humán sejtekben

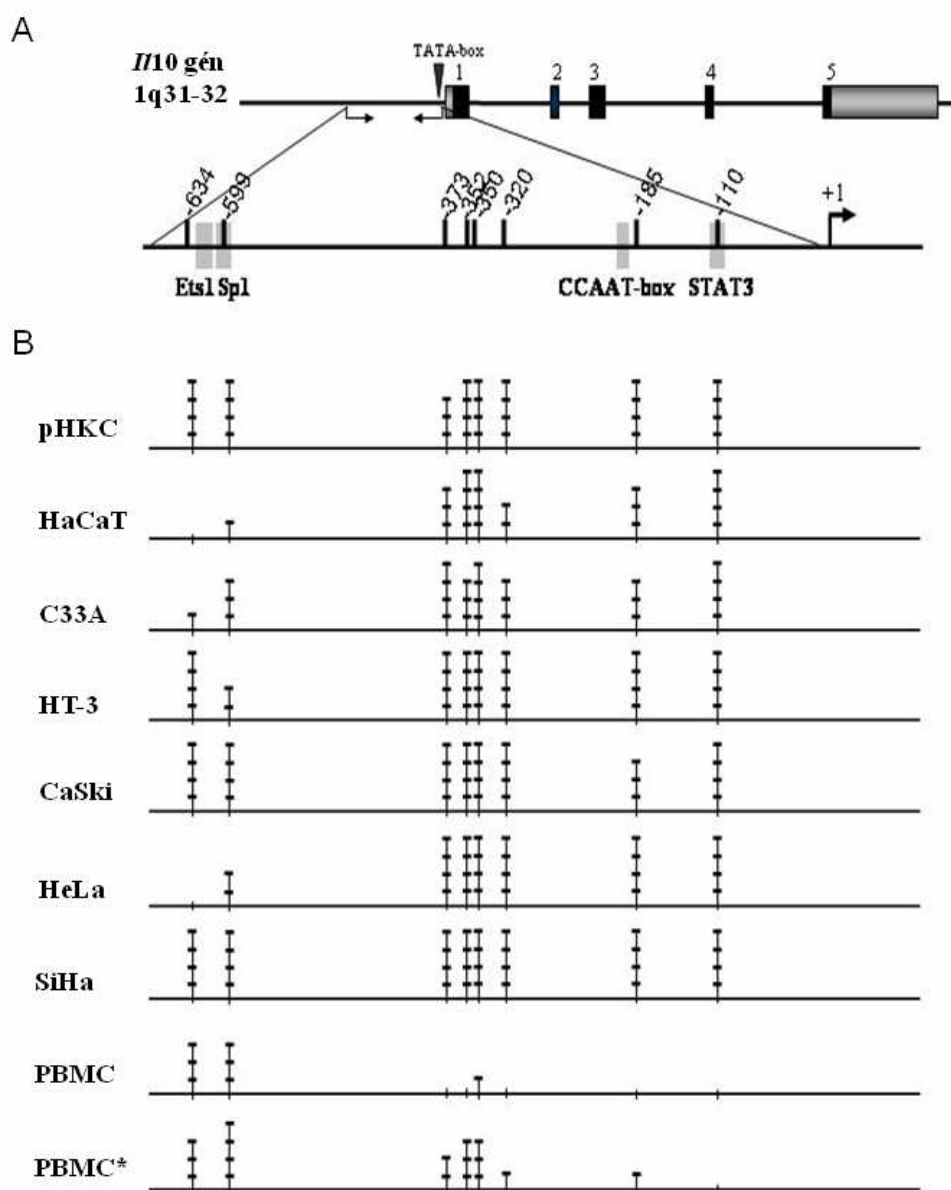
Az IL-10 promoter proximális szakaszának CpG metilációs mintázatát nátrium-biszulfitos modifikálást követő DNS szekvenálással vizsgáltuk PBMC sejtekben, keratinocita (pHKC, HaCaT) valamint méhnyakrák eredetű epiteliális (C-33A, HT-3, CaSki, HeLa, SiHa) sejtekben. A DNS nátrium-biszulfitos kezelésének hatására a metilálatlan citozin nukleotidok uracillá alakultak át, míg a DNS mintában jelenlévő metilált citozinok változatlan formában maradtak. Ennek következtében a Na-biszulfittal kezelt nukleinsav a kémiai módosítás után különbözött attól függően, hogy az eredeti szekvencia metilált vagy metilálatlan volt, így a DNS-ben előforduló 5-metilcitozin lokalizálása lehetővé vált automata DNS szekvenáló alkalmazásával. A 4. ábra mutatja, hogy ezzel a módszerrel meg tudtuk állapítani, hogy az egyes CpG dinukleotidok citozin bázisai milyen mértékben voltak metiláltak az adott lókuszon a vizsgált sejttypusban.



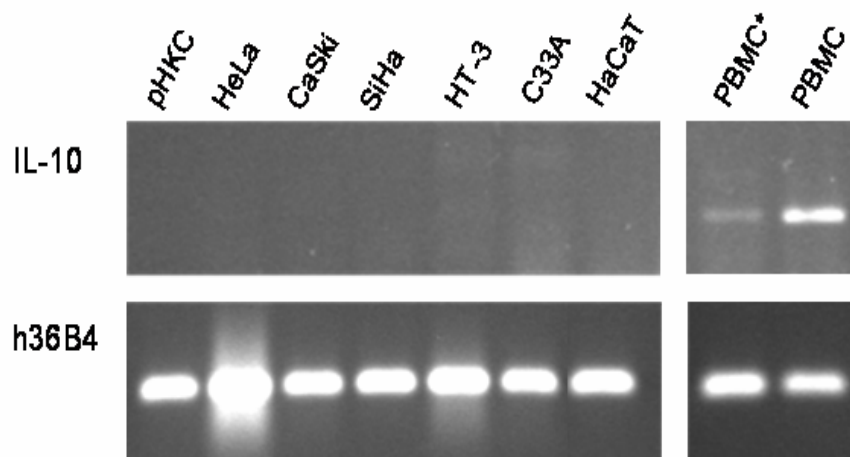
4. ábra Reprezentatív elektroferogramok az IL-10 promoterben a -320. pozícióban elhelyezkedő citozin metilációs állapotáról. A metilálatlan citozin uracillá modifikálódik a nátrium-biszulfit kezelés hatására és timinként jelenik meg a PCR termék szekvenálása során (fekete nyíl) (A). Abban az esetben, hogyha az adott sejttypusban az adott citozin csak a sejtek egy részében volt metilált, timin (modifikált citozin) és citozin (nem módosult, metilált) bázisok is jelen vannak ugyanabban a pozícióban (B, C). Ha az adott citozin bázis teljesen metilált a sejtvonalba, akkor csak a citozinnak megfelelő jelet látjuk az elektroferogramon (D).

Az általunk tanulmányozott promoter szakaszon nyolc CpG dinukleotid található az 5. ábrán feltüntetett pozíciókban. A szekvenási eredmények szerint az IL-10 termelésére képes PBMC sejtekben a proximális promoter szakasz teljesen metilálatlan volt, míg az IL-10 expressziójára képtelen keratinocita és epiteliális sejtekben metilálnak bizonyult. A 6. ábrán

az egyes sejtvonalak RT-PCR eredményeit tüntettük fel. Látható, hogy IL-10 mRNS-t csak a PBMC sejtekben tudtunk detektálni.



5. ábra A proximális IL-10 promoter metilációs mintázata a szekvenálási eredmények alapján. A humán IL-10 gén szerkezete a vizsgált promoter szakasz megjelölésével (A). A halványiszürke téglalapok az ismert transzkripciós faktor kötőhelyeket jelzik. A számozott oszlopok a kinagyított DNS szakaszon az egyes CpG dinukleotidok citozin bázisainak pozícióját jelzik. Az IL-10 promoter CpG metilációs mintázata (B). A CpG metiláció mértékét az oszlopok magassága mutatja az alábbi módon: csak a citozin pozíciója van jelezve: 0%; egy egység (τ): 0-25%; két egység: 26-50%; három egység: 51-75%, négy egység: 76-100%. (PBMC*: köldökzsínór vérből izolált PBMC). (Ets1: v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1, Sp1: Specificity Protein 1, STAT3: signal transducer and activator of transcription 3)



6. ábra Az *IL-10* promoter expressziós aktivitása. A keratinocita (pHKC, HaCaT) valamint az epiteliális (C-33A, HT-3, CaSki, HeLa, SiHa) sejtekből nem volt kimutatható az *IL-10* mRNS jelenléte. A PBMC sejtek képesek voltak az *IL-10* mRNS expressziójára. Pozitív kontrollként a konstitutívan termelődő RPLP2 mRNS kimutatását alkalmaztuk. (PBMC*: köldökszínórvérből izolált PBMC)

A vizsgált méhnyakrák eredetű sejtvonalak közül a HeLa HPV 18, a SiHa és a CaSki HPV 16 genomokat hordoznak eltérő kópiaszámokban. A magas onkogén kockázatú HPV-k jelenléte azonban nem volt hatással sem a proximális *IL-10* promoter metilációs mintázatára sem az *IL-10* gén expressziós aktivitására ezekben a sejtekben.

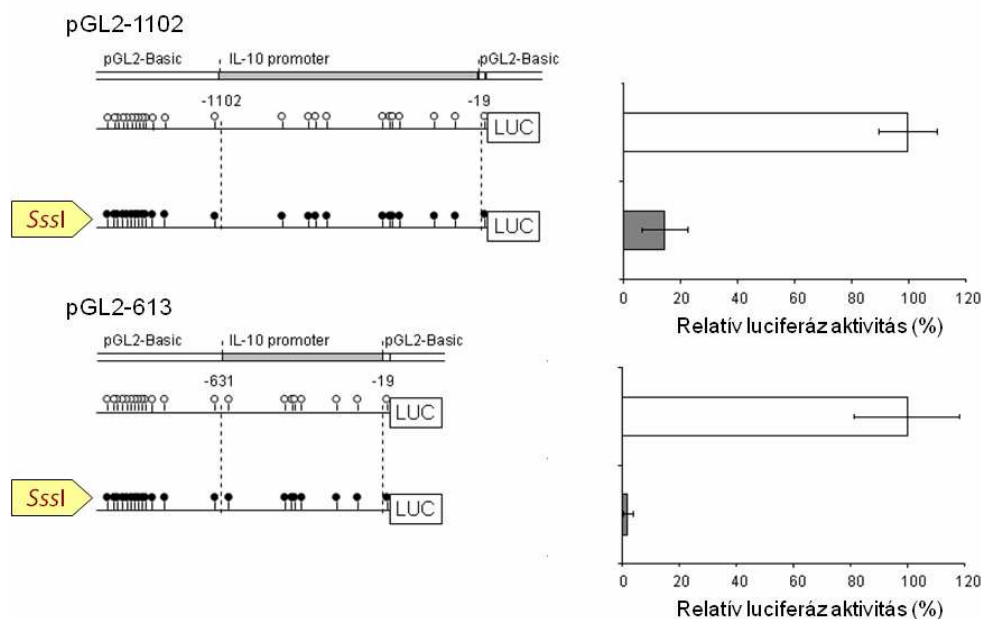
A proximális *IL-10* promoter CpG metilációs mintázatának vizsgálata egészséges exfoliált cervikális epiteliális sejtekben és méhnyakrák eredetű szövetmintákban

A sejtvonalak vizsgálata során megfigyelt metilációs mintázatok azt mutatták, hogy az *IL-10* promoterben a két legproximálisabban elhelyezkedő (-185 és -110) CpG dinukleotid metilációs állapota tér el a legmarkánsabban az *IL-10* termelő és nem termelő sejttypusok között. Annak igazolására, hogy a metilációs mintázatban tapasztalt különbségek nem az epiteliális sejtvonalak tenyésztése során indukálódtak, egészséges exfoliált cervikális epiteliális sejtekben (n=3) és *cervix carcinoma* szövetmintákban (n=10) is meghatároztuk a -185 és -110 CpG dinukleotidok metiláltságának mértékét. A -110 CpG teljesen metiláltnak bizonyult az egészséges és a méhnyakrák eredetű betegmintákban. A -185 CpG szintén nagy mértékben (75-100%) metilált volt a klinikai mintákban, azonban csak részleges metilációt (50-75%) tapasztaltunk 2 *cervix carcinoma* biopsziában.

IL-10 promoter szakaszok in vitro CpG metilációjának hatása a promoter expressziós aktivitására

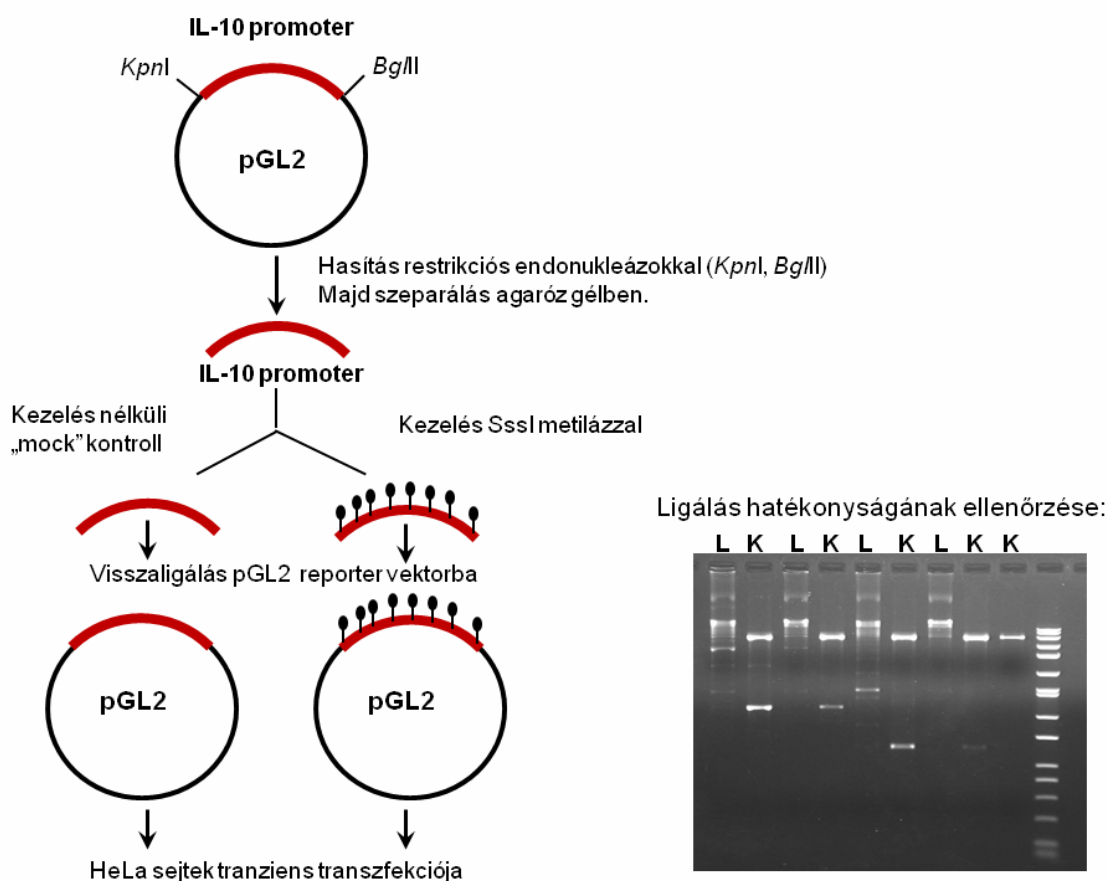
A teljes proximális IL-10 promotert (pGL2-1102), illetve az IL-10 promoter legproximálisabban elhelyezkedő 600 bp szakaszát (pGL2-613) hordozó reporter plazmid konstruktokat hoztunk létre, amelyek segítségével tanulmányozhattuk az *in vitro* CpG metiláció hatását az IL-10 promoter szakaszok transzkripció aktivitására. Ez úgy volt lehetséges, hogy a pGL2-vektor konstruktokban található luciferáz gént kódoló DNS szekvencia elé beillesztett promoter aktivitása határozta meg a luciferáz gén kifejeződését, amely a transzfektált sejtekben az enzim szubsztrátjának hozzáadása után luminométer segítségével volt mérhető.

A plazmid konstruktokkal *cervix carcinoma* eredetű HeLa sejtek tranziens transzfekcióját végeztük majd 48 óra múlva mértük a sejtizátumok luciferáz aktivitását.



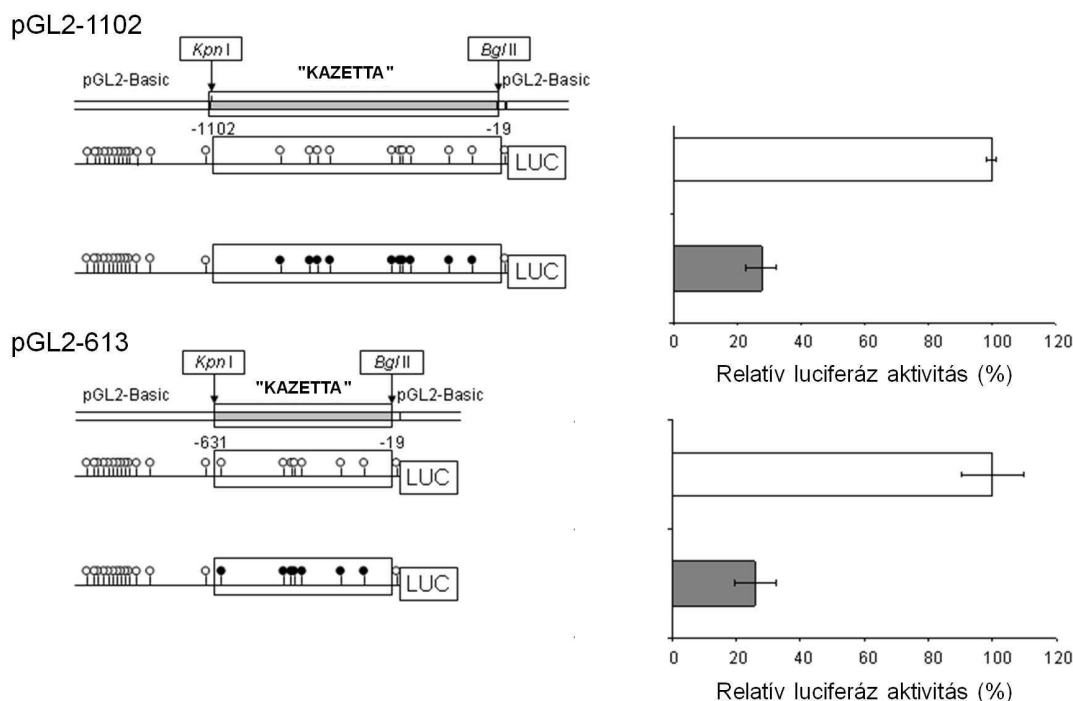
7. ábra Az IL-10 promoter szakaszokat tartalmazó pGL2 reporter plazmid konstruktok *in vitro* metilációjának hatása a promoterek transzkripció aktivitására. A teljes proximális IL-10 promotert (pGL2-1102), illetve az IL-10 promoter legproximálisabban elhelyezkedő 600 bp szakaszát (pGL2-613) hordozó, a CpG dinukleotidokat metilálatlan illetve metilált állapotban tartalmazó plazmid konstruktokkal *cervix carcinoma* eredetű HeLa sejteket tranziensen transzfektáltunk. A 7. ábra bal oldalán a fehér körök a metilálatlan, a feketék pedig a metilált CpG dinukleotidokat jelölik. Az ábra jobb oldalán látható oszlopdiagrammok a promoterek aktivitását mutatják be. A metilálatlan promoter szakaszokat hordozó vektor konstruktok luciferáz aktivitását egységnyinek tekintettük (fehér oszlopok) és a metilált promoter szakaszokat tartalmazó vektor konstruktok aktivitását ehhez viszonyítottuk (szürke oszlopok). Az ábrán három független kísérlet átlaga van feltüntetve, a hibasávok a standard deviációt mutatják. (SssI: metiláz)

A 7. ábrán látható, hogy a teljes plazmid konstrukt metiláz kezeléssel nemcsak az IL-10 promoter szekvenciák metilálódtak, hanem a pGL2 vektor CpG szekvenciái is. Annak érdekében, hogy a pGL2 vektor szekvenciájában található CpG dinukleotidok metilációjának hatását a promoteraktivitásra kizárhassuk, úgynevezett metilációs kazetta esszét végeztünk (8. ábra).



8. ábra Metilációs kazetta assay. Az eljárás során több lépésben, emésztési, metilálási és ligálási reakciók segítségével metilált és metilálatlan IL-10 proximális promotert tartalmazó pGL2-vektor konstruktokat hoztunk létre anélkül, hogy a pGL2 vektor metiláltsági állapotát befolyásoltuk volna. A ligálás hatékonyságát agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük. (L: ligáz tartalmazó reakcióelegy, K: ligáz enzim nélküli kontroll reakcióelegy.)

A metilációs kazetta assay során létrehozott plazmid konstruktokkal HeLa sejteket transzfektáltunk. A transzfektálást követő 48 óra múlva vizsgáltuk a sejtlizátumok felülúszójának luciferáz aktivitását. Az eredmények összehasonlíthatósága érdekében Bradford-féle fehérjeméréssel normalizáltuk adatainkat a sejtszámra.

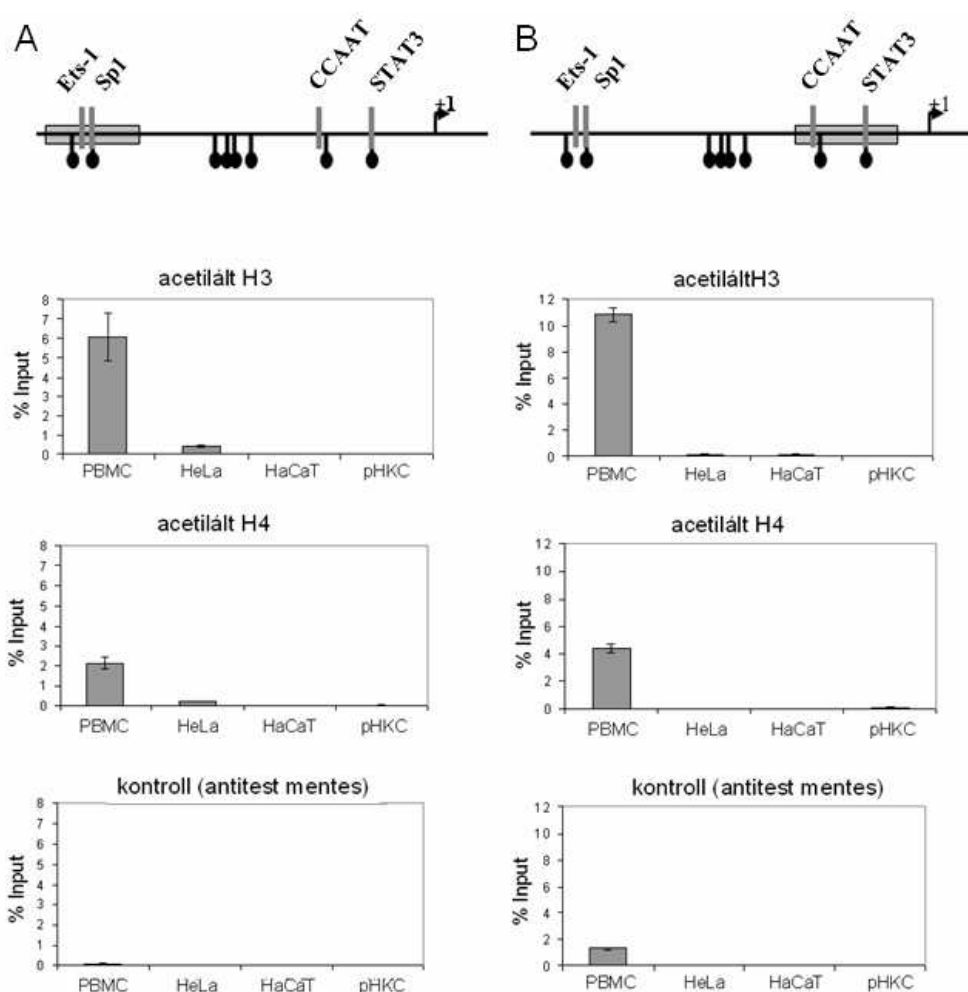


9. ábra Az IL-10 promoter *in vitro* metilációjának hatása a pGL2 reporter plazmid konstruktok transzkripció aktivitására metilációs kazetta assay alkalmazásával. A teljes proximális IL-10 promoter (pGL2-1102), illetve az IL-10 promoter legproximálisabban elhelyezkedő 600 bp szakaszának (pGL2-613) metilált illetve metilálatlan állapotát tartalmazó plazmid konstruktokat hoztunk létre. Az ábra bal oldalán a fehér körök a metilálatlan, a fekete körök pedig a metilált CpG dinukleotidokat jelölik. Az ábra jobb oldalán látható oszlopdiagrammok a promoterek aktivitását mutatják be. A metilálatlan promoter szakaszokat hordozó vektor konstruktok luciferáz aktivitását egységnyinek tekintettük (fehér oszlopok) és a metilált promoter szakaszokat tartalmazó vektor konstruktok aktivitását ehhez viszonyítottuk (szürke oszlopok). Az ábrán három független kísérlet átlaga van feltüntetve, a hibasávok a standard deviációt mutatják.

A luciferáz aktivitási eredmények kiértékelésekor a metilálatlan promoter szakaszokat hordozó vektor konstruktok luciferáz aktivitását egységnyinek tekintettük és a metilált promoter szakaszokat tartalmazó vektor konstruktok aktivitását ehhez viszonyítottuk. Az ábra jól szemlélteti, hogy a metilált IL-10 promotert hordozó plazmidok luciferáz aktivitása, tehát a metilált promoterek expressziós aktivitása lényegesen kisebb volt, mint a metilálatlan IL-10 promotert hordozóké.

Az IL-10 promoterhez társuló hiszton fehérjék acetilációs állapotának vizsgálata

Annak megállapítására, hogy az IL-10 promoter az aktív eukromatinban vagy az inaktív heterokromatinban helyezkedik-e el kromatin immunprecipitációt végeztünk PBMC, HaCaT, HeLa és pHKC sejtekből acetilált H3 és acetilált H4 specifikus antitestek segítségével. A reakció negatív kontrolljaként antitestmentes elegyben inkubált kromatint használtunk. Viszonyítási alapként úgynevezett 'input' mintát használtunk, amely a precipitáció előtti DNS mennyiséget tartalmazza. A precipitátumokban detektált DNS mennyiséget az 'input' százalékában fejeztük ki. Az IL-10 promoterre specifikus DNS szekvenciák kimutatása és kvantifikálása valós idejű PCR alkalmazásával történt (10. ábra).



10. ábra Az IL-10 promoterhez társuló H3 és H4 fehérjék acetilációs állapota PBMC-ben, primer humán keratinocitákban (pHKC) valamint HeLa és HaCaT sejtvonalakban. A valós idejű PCR során alkalmazott első primerpár a promoter -639 / -531 fragmentumát szaporította fel (A), a második primerpár pedig a -233 / -70 szakaszt (B). A hibásávok a valós idejű PCR adatok mennyiségi meghatározása során számolt standard deviációkat mutatják. (Ets1: v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1, Sp1: Specificity Protein 1, STAT3: signal transducer and activator of transcription 3.)

A proximális IL-10 promoter két kitüntetett – ismert transzkripciós faktor kötőhelyeket tartalmazó - szakaszát amplifikáltuk. A promoter -639 / -531 szakaszát amplifikáló első primerpár az Sp1 kötőhelyet tartalmazó régiót szaporította fel. A második primerpár a promoter STAT3 kötőhelyet hordozó -233 / -70 fragmentumát szaporította fel (9. ábra). Mindkét primerpár segítségével azt az eredményt kaptuk, hogy a vizsgált promoter szakaszok a PBMC sejtekben társulnak acetilált hiszton proteinekhez, amelyek a transzkripció szempontjából aktív eukromatinra jellemző állapotúak. Ezzel szemben a HaCaT, HeLa és pHKC sejtekben a vizsgált promoter szakaszok nem társultak acetilált hiszton fehérjékhez, tehát feltételezhetően a transzkripciósan inaktív heterokromatinban helyezkednek el.

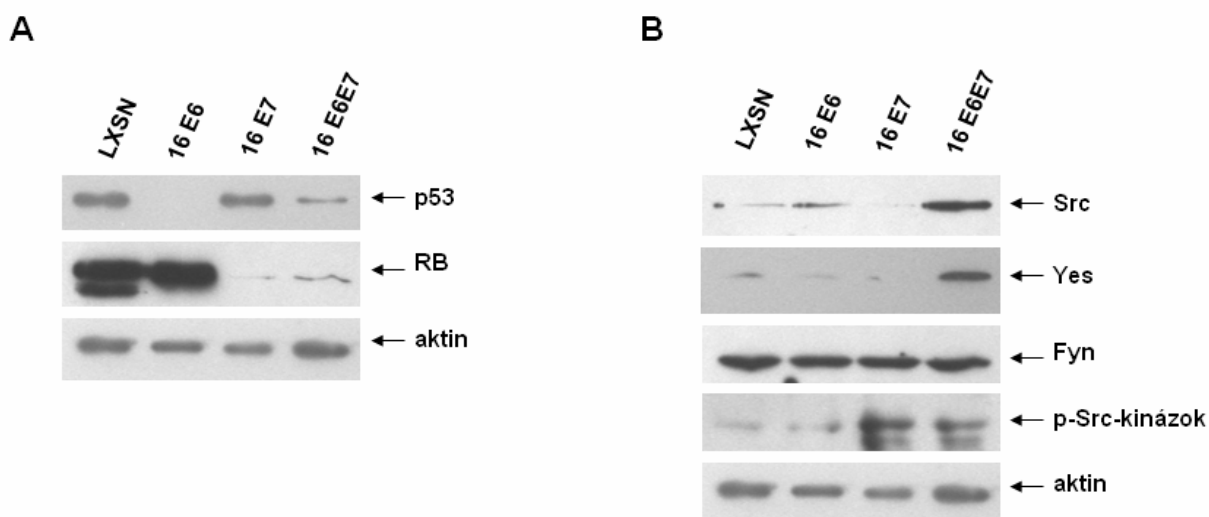
HPV 16 onkoproteinek hatásának vizsgálata az Src családba tartozó kinázok expressziójára és aktivitására humán keratinocitákban

A HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok fehérje expressziójára

A méhnyakrákos szövetmintákban leírt emelkedett Src kináz aktivitás felvetette azt a kérdést, hogy ezen citoplazmatikus protein-tirozin kinázok aktivitása lehet-e a HPV fertőzésnek, a cervix carcinoma legfontosabb etiológiai faktorának következménye. Ismert ugyanis, hogy a magas onkogén kockázatú HPV onkoproteinek úgy fejtik ki transzformáló hatásukat, hogy celluláris fehérjékkel kapcsolatba lépve megzavarják a sejtciklust és fokozott osztódásra készítetik a gazdasejtet.

Kíséleteinkhez HPV 16 E6, E7 vagy mindkét onkoproteint expresszáló humán keratinocita sejtvonalakat használtunk, amelyeket Dr. Veress György bocsátott rendelkezésünkre (Gyöngyösi és mtsai., 2012). A sejtvonalakat a sejtproliferációt elősegítő szérumentes tápfolyadékban tenyésztettük. A sejtvonalakban a funkcionálisan aktív E6 és E7 fehérjék expresszióját azok legfontosabb célfehérjeinek, a tumorszupresszor p53 és Rb proteineknek csökkent szintje mutatta, amelyet Western blot vizsgálattal igazoltunk (11/A ábra). Ezt követően először Western blot módszerrel tanulmányoztuk a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek egyedi illetve együttes hatását a keratinocitákban expresszálódó Src családba tartozó kinázok (Src, Yes, Fyn) fehérje expressziójára. Azt tapasztaltuk, hogy az E6 és E7 együttes jelenlétében az Src és Yes proteinek expressziója szignifikánsan emelkedett az üres vektort vagy csak az egyik onkoproteint expresszáló sejtvonalakhoz viszonyítva (11/B ábra). Ezzel szemben a Fyn fehérje konstitutívan nagy mennyiségben volt jelen a tanulmányozott sejtvonalakban és a HPV 16 onkoproteinek jelenléte sem befolyásolta expresszióját a keratinocitákban (11/B ábra). Az Src családba tartozó kinázok katalitikus alegységében

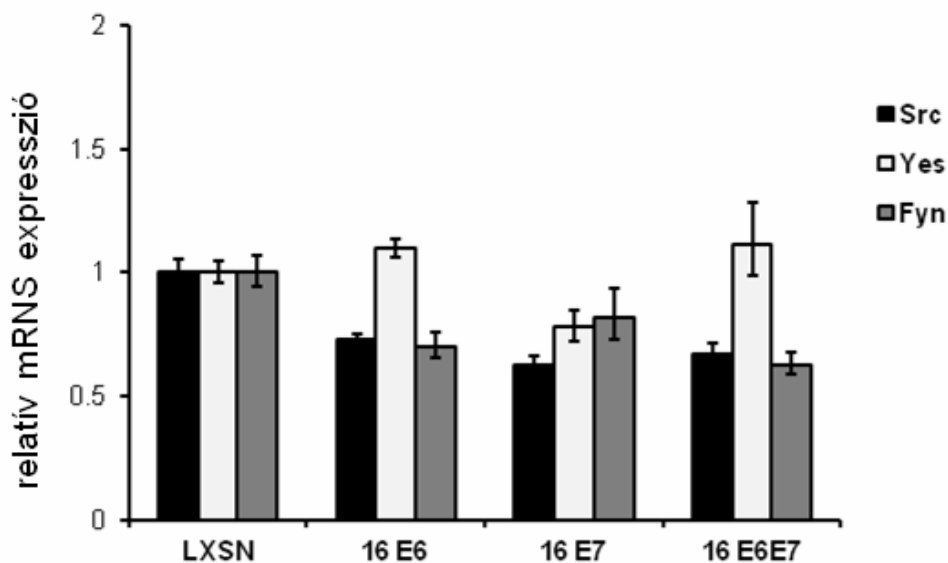
található aktivációs hurok tirozin-foszforilációját felismerő és ezáltal az aktív állapotú enzimekre specifikus antitesttel emelkedett Src kináz foszforilációt detektáltunk az E7 onkoprotein jelenlétében (11/B ábra).



11. ábra HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok fehérje expressziójára proliferáló humán keratinocitákban. A p53 és Rb tumorszupresszor fehérjék csökkent mennyisége igazolta a funkcionálisan aktív E6 és E7 fehérjék jelenlét (A). Src, Yes és Fyn kinázok fehérje expresszióját a kinázok natív állapotára specifikus antitestek alkalmazásával mutattuk ki immunblot vizsgálattal. A specifikus pozícióban található foszfo-tirozint tartalmazó Src kinázokat felismerő antitest alkalmazásával a katalitikusan aktív állapotban lévő enzimek mennyiségére következtethettünk. Három független kísérletből egy reprezentatív blot látható az ábrán, mennyiségi kontrollként anti-aktin ellenanyagot használtunk.

A HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok mRNS expressziójára

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az Src kinázok fokozott mRNS expressziója okozza-e az immunoblot vizsgálatok során tapasztalt emelkedett Src és Fyn fehérje expressziót a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek együttes jelenlétében. A kvantitatív TaqMan valós idejű PCR vizsgálatok azonban arra az eredményre vezettek, hogy nem a transzkripció aktivitás változása áll a tapasztalt magasabb fehérje mennyiségek mögött. A HPV 16 onkoproteinek jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan egyik Src családba tartozó kináz (Src, Fyn, Yes) gén mRNS expresszióját sem, függetlenül attól, hogy alacsony (Src, Yes) vagy nagyobb (Fyn) mennyiségben mutathatóak ki fehérjeként (12. ábra).



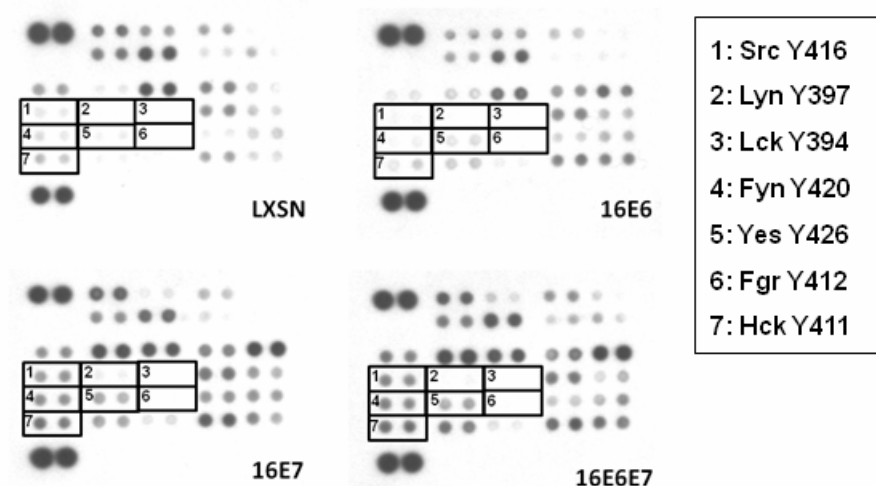
12. ábra HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok mRNS expressziójára proliferáló humán keratinocitákban. Src, Yes és Fyn gének expressziója valós idejű RT-PCR vizsgálatok alapján a HPV 16 E6, E7 vagy mindkét onkogénnel transzdukált, illetve az üres LXSN vektort hordozó keratinocita sejtvonalakban. A sejteket szérummentes tápfolyadékban tenyésztettük, amely gátolta a keratinociták differenciációját. A vizsgált gének expressziós aktivitását a GAPDH mRNS expresszió mértékéhez normalizáltuk, majd az az üres LXSN vektort hordozó sejtvonalban kapott értékhez viszonyítottuk. A grafikonokon kettő független kísérlet átlaga (három-három párhuzamos mérés) van feltüntetve a standard hibával. Student t teszt elvégzésével nem volt kimutatható szignifikáns változás az Src, Yes és Fyn gének expressziós aktivitásában a HPV onkoproteinek jelenlétében.

A HPV 16 E6 és E7 hatása az egyes Src kinázok foszforilációs állapotára

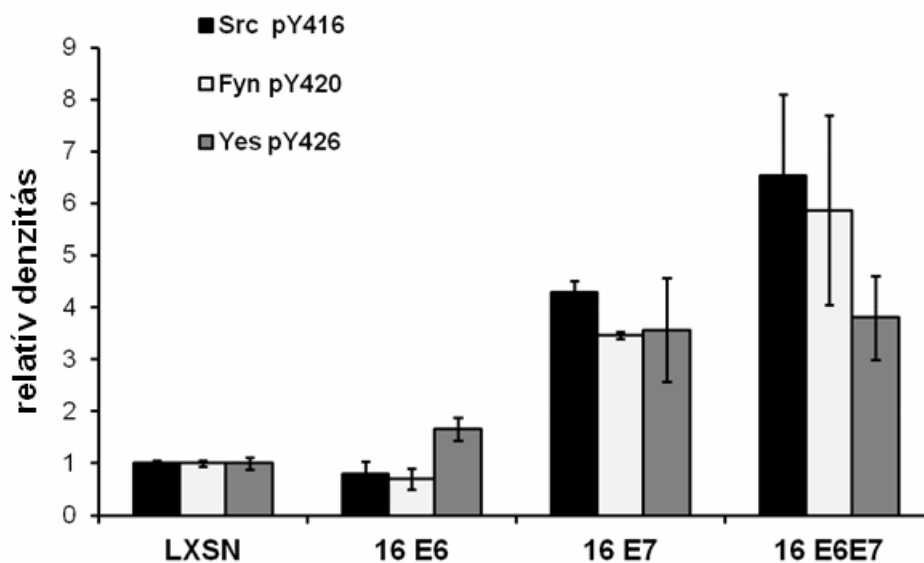
Mivel a Western blot vizsgálatok során azt tapasztaltuk, hogy a HPV 16 E7 onkoproteinjének jelenlétében megemelkedett a Y416 (vagy azzal ekvivalens) pozícióban foszforilált Src kinázok mennyisége, következő lépésként humán foszfo-kináz array alkalmazásával határoztuk meg ezen kináz-család tagjainak egyedi foszforilációs állapotát a HPV 16 onkoproteinek jelenlétében. Az E7 onkoprotein hatására az Src, Yes és Fyn foszforilációja szignifikánsan megemelkedett, míg az E6 nem volt hatással ezen fehérjék foszforilációjára a Y416 (vagy azzal ekvivalens) pozícióban (13/A ábra, 13/B ábra). A foszfo-kináz array még további négy Src családba tartozó kináz (Lyn, Lck, Fgr, Hck) foszforilációs állapotának vizsgálatát is lehetővé tette (13/A ábra), amelyek eddigi ismereteink szerint leukocitákban expresszálódnak. Az általunk vizsgált keratinocita sejtvonalakban egyáltalán nem tudtunk kimutatni az aktivált állapotú Lyn, Lck és Fgr fehérjéket. A foszfo-kináz array

eredménye foszforilált Hck jelenlétére utalt HPV 16 E7 hatására, azonban ezt az eredményt nem tudtuk megerősíteni Western blot vizsgálattal.

A

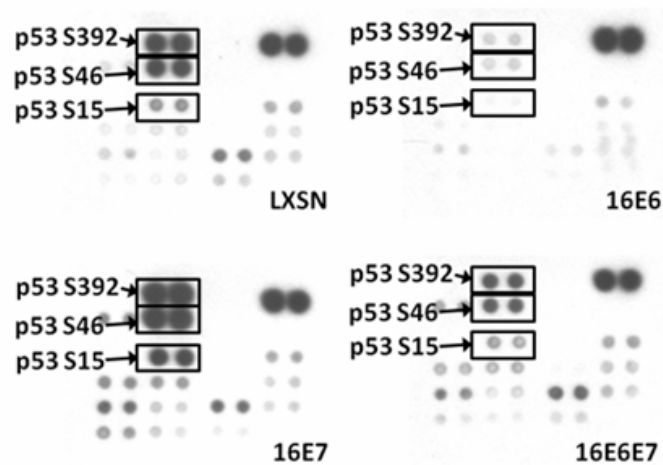


B

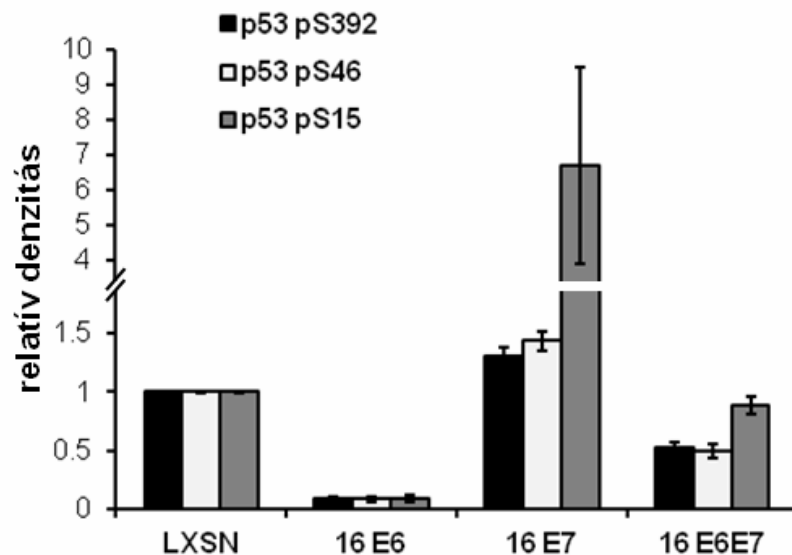


14. ábra Humán foszfo-kináz array a HPV onkoproteinek hatásának vizsgálatára az Src kinázok egyedi foszforilációs állapotára. Teljes sejt lizátumokban az Src, Yes és Fyn fehérjék Y416 (illetve ekvivalens pozícióban található tirozin) foszforilációja HPV 16 E6, E7 vagy mindkét onkogénnel transzdukált, illetve az üres LXS vektort hordozó keratinocita sejtvonalakban. A tirozin-foszforilált Src kinázok pozíciói a membránok fotóin bekeretezve láthatóak (14/A ábra). A denzitometriás vizsgálat eredményét oszlopdiagramm szemlélteti (14/B ábra). A spot denzitásokat az ImageJ szoftver segítségével kvantifikáltuk, majd az üres LXS vektort hordozó sejtvonalban kapott értékhez viszonyítottuk. A grafikonokon kettő független kísérlet átlaga van feltüntetve a standard hibával.

A



B



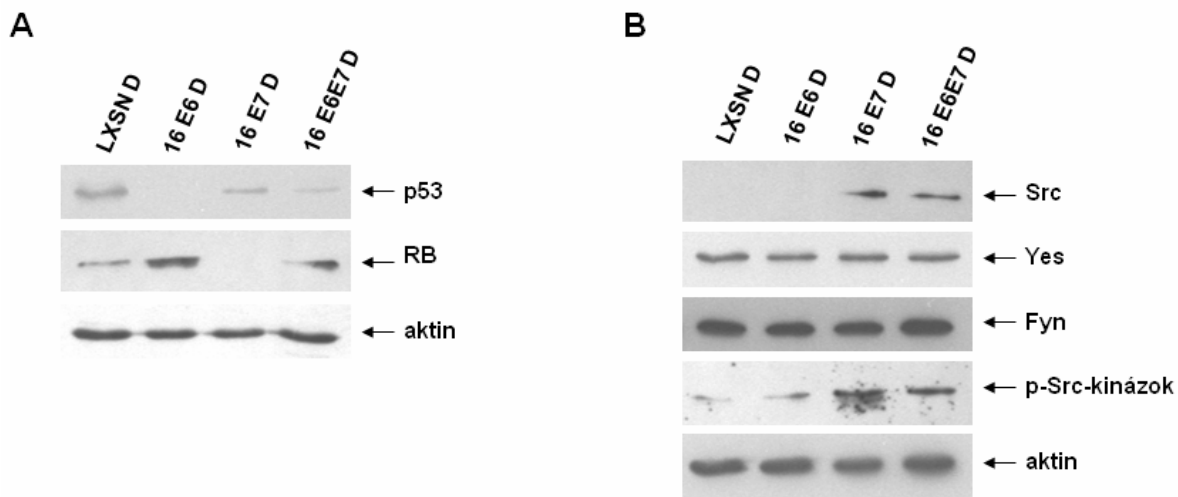
15. ábra Humán foszfo-kináz array a HPV onkoproteinek hatásának vizsgálatára a p53 foszforilációs állapotára. Teljes sejt lizátumokban a p53 S15, S46 és S392 szerin-foszforilációja HPV 16 E6, E7 vagy mindkét onkogénnel transzdukált, illetve az üres LXSN vektort hordozó keratinocita sejtvonalakban. A különböző szerin-foszforilált p53 variánsok pozíciói a membránok fotóin bekeretezve láthatóak (15/A ábra). A denzitometriás vizsgálat eredményét oszlopdiagramm szemlélteti (15/B ábra). A spot denzitásokat az ImageJ szoftver segítségével kvantifikáltuk, majd az üres LXSN vektort hordozó sejtvonalban kapott értékhez viszonyítottuk. A grafikonokon kettő független kísérlet átlaga $\pm$ SEM van feltüntetve.

A foszfo-kináz array lehetőséget adott a HPV 16 onkoproteinek hatásának vizsgálatára a p53 tumorszupresszor fehérje S15, S46 és S392 szerin-foszforilációjára, amely a funkcionálisan aktív onkoproteinek jelenlétének igazolását is lehetővé tette (14. ábra). Az

irodalmi adatoknak megfelelően a HPV 16 E6 jelenlétében a p53 fehérje mindhárom pozícióban foszforilált formájának mennyisége jelentősen lecsökkent, míg E7 hatására emelkedett (14/A ábra, 14/B ábra). Mindez arra utalt, hogy a vizsgált transzdukált keratinocita sejtvonalak alkalmasak a HPV onkoproteinek hatásának funkcionális analízisére.

A keratinociták differenciálódásának a hatása az Src kinázok aktivitására HPV 16 onkoproteinek expresszálo sejtvonalakban

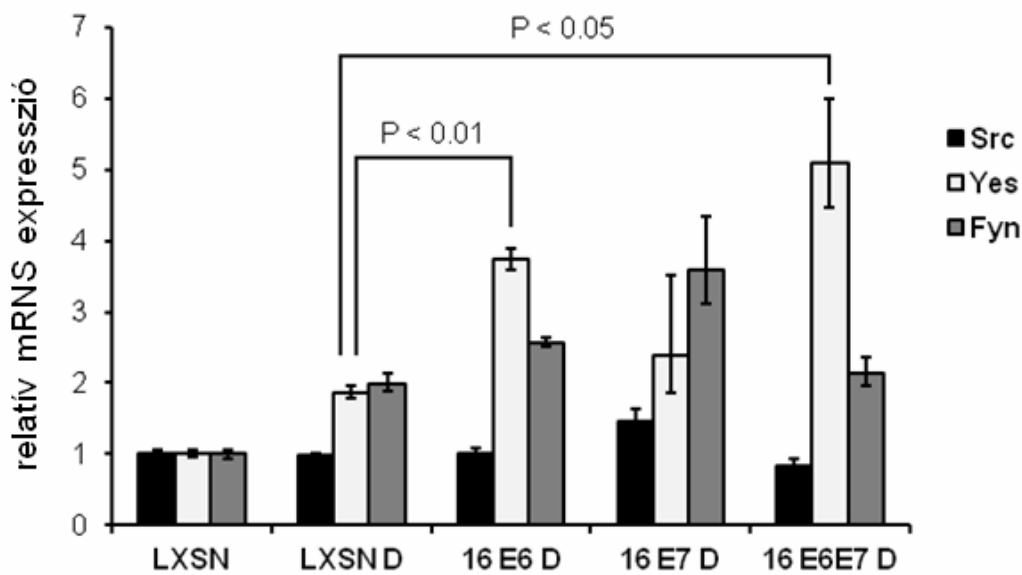
A többretegű hámban a HPV-k gazdasejtjeiként szolgáló keratinociták sorsa a differenciálódás, amely során a sejtosztódás leáll és a kromatinállomány fokozatosan eltűnik. Ezt a folyamatot zavarják meg a HPV E6 és E7 onkoproteinek, amelyek főként a p53 és Rb tumorszupresszor fehérjék lebontását okozva osztódásra készítetik a sejteket és megakadályozzák az abnormálisan osztódó sejtek apoptózisát. Megvizsgáltuk ezért, hogy változik-e a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok fehérje és mRNS expressziójára differenciálódó sejtekben. A sejteket a differenciálódás elősegítéséhez 1,8 mM kalciummal és 10% borjúsérummal kiegészített DMEM tápfolyadékban tenyésztettük és a sejt differenciáció sikeres kiváltását ezzel a módszerrel egy korábbi tanulmányunkban igazoltuk (Gyöngyösi és mtsai., 2012). A funkcionálisan aktív HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek jelenlétét a p53 és Rb fehérjék csökkent mennyisége igazolta a differenciálódó sejtvonalakban (16/A ábra). A proliferáló sejtekben tapasztalttal megegyezően szignifikánsan magasabb Src fehérje mennyiséget detektáltunk a differenciálódó sejtekben a két HPV 16 onkoprotein együttes jelenlétében, azonban a differenciálódó keratinocitákban az Src fehérje expressziójának megemelkedéséhez az E7 onkoprotein jelenléte már önmagában is elegendő volt (16/B ábra). Az Src mRNS expresszióra nem volt hatása sem a HPV onkogének jelenlétének, sem a sejt differenciációnak (17. ábra). Ezzel szemben a differenciáció minden sejtvonalban egyöntetűen magas Yes fehérje expressziót eredményezett, amelyre már nem volt hatással a HPV 16 onkoproteinek jelenléte (16/B ábra). A valós idejű PCR vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a Yes expresszió emelkedésének a háttérében a differenciálódás hatására szignifikánsan megnövekedett mRNS transzkripció áll, amely az E6 jelenlétében volt a legkifejezettebb ($P < 0,05$) (17. ábra). Meg kell jegyezni azt, hogy az E6 hatása nem volt megfigyelhető a Yes fehérje expressziójára (16/B ábra).



16. ábra HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok fehérje expressziójára differenciálódó humán keratinocitákban. A p53 és Rb tumorszupresszor fehérjék csökkent mennyisége igazolta a funkcionálisan aktív E6 és E7 fehérjék jelenlét (A). Src, Yes és Fyn kinázok fehérje expresszióját a kinázok natív állapotára specifikus antitestek alkalmazásával mutattuk ki immunblot vizsgálattal. A specifikus pozícióban található foszfo-tirozint tartalmazó Src kinázokat felismerő antitest alkalmazásával a katalitikusan aktív állapotban lévő enzimek mennyiségére következtethetünk. Három független kísérletből egy reprezentatív blot látható az ábrán, mennyiségi kontrollként anti-aktin ellenanyagot használtunk.

A proliferáló keratinocitákhoz hasonlóan a differenciálódó sejtvonalakban is nagymértékű, a HPV onkoproteinek által nem befolyásolt Fyn fehérje expressziót mutattunk ki (16/B ábra). A Fyn mRNS expressziót a sejtek differenciálódása szignifikánsan növelte ($P < 0,05$), és a HPV 16 onkoproteinek nem befolyásolták (17. ábra).

A proliferáló keratinocitákhoz megegyezően a differenciálódó sejtvonalakban is az E7 onkoprotein jelenlétében tapasztaltuk az Src családba kinázok emelkedett tirozin foszforilációját az aktivációs hurokban, tehát az aktív állapotban lévő Src kinázok arányát a sejtdifferenciáció feltételezhetően nem befolyásolta (16/B ábra).



17. ábra HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása az Src kinázok mRNA expressziójára proliferáló humán keratinocitákban. Src, Yes és Fyn gének expressziója valós idejű RT-PCR vizsgálatok alapján a HPV 16 E6, E7 vagy mindkét onkogént expresszáló, illetve az üres LXSND vektort hordozó keratinocita sejtvonalakban. A sejteket 1,8 mM kalciummal és 10% borjúsérummal kiegészített DMEM tápfolyadékban tenyésztettük, amely a keratinociták differenciációját váltotta ki. A vizsgált gének expressziós aktivitását a GAPDH mRNA expresszió mértékéhez normalizáltuk, majd az az üres LXSND vektort hordozó sejtvonalban kapott értékhez viszonyítottuk. A grafikonokon kettő független kísérlet átlaga (három-három párhuzamos méréssel) $\pm$ SEM van feltüntetve. Student t teszt elvégzésével igazoltuk a statisztikailag szignifikáns változásokat $P < 0,05$ értéket fogadva el szignifikánsnak.

MEGBESZÉLÉS

Az onkogén HPV típusok okozta tartósan fennálló fertőzés a méhnyakrák több lépésből álló patomechanizmusának kezdő és fenntartó lépése (Steenbergen és mtsai., 2005). A fertőzött hámszövetben a kórokozók elleni immunválasz hatékonyságát csökkentő citokinek termelődése elősegítheti a perzisztens HPV fertőzés kialakulását, aminek következtében szignifikánsan megnövekedik a magas fokú *cervicalis dysplasia* és a tumoros folyamat kifejlődésének esélye (Kobayashi és mtsai., 2008). Cervix carcinomában és rákmegelőző állapotokban az antiinflammatorikus és immunmodulátor IL-10 szint lokális emelkedését figyelték meg (Giannini és mtsai., 1998; Hazelbag és mtsai., 2001). Az IL-10 gátolja a Th1 sejtek aktivációját és effektor funkcióját, ezáltal csökken a sejtes immunválasz hatékonysága. Akadályozza továbbá a dendritikus sejtek endogén vagy exogén faktorok által kiváltott érését és az antigénprezentáló sejtek migrációját a limfoid szövetekbe, továbbá szerepe van azoknak a Treg-sejteknek differenciálódásában, melyek az immuntolerancia kialakításában vesznek részt. Az IL-10 további immunszuppresszív hatása azzal magyarázható, hogy blokkolja a proinflammatorikus citokinek és kemokinek (IL-1, IL-6 és TNF- α) expresszióját (Mocellin és mtsai., 2003).

Az IL-10 immunszuppresszív tulajdonsága elősegíti egyes neopláziák kialakulását, ugyanis hatására a tumoros sejtek elkerülhetik, hogy a sejtes immunválasz effektor sejtjei felismerjék őket (Mocellin és mtsai., 2003). Egyes colorectalis és pajzsmirigy tumorokban a malignusan transzformálódott sejtek termelik az IL-10-et, amely a pajzsmirigy tumorokban még autokrin növekedési faktorként is hat, és így elősegíti a malignus folyamat progresszióját (Csiszár és mtsai., 2004; Herbeuval és mtsai., 2004; Todaro és mtsai., 2006). Ezzel szemben a mell-, tüdő-, prosztatata- és mellrák eredetű sejtvonalak egységesen nem képesek az IL-10 termelésére, ami arra utal, hogy ezen tumorok kiindulási sejtjeiben már az egyedfejlődés alatt inaktiválódott az IL-10 gén. Fontos megemlíteni, hogy a tumor mikrokörnyezetének emelkedett IL-10 szintje származhat a tumorba infiltrálódó leukocitáktól is (Wolk és mtsai., 2002). A HPV 16 fertőzéshez asszociálódó tumorigenezis egérmodelljében megfigyelték, hogy a tumorba infiltráló makrofágok IL-10-et szekretálnak és regulátor T sejt fenotípus kialakulását indukálják, ami az immuntoleranciának és így a malignus progresszióknak kedvez (Bolpetti és mtsai., 2010).

A méhnyak transzformációs zónájában, amely a *cervicalis neoplasiák* kialakulásának leggyakoribb helye, fiziológiásan is az IL-10 konstitutív expressziója mutatható ki. Cervix

carcinomás elváltozásokból vett biopsziás szövetmintákban az IL-10 szekréció tovább fokozódik (Giannini és mtsai., 1998; El-Sherif és mtsai., 2001). A *cervix carcinoma* eredetű immortalizálódott sejtvonalak sem képesek az IL-10 termelésére annak ellenére, hogy a transzkripcióját szabályozó legfontosabb transzkripciós faktorokat (STAT3, Sp1, Ets-1, CCAAT/enhancer binding protein β) ezek a sejtek is expresszálják (Maytin és mtsai., 1998; Benkhart és mtsai., 2000; Grinstein és mtsai., 2002; Brenner és mtsai., 2003). Hipotézisünk szerint ezért az IL-10 expresszió konzervatív hiánya az emberi keratinocitákban és epiteliális sejtekben epigenetikai inaktivációs folyamatokra utal és *cervix carcinoma*-ban nem a neoplasztikus sejtek az IL-10 termelői.

A génextpresszió szabályozásában alapvető szerepet játszó epigenetikai regulációs folyamatok tanulmányozása választ adhat arra a kérdésre, hogy miért sejtvonal-specifikus egyes citokinek termelődése (Bird, 2002; Berger, 2007). Az utóbbi években bebizonyosodott, hogy a promoter szakaszok CpG metilációja több citokin gén (például IL-2, IL-4, IFN- γ) expresszióját képes befolyásolni (Yano és mtsai., 2003; Jones és Chen, 2006; Murayama és mtsai., 2006). Megjegyezendő, hogy a sejtvonal-specifikusan termelődő citokinek promoter régiójában kevés CpG szekvencia található, ezért feltételezések szerint azon metil-citozinok fognak kihatni a promoter aktivitásra, amelyek az aktiváló transzkripciós faktorok kötőhelyein helyezkednek el. Ismert, hogy a metilált DNS közvetlenül képes gátolni egyes transzkripciós faktorok kötődését, valószínűleg a metil csoportok szterikus gátlása miatt (Berger, 2007). Ezt támasztják alá azok a megfigyelések, hogy az IFN- γ és IL-2 promoterek aktivitásában a transzkripciós startponthoz proximálisan elhelyezkedő CpG-k metilációja kiemelkedő fontosságú.

A humán IL-10 promoter ismert transzkripciós faktor kötőhelyeket tartalmazó 700 bp proximális szakaszán 8 CpG található. Munkánk során az IL-10 promoter ezen proximális szakaszának metilációs mintázatát keratinocita (pHKC, HaCaT) és *cervix carcinoma* eredetű epiteliális (C-33A, HeLa, HT-3, CaSki, SiHa) sejtvonalakban, exfoliált egészséges cervikális epiteliális sejtekben, illetve perifériás vérből származó és köldökzsinór vénából vett PBMC sejtekben. Az IL-10 expressziójára képes PBMC sejtekben a vizsgált promoter metilálatlannak bizonyult, ellenben az IL-10-et nem termelő keratinocita és epiteliális sejtvonalakban metilált profilt mutatott. A szekvenálási eredmények jól illeszkedtek az RT-PCR eredményekhez, ugyanis IL-10 mRNS expressziót csak a PBMC sejtekben detektáltunk.

A sejtvonalak vizsgálata során megfigyelt metilációs mintázatok azt mutatták, hogy az IL-10 promoterben a két legproximálisabban elhelyezkedő (-185 és -110) CpG dinukleotid metilációs állapota tér el a legmarkánsabban az IL-10 termelő és nem termelő sejttípusok

között. Annak igazolására, hogy a metilációs mintázatban tapasztalt különbségek nem az epiteliális sejtvonalak tenyésztése során indukálódtak, egészséges exfoliált cervikális epiteliális sejtekben és *cervix carcinoma* szövetmintákban is meghatároztuk a -185 és -110 CpG dinukleotidok metiláltságának mértékét. A -110 CpG teljesen metiláltnak bizonyult az egészséges és a méhnyakrák eredetű betegmintákban. A -185 CpG szintén nagy mértékben (75-100%) metilált volt a klinikai mintákban, azonban csak részleges metilációt (50-75%) tapasztaltunk 2 *cervix carcinoma* biopsziában.

A metilált DNS szakaszok befolyásolhatják a kromatin állapotát azáltal, hogy hiszton deacetilázok kötésével a környezetükben elhelyezkedő H3 és H4 fehérjék deacetilálódását okozzák, így kompakt kromatinszerkezetet alakítanak ki, amely szintén gátolhatja a transzkripció faktorok kötődését (Jenuwein és Allis, 2001). Következő lépésként ezért azt vizsgáltuk, hogy az egyes sejttípusokban milyen az IL-10 promoterhez társuló kromatin állapota, pontosabban kimutatható-e acetilált H3 és H4 hisztonok jelenléte a proximális promoter szakasz mellett. Az acetilált hisztonok (különösen az acetilált H3) a transzkripciósan aktív eukromatinra jellemzőek. Elektrosztatikus taszító hatásuk miatt lazább kromatin szerkezetet hoznak létre, így a promoter szakaszok illetve egyéb szabályozó szekvenciák hozzáférhetővé válnak a transzkripció faktorok számára. Acetilált H3 és acetilált H4 fehérjék elleni antitestek alkalmazásával kromatin immunprecipitációt végeztünk PBMC, HaCaT, HeLa és pHKC sejtekből izolált kromatinból. Ezt követően az immunprecipitátumokból DNS-t izoláltunk és valós idejű PCR segítségével IL-10 promoterre specifikus szekvenciákat amplifikáltunk. Egyedül a PBMC sejtekből izolált kromatinban társult az IL-10 promoter általunk vizsgált szakasza acetilált hiszton fehérjékhez. A kromatin immunprecipitáció eredményei szintén arra utalnak, hogy a keratinocita és epiteliális sejtekben az IL-10 promoter a transzkripció szempontjából inaktív heterokromatinban található, környezetében a hiszton fehérjék nem acetiláltak.

A promoter metiláció szerepét az IL-10 expresszió gátlásában sikerült alátámasztanunk egy *in vitro* funkcionális teszt alkalmazásával. Cervix carcinoma eredetű, epiteliális HeLa sejteket tranziensen transzfektálva az IL-10 promoter proximális szakaszait metilálatlan illetve metilált állapotban tartalmazó reporter plazmid konstrukciókkal igazoltuk, hogy a metilált IL-10 promoter szakaszok expressziós aktivitása szignifikánsan kisebb a metilálatlanokénál. Megjegyzendő, hogy mivel az epiteliális eredetű HeLa sejtvonalban kifejeződött a metilálatlan IL-10 promoter, az epiteliális leszármazási vonalba tartozó sejtekben valóban jelen vannak aktív állapotban az IL-10 gén transzkripciójához szükséges transzkripció faktorok.

A magas onkogén kockázatú HPV típusok közül a HPV 16 a leggyakoribb genitális HPV típus, amelyet az invazív cervix carcinomák és a rákmegelőző elváltozások mintegy feléből detektálnak (Bosch és mtsai., 2008). A fertőzött hámsejtek immortalizációjáért elsősorban HPV 16 E6 és E7 onkoproteinjei felelősek (Ganguly és mtsai., 2009). Ezen proteinek akkor expresszálódnak nagymértékben, ha a tartósan fennálló HPV infekció során a virális DNS a gazdasejt genomjába integrálódik. Ekkor ugyanis a cirkuláris virális DNS az integráció előtt az E2 korai fehérjét kódoló szekvencia mentén nyílik fel, így az E6 és E7 gének expressziója kikerül az E2 addigi kontrollja alól (Pett és Coleman, 2007). Az E7 fehérje legfontosabb szerepe, hogy a hipofoszforilált retinoblasztóma fehérje (pRb) megkötésével és lebontásának elősegítésével aktiválja a sejtciklust, a sejtek a G0/G1 stádiumból a sejtosztódás S fázisába lépnek. Az E6 onkoprotein a p53 tumorszuppresszor fehérjének képes az ubiquitin-függő lebontását kiváltani a 26S proteoszóma-komplexeen keresztül, így akadályozva meg az abnormálisan osztódó sejtek apoptózisát (Moody és Laimins, 2010).

A virális onkoproteinek kölcsönhatnak számos egyéb celluláris proteinnel is, úgymint tumor szupresszor fehérjékkel, transzkripció faktorokkal és koaktivátorokkal, sejtpolaritást és növekedést szabályzó fehérjékkel, amelyek megváltozott aktivitása szintén hozzájárulhat a tumoros folyamat kialakulásához és progressziójához (Münger és Howley, 2002; Contreras-Paredes és mtsai., 2009; Moody és Laimins, 2010).

Számos tumorhoz hasonlóan az Src családba tartozó citoplazmatikus protein-tirozinkinázok közé tartozó Src emelkedett aktivitását mutatták ki méhnyakrákos szövetekből (Kong és mtsai., 2011b). Ezen kináz családban a Src-on kívül még további két kináz, Yes és Fyn, expresszálódik ubiquiter módon, így a többrétegű laphám epiteliális sejteiben is (Sen és Johnson, 2011). Ez utóbbi két kináz expresszióját és aktivitását még nem tanulmányozták méhnyakrákban, azonban emelkedett aktivitásukat detektálták egyéb malignus folyamatokban. Így a Yes kináz aktivációját melanóma és colon carcinoma sejtek megnövekedett proliferációjával és invazivitásával (Lee és mtsai., 2010; Hamamura és mtsai., 2011; Sancier és mtsai., 2011), míg a Fyn kináz aktivációját a prosztatarák progressziójával és metasztázisképző potenciáljával hozták összefüggésbe (Saito és mtsai., 2010). Mivel az Src családba tartozó kinázok katalitikusan aktív állapotát az enzimek aktivációs hurkában elhelyezkedő, adott pozícióban elhelyezkedő, tirozin autofoszforylációja jellemzi (Roskoski, 2005), az immunblot vizsgálatok során az Src családba tartozó kinázok aktivált állapotát általánosan felismerő, foszfo-protein specifikus antitesteket is alkalmaztunk. Ezt követően az egyes kinázok egyedi aktivációs állapotának jellemeztük foszfo-kináz array alkalmazásával.

Kísérleteinkhez HPV 16 E6 és E7 onkogénekkal retrovirális vektor segítségével transzdukált primer humán keratinocitákat használtunk a papillomavírus onkoproteineknek a gazdasejtben lejátszódó folyamatokra kifejtett hatásának tanulmányozására. A sejtek a transzdukció utáni 5. és 8. passzálás közötti állapotban voltak, ezért kicsi volt az esélye annak, hogy bármilyen random módon keletkező genomi mutáció általánossá váljon a sejtvonalakban.

A keratinociták differenciációja kiváltható megfelelő tenyésztési körülmények alkalmazásával, így a többrétegű laphám felső rétegeiben elhelyezkedő sejtekhez hasonló fenotípus hozható létre. A differenciáció kiváltásához a sejteket emelt kalcium koncentráció és szérum jelenlétében tenyésztettük és módszerünk alkalmasságát korábbi vizsgálatok során igazoltuk. A differenciálódó sejtek felhagynak a proliferációval és a kilépve a sejtciklusból nem képesek többé DNS replikációra. A HPV onkoproteinek a differenciálódó sejteket újra osztódásra készítetik a virális genom replikációjához (Cheng és mtsai., 1995). Mivel papillomavírusok E6 és E7 onkoproteinjei a gazdasejt természetes differenciálódási folyamatát akadályozzák, kíváncsiak voltunk arra is, hogy változik-e a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek hatása differenciálódó keratinocitákban. Kísérleteinket ezért nemcsak proliferáló sejteken, hanem a differenciációt elősegítő körülmények között tenyésztett sejteken is elvégeztük.

A méhnyak daganatos elváltozásainak kialakulásához és progressziójához - más malignus elváltozásoktól eltérően – exogén HPV onkoproteinek hatása szükséges (Faridi és mtsai., 2011). Tekintettel a papillomavírusok kulcsfontosságú szerepére a cervikális neopláziák kialakulásában, a keratinociták képességére az ubiquiter celluláris Src kinázok (Src, Yes, Fyn) expressziójára, valamint a korábban megfigyelt Src aktivációra méhnyakrák eredetű sejtvonalakban (SiHa, HeLa) és hámváltozásokban azt feltételeztük, hogy ezen kinázok aktivitása és a HPV onkoproteinek között kapcsolat lehetséges. Az Src kinázok aktivációjának a malignus fenotípus kialakításában játszott szerepét alátámasztja, hogy kezelés kismolekulájú Src kináz gátló szerekkel, illetve az Src mRNS expresszió gátlása siRNS alkalmazásával eredményesen gátolja a SiHa és HeLa méhnyakrák eredetű sejtvonalak proliferációját (Kong és mtsai., 2011a). Yasmeen és mtsai. (2010) igazolták, hogy az említett sejtvonalak kezelése kismolekulájú Src kináz inhibitorokkal szignifikánsan csökkenti a sejtek motilitását és invazivitását. HeLa sejtekkel végzett nude egér xenograft kísérletek demonstrálták továbbá, hogy kezelés Src kináz inhibitorokkal szignifikánsan gátolja a szubkután tumor növekedését is (Kong és mtsai., 2011b). Annak ellenére azonban, hogy egyre több adat utal az Src kinázoknak a méhnyakrák eredetű sejtvonalak malignus fenotípusának kialakításában betöltött szerepére, korábban nem volt ismert, hogy a HPV

onkoproteinek hatására aktiválódnak ezek az enzimek vagy később a malignus sejtek klonális szelekciója során.

Kísérleteink során ezért a magas kockázatú HPV 16 E6 és E7 onkoproteinjeinek a hatását tanulmányoztuk keratinocitákban az Src kinázok expressziójára és aktivitására. Proliferáló illetve differenciálódó sejtekben a Western blottal meghatározott Src, Yes és Fyn fehérjék mennyisége heterogén módon változott a HPV 16 onkoproteinek hatására: proliferáló sejtekben az Src és Yes fehérjék mennyiségének szignifikáns növekedését mutattuk ki mindkét HPV 16 onkoprotein jelenlétében, míg differenciálódó sejtekben az E7 jelenléte elegendő volt az emelkedett Src fehérje expresszió kiváltásához. Ezzel szemben sejt differenciáció a Yes fehérje mennyiségének egyöntetű, a papillomavírus onkoproteinek jelenlététől független növekedését eredményezte minden sejtvonalban. Az immunblot vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a Fyn fehérje expressziójára nincsenek hatással a HPV 16 E6 és E7 onkoproteinek sem proliferáló, sem differenciálódó keratinocitákban. Megjegyezendő, hogy nem sikerült az mRNS expreszió megváltozott aktivitását kimutatnunk az egyes kinázok fehérje mennyiségeiben tapasztalt változások okaként, így feltételezhetően a HPV onkoproteinek poszttranszkripció mechanizmusok útján hatnak ezen fehérjék expressziójára.

További vizsgálataink során kimutattuk, hogy a HPV 16 E7 jelenléte a keratinocitákban expresszáldó Src kinázok katalitikusan aktív (az aktivációs hurokban elhelyezkedő tirozinon foszforilált) állapotát váltotta ki. Mindezek az adatok arra utalnak, hogy a HPV 16 E7 – a HPV 16 E6 segítségével – kettős hatással bírhat az Src kinázokra keratinocitákban: aktiválhatja a konstitutívan expresszáldó Fyn kinázt illetve növelheti a Src és Yes kinázok fehérje expresszióját majd aktív állapotukat idézheti elő.

Annak a kérdésnek a megválaszolásához, hogy a magas kockázatú papillomavírusok onkoproteinjei milyen módon eredményezik az Src kinázok fehérje koncentrációjában és aktivitásában megfigyelt változásokat, további vizsgálatok szükségesek. Korábbi kísérletek kimutatták, hogy az simian vírus 40 (SV40) nagyméretű T antigénje a magas kockázatú HPV E7-hez hasonlóan képes kötődni az Rb hipofoszforilált formájához és így kiváltani az Src kináz aktivációját, felszabadítva a kinázt az Rb kontrollja alól (Arulanandam és mtsai., 2010). HPV 16 E7 expresszáldó RKO colorectalis carcinoma sejteken végrehajtott „kináz-screen” pedig kimutatta, hogy az E7 expressziója jelentősen megváltoztatta az RKO sejtek „kináz-igényét” a viabilitás fenntartásához (Baldwin és mtsai, 2008). Feltételezhetően a HPV 16 E7 az Rb gátlásával és ezáltal a sejt ciklus progressziójának kiváltásával hathat az RKO sejtek „kináz-igényére”. Ismert továbbá az, hogy a HPV onkoproteinek kiválthatják a fertőzött

keratinocitában egyes transzmembrán tirozin kináz receptorok, úgymint az EGFR és az asszociált FAK emelkedett expresszióját (Dellas és mtsai., 1996; McCormack, 1997; Thelemann és mtsai., 2005). A növekedési faktor receptorok és a hozzájuk asszociálódó jelátviteli molekulák emelkedett expressziója és aktivitása szintén az Src kinázok aktivációját eredményezheti. Megjegyezendő azonban, hogy az általunk használt homogén sejtenyészetekben nagyobb valószínűséggel állhat intracelluláris folyamat, mint ligandkötődést igénylő extracelluláris eredetű jelátviteli folyamat az Src kinázok expressziójának és aktivációjának megváltozása mögött.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy vizsgálataink során olyan mechanizmust sikerült elsőként azonosítanunk, amely hozzájárulhat az onkogén HPV típusok által kiváltott tumorokban a gazdasejtek malignus fenotípusának kialakításához.

ÖSSZEFOGLALÁS

A magas onkogén kockázatú humán papillomavírus (HPV) fertőzés kulcsfontosságú a méhnyakrák kialakulásában és progressziójában. A malignus folyamatot elősegítő kofaktorok közül munkám során az immunmodulátor interleukin-10 (IL-10) termelésének mechanizmusát valamint az Src családba tartozó citoplazmatikus protein tirozin kinázok aktivációját vizsgáltam.

Eredményeink szerint keratinocitákban és méhnyaki eredetű hámsejtekben az IL-10 promotert sejtvonal-specifikus epigenetikai szabályozó folyamatok tartják inaktív állapotban. Az IL-10 promoter proximális szakaszának CpG metilációját és ezen promoter szakasz mentén az acetilált hisztonok hiányát mutattuk ki az IL-10 transzkripciót akadályozó alapvető tényezőként primer humán keratinocitákban, immortalizált humán keratinocita sejtvonalban és méhnyakrák eredetű epiteliális sejtvonalakban. A magas onkogén kockázatú HPV genomok jelenlététől függetlenül az IL-10 expressziót gátló epigenetikai mechanizmusok egységesen fenntartódtak a keratinocitákban és méhnyakrák eredetű epiteliális sejtvonalakban. Eredményeink azt támasztják alá, hogy a méhnyakrákban illetve a méhnyak rákmegelőző elváltozásaiban tapasztalt lokálisan emelkedett IL-10 szekréció nem epiteliális eredetű.

HPV ferőzésekhez társuló malignus folyamatokban megfigyelték, hogy az Src kináz emelkedett aktivitása a daganatsejtek fokozott proliferációjával és invazivitásával jár együtt. Kísérleteink során ezért megvizsgáltuk, hogy HPV 16 E6-tal, E7-tel vagy mindkét onkogénnel transzdukált humán keratinocitákban az Src családba tartozó kinázok aktivációja a HPV onkoproteinek hatására következik-e be. A proliferációt és differenciációt elősegítő körülmények között tenyésztett keratinocitákban az ubikviter módon, többféle eredetű sejtvonal által expresszált Src családba tartozó kinázok, az Src, Yes és Fyn mRNS és fehérje expresszióját valamint az enzimek aktív állapotára utaló, tirozin foszforilációs állapotát vizsgáltuk. Kimutattuk, hogy a HPV 16 onkoproteinek proszttranszkripciók mechanizmusok útján képesek az Src és Yes fehérjék expresszióját növelni, a HPV 16 E7 jelenléte pedig kiváltotta a keratinociták által termelt mindhárom citoplazmatikus kináz katalitikusan aktív állapotát okozó tirozin-foszforilációját. Az Src kinázok megváltozott expressziója és aktivitása hozzájárulhat a malignus folyamatok kiváltásához vagy fenntartásához a HPV fertőzésekhez társuló tumorok kialakulása során.

SUMMARY

Cervical cancer is induced and maintained by oncogenic human papillomavirus (HPV) infection. Among various cofactors promoting cervical carcinogenesis, my research work targeted the mechanism of intratumoral interleukin-10 (IL-10) production and the activation of the Src-family non-receptor tyrosine kinases.

We have demonstrated that in keratinocytes and cells of cervical epithelial origin the IL-10 promoter is repressed by epigenetic regulatory mechanisms in a lineage specific manner. CpG methylation of the proximal promoter region and absence of acetylated histones indicating closed chromatin state were identified as major determinants of transcriptional silencing of IL-10 expression in normal and neoplastic human epithelial cells. Regardless the presence of high-risk oncogenic HPV genomes, the lineage-specific epigenetic silencing of IL-10 expression was maintained uniformly in keratinocytes and in epithelial cell lines of cervical cancer origin. Our results support the notion that during cervical carcinogenesis, a possible source of topical IL-10 secretion are the leukocytes infiltrating the uterine cervix.

Elevated activity of Src is accompanied with increased cell proliferation and invasivity in HPV-associated malignancies; therefore, we used human keratinocytes transduced with HPV 16 E6, E7 or both oncogenes to investigate whether the activation the activation Src-family kinases is a downstream effect of the papillomaviral oncoproteins. mRNA and protein expression as well as activation state (indicated by phosphorylation at specific tyrosine residues) of ubiquitously expressed SFKs, namely Src, Yes and Fyn, was investigated in both proliferating and differentiating keratinocytes. We have shown that HPV 16 oncoproteins upregulate Src family kinases Src and Yes via posttranscriptional mechanisms. Furthermore, HPV 16 E7 enhanced the activating phosphorylation of all expressed Src-family kinases in keratinocytes. The altered expression or activity of Src-family kinases can serve as both initiating and maintaining oncogenic mechanisms during HPV-associated malignancies.

IRODALOMJEGYZÉK

Al Moustafa AE, Yasmeen A, Achkhar A. Src inhibitors are promising therapy molecules for human cervical carcinomas. *Medical Hypotheses* 2011; 77:812-14.

Arulanandam R, Geletu M, Raptis L. The simian virus 40 large tumor antigen activates csrc and requires csrc for full neoplastic transformation. *Anticancer Research* 2010; 30:47-53.

Baldwin A, Li W, Grace M, Pearlberg J, Harlow E, Münger K, Grueneberg DA. Kinase requirements in human cells: II. Genetic interaction screens identify kinase requirements following HPV16 E7 expression in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:16478-83.

Banks L, Pim D, Thomas M. Human tumour viruses and the deregulation of cell polarity in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12:877-86.

Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10:687-92.

Bellanger S, Tan CL, Xue YZ, Teissier S, Thierry F. Tumor suppressor or oncogene? A critical role of the human papillomavirus (HPV) E2 protein in cervical cancer progression. *Am J Cancer Res* 2011; 1:373-389.

Benkhart EM, Siedlar M, Wedel A, Werner T, Ziegler-Heitbrock HWL. Role of Stat3 in lipopolysaccharide-induced IL-10 gene expression. *J Immunol* 2000; 165:1612-7.

Berger SL. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 2007; 447:407-12.

Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, Hausen Hz, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology* 2010; 401:70-9.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002;16:6-21.

Biscardi JS, Ishizawar RC, Silva CM, Parsons SJ. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: epidermal growth factor receptor and c-Src interactions in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2000;2:203-10.

Bolpetti A, Silva JS, Villa LL, Lepique AP. Interleukin-10 production by tumor infiltrating macrophages plays a role in Human Papillomavirus 16 tumor growth. *BMC Immunol.* 2010; 11:27.

Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, Tortolero-Luna G, Kjaer SK, Muñoz N. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine* 2008; 26 Suppl 10:K1-16.

Bradshaw JM. The Src, Syk, and Tec family kinases: Distinct types of molecular switches. *Cellular Signalling* 2010; 22: 1175-84.

Brenner S, Prösch S, Schenke-Layland K, Riese U, Gausmann U, Platzer C. cAMP-induced interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. *J Biol Chem* 2003; 278:5597-604.

Cabodi S, Di Stefano P, Leal Mdel P, Tinnirello A, Bisaro B, Morello V, Damiano L, Aramu S, Repetto D, Tornillo G, Defilippi P. Integrins and signal transduction. *Integrins and Ion Channels: Molecular Complexes and Signaling* 2010; 674: 43-54.

Chang YM, Bai L, Liu S, Yang JC, Kung HJ, Evans CP. Src family kinase oncogenic potential and pathways in prostate cancer as revealed by AZD0530. *Oncogene*. 2008;27:6365-75

Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular dna-replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes & Development* 1995; 9: 2335-49.

Cho NH, Kim YT, Kim JW. Alteration of cell cycle in cervical tumor associated with human papillomavirus: cyclin-dependent kinase inhibitors. *Yonsei Med J*. 2002;43:722-8.

Contreras-Paredes A, Cruz-Hernandez E, Martinez-Ramirez I, Duenas-Gonzalez A, Lizano M. E6 variants of human papillomavirus 18 differentially modulate the protein kinase B/phosphatidylinositol 3-kinase (akt/PI3K) signaling pathway. *Virology* 2009; 383: 78-85.

Csiszár A, Szentes T, Haraszti B, Zou W, Emilie D, Petrányi G, Pócsik E. The pattern of cytokine gene expression in human colorectal carcinoma. *Pathol Oncol Res* 2004; 10:109-16.

de Capoa A, Musolino A, Della RS, Caiafa P, Mariani L, Del Nonno F, Vocaturo A, Donnorso RP, Niveleau A, Grappelli C. DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. *Oncol Rep* 2003; 10:545-9.

de Gruijl TD, Bontkes HJ, van den Muysenberg AJ, van Oostveen JW, Stukart MJ, Verheijen RH, van der Vange N, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM, Scheper RJ. Differences in cytokine mRNA profiles between premalignant and malignant lesions of the uterine cervix. *Eur J Cancer* 1999; 35:490-7.

Dellas A, Schultheiss E, Almendral AC, Torhorst J, Gudat F. Assessment of EGFR and TGF- α expression in relationship to HPV status and KI-67 distribution in cervical intraepithelial neoplasms. *Int J Cancer* 1996; 69: 165-9.

Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* 2006; 110:525-41.

Duenas-Gonzalez A, Lizano M, Candelaria M, Cetina L, Arce C, Cervera E. Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives. *Mol Cancer* 2005; 4:38.

El-Sherif AM, Seth R, Tighe PJ, Jenkins D. Quantitative analysis of IL-10 and IFN- γ mRNA levels in normal cervix and human papillomavirus type 16 associated cervical precancer. *J Pathol* 2001; 195:179-85.

Esteller M. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 2008; 358:1148-59.

- Faridi R, Zahra A, Khan K, Idrees M. Oncogenic potential of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology Journal* 2011; 8: 269.
- Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:1827-31.
- Ganguly N, Parihar SP. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. *J Biosci* 2009; 34:113-123.
- Giannini SL, Al-Saleh W, Piron H, Jacobs N, Doyen J, Boniver J, Delvenne P. Cytokine expression in squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix: implications for the generation of local immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 1998; 113:183-9.
- Grinstein E, Jundt F, Weinert I, Wernet P, Royer HD. Sp1 as G1 cell cycle phase specific transcription factor in epithelial cells. *Oncogene* 2002; 21:1485-92.
- Guarino M. Src signaling in cancer invasion. *J Cell Physiol* 2010; 223: 14-26.
- Gyöngyösi E, Szalmás A, Ferenczi A, Kónya J, Gergely L, Veress G. Effects of human papillomavirus (HPV) type 16 oncoproteins on the expression of involucrin in human keratinocytes. *Virology Journal* 2012; 9: 36.
- Hamamura K, Tsuji M, Hotta H, Ohkawa Y, Takahashi M, Shibuya H, Nakashima H, Yamauchi Y, Hashimoto N, Hattori H, Ueda M, Furukawa K, Furukawa K. Functional Activation of Src Family Kinase Yes Protein Is Essential for the Enhanced Malignant Properties of Human Melanoma Cells Expressing Ganglioside GD3. *J Biol Chem* 2011; 286: 18526-37.
- Hazelbag S, Fleuren GJ, Baelde JJ, Schuurung E, Kenter GG, Gorter A. Cytokine profile of cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2001; 83:235-43.
- Herbeuval JP, Lelievre E, Lambert C, Dy M, Genin C. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *Journal of Immunology* 2004; 172: 4630-6.
- Holland D, Hoppe-Seyler K, Schuller B, Lohrey C, Maroldt J, Dürst M, Hoppe-Seyler F. Activation of the enhancer of zeste homologue 2 gene by the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Cancer Res.* 2008;68:9964-72.
- Huh WK. Human papillomavirus infection: a concise review of natural history. *Obstetrics and Gynecology.* 2009; 114:139-43.
- Hunter T, Sefton BM. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980; 77:1311-5
- Im SH, Hueber A, Monticelli S, Kang KH, Rao A. Chromatin-level regulation of the IL10 gene in T cells. *J Biol Chem* 2004; 279:46818-25.
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293:1074-80.

Jones B, Chen JZ. Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. *EMBO J* 2006; 25:2443-52.

Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front Microbiol* 2012; 3: 152.

Kanodia S, Fahey LM, Kast WM. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. *Curr Cancer Drug Targets*. 2007; 7:79-89.

Kim LC, Song LX, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 587-95.

Kines RC, Thompson CD, Lowy DR, Schiller JT, Day PM. The initial steps leading to papillomavirus infection occur on the basement membrane prior to cell surface binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:20458-63.

Klose RJ, Bird AP. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 2006; 31:89-97.

Kluger HM, Dudek AZ, McCann C, Ritacco J, Southard N, Jilaveanu LB, Molinaro A, Sznol M. A phase 2 trial of Dasatinib in advanced melanoma. *Cancer* 2011; 117:2202-8.

Kobayashi A, Weinberg V, Darragh T, Smith-McCune K. Evolving immunosuppressive microenvironment during human cervical carcinogenesis. *Mucosal Immunol* 2008; 1:412-20.

Konecny GE, Glas R, Dering J, Manivong K, Qi J, Finn RS, Yang GR, Hong KL, Ginther C, Winterhoff B, Gao G, Brugge J, Slamon DJ. Activity of the multikinase inhibitor dasatinib against ovarian cancer cells. *British J Cancer* 2009; 101:1699-708.

Kong L, Deng ZH, Shen HY, Zhang YX. Src family kinase inhibitor PP2 efficiently inhibits cervical cancer cell proliferation through down-regulating phospho-Src-Y416 and phospho-EGFR-Y1173. *Mol Cell Biochem* 2011a; 348:11-19.

Kong L, Deng ZH, Zhao YZ, Wang YM, Sarkar FH, Zhang YX. Down-regulation of phospho-non-receptor Src tyrosine kinases contributes to growth inhibition of cervical cancer cells. *Med Oncol* 2011b; 28:1495-1506.

Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S. Genomic instability and cancer: Lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer Lett* 2011; 305:113-22.

Kumar A, Zhao Y, Meng G, Zeng M, Srinivasan S, Delmolino LM, Gao Q, Dimri G, Weber GF, Wazer DE, Band H, Band V. Human papillomavirus oncoprotein E6 inactivates the transcriptional coactivator human ADA3. *Mol Cell Biol*. 2002; 22:5801-12

Kuo MH, Allis CD. In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein: DNA associations in chromatin environment. *Methods* 1999; 19:425-33.

Lai HC, Lin YW, Huang TH, Yan P, Huang RL, Wang HC, Liu J, Chan MW, Chu TY, Sun CA, Chang CC, Yu MH. Identification of novel DNA methylation markers in cervical cancer. *Int J Cancer* 2008; 123:161-7.

Lee JH, Pyon JK, Kim DW, Lee SH, Nam HS, Kim CH, Kang SG, Lee YJ, Park MY, Jeong DJ, Cho MK. Elevated c-Src and c-Yes expression in malignant skin cancers. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29:116.

Longworth MS, Laimins LA. The binding of histone deacetylases and the integrity of zinc finger-like motifs of the E7 protein are essential for the life cycle of human papillomavirus type 31. *J Virol* 2004; 78:3533-41.

Longworth MS, Wilson R, Laimins LA. HPV31 E7 facilitates replication by activating E2F2 transcription through its interaction with HDACs. *EMBO J* 2005; 24:1821-30.

Mantovani F, Banks L. The Human Papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene* 2001; 20: 7874-87.

Maytin EV, Habener JF. Transcription factors C/EBP alpha, C/EBP beta, and CHOP (Gadd153) expressed during the differentiation program of keratinocytes in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 1998; 110:238-46.

McCormack SJ, Brazinski SE, Moore JL, Werness BA, Goldstein DJ. Activation of the focal adhesion kinase signal transduction pathway in cervical carcinoma cell lines and human genital epithelial cells immortalized with human papillomavirus type 18. *Oncogene* 1997; 15:265-74.

Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18:516-23.

Mocellin S, Panelli MC, Wang E, Nagorsen D, Marincola FM. The dual role of IL-10. *Trends Immunol* 2003; 24:36-43.

Montero JC, Seoane S, Ocana A, Pandiella A. Inhibition of Src family kinases and receptor tyrosine kinases by Dasatinib: Possible Combinations in Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 2011; 17:5546-552.

Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010; 10:550-60.

Moore KW, Malefyt RD, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:683-765.

Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res* 2002; 89:213-28.

Münger K, Basile JR, Duensing S, Eichten A, Gonzalez SL, Grace M, Zacny VL. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20:7888-98.

Murayama A, Sakura K, Nakama M, Yasuzawa-Tanaka K, Fujita E, Tateishi Y, Wang Y, Ushijima T, Baba T, Shibuya K, Shibuya A, Kawabe Y, Yanagisawa J. A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. *EMBO J* 2006; 25:1081-92.

Myöhänen S, Wahlfors J, Janne J. Automated fluorescent genomic sequencing as applied to the methylation analysis of the human ornithine decarboxylase gene. *Dna Seq* 1994; 5:1-8.

Nam JS, Ino Y, Sakamoto M, Hirohashi S. Src family kinase inhibitor PP2 restores the E-cadherin/catenin cell adhesion system in human cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin Cancer Res*. 2002;8:2430-6.

Peghini BC, Abdalla DR, Barcelos AC, Teodoro Ld, Murta EF, Michelin MA. Local cytokine profiles of patients with cervical intraepithelial and invasive neoplasia. *Hum Immunol*. 2012; 73:920-6.

Pett M, Coleman N. Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *J Pathol* 2007; 212:356-67.

Prathapam T, Tegen S, Oskarsson T, Trumpf A, Martin GS. Activated Src abrogates the Myc requirement for the G0/G1 transition but not for the G1/S transition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:2695-700.

Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. *Plos Pathogens* 2009; 5: e1000318.

Roche S, Fumagalli S, Courtneidge SA. Requirement for Src family protein tyrosine kinases in G2 for fibroblast cell division. *Science*. 1995; 269:1567-9.

Roskoski R. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 324:1155-64.

Roskoski R. Src kinase regulation by phosphorylation and dephosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331:1-14.

Saito YD, Jensen AR, Salgia R, Posadas EM. Fyn: a novel molecular target in cancer. *Cancer* 2010; 116:1629-37.

Sancier F, Dumont A, Sirvent A, Paquay de Plater L, Edmonds T, David G, Jan M, de Montrion C, Cogé F, Léonce S, Burbridge M, Bruno A, Boutin JA, Lockhart B, Roche S, Cruzalegui F. Specific Oncogenic Activity of the Src-family tyrosine kinase c-Yes in colon carcinoma cells. *Plos One* 2011; 6: e17237.

Saraiva M, Christensen JR, Tsytsykova AV, Goldfeld AE, Ley SC, Kioussis D, O'Garra A. Identification of a macrophage-specific chromatin signature in the IL-10 locus. *J Immunol* 2005; 175:1041-6.

Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 2007; 370:890-907.

Sen B, Johnson FM. Regulation of SRC family kinases in human cancers. *J Signal Transduct* 2011; 2011: 865819.

Setoguchi H, Namihira M, Kohyama J, Asano H, Sanosaka T, Nakashima K. Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons. *J Neurosci Res* 2006; 84:969-79.

Shvartsman DE, Donaldson JC, Diaz B, Gutman O, Martin GS, Henis YI. Src kinase activity and SH2 domain regulate the dynamics of Src association with lipid and protein targets. *J Cell Biol*. 2007; 178:675-86.

Stanley MA. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:215-22.

Staples KJ, Smallie T, Williams LM, Foey A, Burke B, Foxwell BM, Ziegler-Heitbrock L. IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J Immunol* 2007; 178:4779-85.

Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 2005; 32 Suppl 1:S25-S33.

Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature*. 1976; 260:170-3.

Steinke JW, Barekzi E, Hagman J, Borish L. Functional analysis of -571 IL-10 promoter polymorphism reveals a repressor element controlled by Sp1. *J Immunol* 2004; 173:3215-22.

Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer and Metastasis Rev* 2003; 22:337-58.

Szalmás A, Kónya J. Epigenetic alterations in cervical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009;19:144-52.

Szarka K, Veress G, Juhász A, Kónya J, Sápy T, Soós G, Hernádi Z, Gergely L. Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers. *Anticancer Res* 2000; 20:2161-7.

Szőke K, Szalmás A, Szládek G, Veress G, Gergely L, Tóth FD, Kónya J. IL-10 promoter nt-1082A/G polymorphism and human papillomavirus infection in cytologic abnormalities of the uterine cervix. *J Interferon Cytokine Res* 2004; 24:245-51.

Teunissen MB, Koomen CW, Jansen J, de Waal Malefyt R, Schmitt E, Van den Wijngaard RM, Das PK, Bos JD. In contrast to their murine counterparts, normal human keratinocytes and human epidermoid cell lines A431 and HaCaT fail to express IL-10 mRNA and protein. *Clin Exp Immunol* 1997; 107:213-23.

Thelemann A, Petti F, Griffin G, Iwata K, Hunt T, Settinaro T, Fenyo D, Gibson N, Haley JD. Phosphotyrosine signaling networks in epidermal growth factor receptor overexpressing squamous carcinoma cells. *Molecular & Cellular Proteomics* 2005; 4:356-76.

Tice DA, Biscardi JS, Nickles AL, Parsons SJ. Mechanism of biological synergy between cellular Src and epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96:1415-20.

Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Bini M, Perez Alea M, Maria Florena A, Miceli L, Condorelli G, Bonventre S, Di Gesù G, De Maria R, Stassi G. Autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10 is required for survival and growth of thyroid cancer cells. *Cancer Res* 2006; 66:1491-9.

Venuti A, Paolini F, Nasir L, Corteggio A, Roperto S, Campo MS, Borzacchiello G. Papillomavirus E5: the smallest oncoprotein with many functions. *Mol Cancer* 2011; 10:140.

Virmani AK, Muller C, Rathi A, Zoechbauer-Mueller S, Mathis M, Gazdar AF. Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2001; 7:584-9.

Waggoner, S.E. Cervical cancer. *Lancet* 2003; 361:2217-25.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Pääbo S, Rebhan M, Schübeler D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 2007; 39:457-66.

Werdich XQ, Penn JS. Src, Fyn and Yes play differential roles in VEGF-mediated endothelial cell events. *Angiogenesis*. 2005;8:315-26.

Wisman GB, Nijhuis ER, Hoque MO, Reesink-Peters N, Koning AJ, Volders HH, Buikema HJ, Boezen HM, Hollema H, Schuurin E, Sidransky D, van der Zee AG. Assessment of gene promoter hypermethylation for detection of cervical neoplasia. *Int J Cancer* 2006; 119:1908-14.

Wolk K, Kunz S, Asadullah K, Sabat R. Cutting edge: Immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* 2002; 168:5397-402.

Yang HJ, Liu VW, Wang Y, Tsang PC, Ngan HY. Differential DNA methylation profiles in gynecological cancers and correlation with clinico-pathological data. *BMC Cancer* 2006; 6:212.

Yano S, Ghosh P, Kusaba H, Buchholz M, Longo DL. Effect of promoter methylation on the regulation of IFN-gamma gene during in vitro differentiation of human peripheral blood T cells into a Th2 population. *J Immunol* 2003; 171:2510-6.

Yasmeen A, Alachkar A, Dekhil H, Gambacorti-Passerini C, Al Moustafa AE. Locking Src/Abl tyrosine kinase activities regulate cell differentiation and invasion of human cervical cancer cells expressing E6/E7 oncoproteins of high-risk HPV. *J Oncol* 2010; 2010. pii: 530130.

Zhang B, Laribee RN, Klemsz MJ, Roman A. Human papillomavirus type 16 E7 protein increases acetylation of histone H3 in human foreskin keratinocytes. *Virology* 2004; 329:189-98.

Zhao J, Guan JL. Signal transduction by focal adhesion kinase in cancer. *Cancer and Metastasis Rev* 2009; 28: 35-49.

zur Hausen H. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and its causation by specific human papillomavirus types. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186:131-56.

TÁRGYSZAVAK

Magyar nyelvű tárgyszavak:

humán papillomavírus, méhnyakrák, promoter metiláció, epigenetikai szabályozás, nem receptor protein tirozin kináz, Src kináz

Angol nyelvű tárgyszavak:

human papillomavirus, cervical carcinoma, promoter methylation, epigenetic regulation, non-receptor protein-tyrosine kinase, Src-family kinase

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetemet fejezem ki mindennekeelőtt témavezetőmnek, Dr. Kónya József egyetemi docensnek, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet vezetőjének, aki hozzáértő szakmai segítségével elméleti és gyakorlati munkámat egyaránt lelkiismeretesen irányította. Köszönetet szeretnék mondani Gergely Lajos Professzor Úrnak, az Orvosi Mikrobiológiai Intézet korábbi vezetőjének is, aki lehetővé tette, hogy az intézetben elkezdhessem kutatómunkámat.

Köszönettel tartozom kollégáimnak, Dr. Veress Györgynek, Dr. Csoma Eszternek, Oraveczné Gyöngyösi Eszternek, Antalné László Brigittának és Ferenczi Annamáriának valamint az Orvosi Mikrobiológiai Intézet minden munkatársának önzetlen segítségükért.

Külön köszönet illeti a szakmai együttműködésért Prof. Dr. Minárovits Jánost, Dr. Salamon Dánielt, Dr. Bánáti Ferencet, Dr. Koroknai Anitát (Johan Béla Országos Epidemiológiai Központ, korábbi Mikrobiológiai Kutatócsoport), Dr. Karosi Tamást és Dr. Csomor Pétert (DE OEC Fül-Orr-Gégészeti és Fej- Nyaksebészeti Klinika).

FÜGGELÉK

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár által hitelesített publikációs lista.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények különlenyomatai.