

# A globális DNS-metilációs mintázat kialakulásának és változásának vizsgálata vastagbél tumorokban

Doktori tézisek

**Szigeti Krisztina Andrea**

Semmelweis Egyetem  
Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Molnár Béla, az MTA doktora, kutatóprofesszor

Hivatalos bírálók: Dr. Tisza Viktória, Ph.D., tudományos munkatárs  
Dr. Folhoffer Anikó, Ph.D., egyetemi adjunktus

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Varga Gábor, az MTA doktora, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Tóth Sára, Ph.D., habil. egyetemi docens

Dr. Tóth Erika, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest

2023

## 1. Bevezetés

A kolorektális rák (CRC) a harmadik legnagyobb incidenciával rendelkező daganatos megbetegedés közel kétmillió regisztrált személlyel, illetve mortalitás szempontjából a második helyet foglalja el, mintegy egymillió halálesetet számlálva világszerte. Továbbá, a 2020-ban mért adatok alapján sajnálatos módon Magyarországon volt mefigyelhető a legnagyobb előfordulási, valamint a második legnagyobb halálozási ráta a világ többi országához viszonyítva.

A kolorektális tumorok kialakulása az ép vastagbélhámsejtekben felhalmozódó genetikai mutációk és epigenetikai változások által indukált folyamat. A sporadikus formák nagy többsége a Fearon és Vogelstein által leírt klasszikus ép-adenóma-karcinóma szekvencia mentén jön létre. A modell korai molekuláris eseménye a kromoszomális instabilitás, amely jelenség kialakulásában kiemelt szerepe van egy epigenetikai módosulásnak, a DNS-metilációnak. A DNS citozin nukleobázisának 5. szénatomját érintő metiláció a humán genomban főként a citozin-foszfát-guanin (CpG) dinukleotid helyeken található meg. A CpG-gazdag szabályozási egységeket CpG-szigeteknek nevezzük, amelyek jellemzően a gének promóter, illetve egyéb szabályozó régióiban figyelhetők meg. A promóter régiókban elhelyezkedő CpG-szigetek metilációs mintázatán keresztül valósul meg a DNS-metiláció génexpresszió szabályozásában betöltött szerepe. Ezen szakaszok fokozott metilációja az adott gén csendesítéséhez vezet, míg a CpG-szigetek alacsony mértékű DNS-metilációja vagy annak teljes hiánya lehetővé teszi a gén átíródását.

A megfelelő sejtspecifikus DNS-metilációs mintázat fenntartásában fontos szereppel rendelkeznek bizonyos jelátviteli útvonalak, transzkripciós faktorok, valamint hosszú nem-kódoló RNS-ek. Emellett kiemelt jelentőséggel bír a DNS-metiltranszferáz enzimek és demetiláz rendszerek, illetve az egy szénatomos (1C) ciklus enzimműködésének megfelelő működése, amelyen keresztül meghatározó a metildonor molekulák - azaz a folsav (B<sub>9</sub>-vitamin) és az S-adenozilmetionin (SAM) - mennyisége is. Az 1C anyagcsereútban több metabolikus reakciókör kapcsolódik, amelyből a folátciklus a nukleotidszintézisnek szolgáltat prekuzormolekulákat, míg a metioninciklus fontos molekulaterméke az imént említett SAM. Az 1C ciklus központi eleme egy esszenciális vitamin, a folsav, amelyhez táplálkozás során, valamint táplálékkiegészítők használatával juthatunk hozzá. A metilcsoport a folsav különböző oxidációs formái által szállítódik a folátciklusból a metioninciklusba, ahol lehetővé teszi a SAM létrejöttét. E metabolikus folyamatban kulcsfontosságú szerepet tölt be az 5,10-metilén-tetrahidrofolát-reduktáz (MTHFR) enzim, így az MTHFR gén olyan mutációi, amelyek a fehérje aktivitásának csökkenéséhez vezetnek, befolyásolhatják a SAM szintézisét. Ezutóbbi és a fentebb említett faktorokat érintő eltérések aberráns DNS-metilációs mintázat kialakulásához

vezethetnek.

A tumorok kialakulása során két fő DNS-metilációs mintázat változás - a lokális hipermetiláció, valamint a globális DNS-hipometiláció - figyelhető meg. Lokális hipermetiláció során a tumorszuppresszor gének promóter metilációjának következtében azok csendesítése detektálható, míg a globális DNS-hipometiláció esetén teljes genomszinten figyelhető meg metilációcsökkenés, amely legfőképp a nagy kópiaszámban jelenlévő mobilis genetikai elemek szekvenciáit érinti. Globális DNS-hipometiláció során tehát a mobilis genetikai elemek kikerülnek a metiláció általi szabályozás alól, amely reaktiválódásukhoz vezet, így véletlenszerű áthelyeződésükkel kromoszomális instabilitást idézhetnek elő. Ilyen globális metilációcsökkenés által érintett, jelentős kópiaszámmal rendelkező transzpozabilis elem például a LINE-1 retrotranszpozon, amelynek szekvenciái a genom 17%-át teszik ki. A LINE-1 szekvenciák metiláltságának mértéke korrelációt mutat a teljes genom metilációs szintjével, ezáltal számos genomszintű DNS-metilációt vizsgáló módszer célozza a LINE-1 retrotranszpozon kópiák elemzését. Ezen metodikák közé tartozik a LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás, ami egy költséghatékony, megbízható, és viszonylag alacsony kiindulási DNS-mennyiséget igénylő módszer. A LINE-1 retrotranszpozon rákbiológiai jelentősége, illetve a metiláltsági szintjét mérő biszulfid-piroszekvenálás előnyei kapcsán több kutatás is foglalkozott a módszer pontosságának elemzésével. Az ilyen típusú vizsgálatok, illetve átfogó analízisek nagy jelentőséggel rendelkeznek a tudományos és klinikai célú vizsgálatok területén. Utóbbi esetében különösen fontos a vérminták elemzése, amelyek minimálisan invazív módon nyerhetők például rutin vérvétel során, és a bennük található sejten kívüli szabad DNS (skDNS) -frakció potenciális tárgya lehet a különböző betegségekre, így a daganatokra specifikus biomarkerek detektálásának. A folyadékbiopsziák vizsgálatára napjainkban egyre nagyobb hangsúly helyeződik, ugyanis a kevésbé invazív beavatkozással történő vizsgálatok alkalmazása növelheti a páciensek szűrővizsgálatokon való részvételi arányát, ami a daganatos kórfolyamatok korai, akár rákmegelőző állapotban történő felismeréséhez vezethet.

## 2. Célkitűzések

PhD-munkám során céлом volt a következő vizsgálatok elvégzése:

1. A globális DNS-metilációs mintázat elemzése vastagbéliszöveti mintákban a kolorektális ép-adenóma-karcinóma szekvencia mentén és gyulladásos bélbetegségekben;
2. A globális DNS-metilációs eltérések megjelenésének vizsgálata egészséges, vastagbél-adenómás és vastagbélrákos páciensektől, valamint gyulladásos bélbetegségekben szenvedő személyektől gyűjtött plazmamintákban;
3. A globális DNS-metilációs változások lehetséges kialakulási okainak analízise vastagbéliszöveti mintákban transzkripció, valamint anyagcsereszinten;
4. A globális DNS-metiláció szintjét becsülő LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás módszerét befolyásoló metodikai tényezők elemzése kolorektális szöveti biopsziákban és vérmintákban.

A vizsgálat a következő szempontokat foglalta magában:

- az alkalmazott piroszekvenáló kit által vizsgált 3 CpG-hely szeparált, illetve együttes elemzése;
- eltérő kolorektális szövetminta-gyűjtési technikák;
- különböző szövetfixáló módszerek;
- vastagbéliszöveti biopsziákból izolált DNS tárolása;
- hagyományos K3EDTA, valamint skDNS frakció tartósítására szolgáló vérvételi csövek alkalmazása;
- vérminták tárolási időtartama és tárolási hőmérséklete;
- páciensek életkora és neme.

### 3. Módszerek

#### 3.1. Betegek és minták

Kutatásunkat humán vastagbéliszöveti, perifériás vérsejteket tartalmazó buffy coat és vérplazma-mintákon végeztük. Vizsgálatainkba összesen 183 friss-fagyasztott (FF), 61 formalin-fixált, paraffinba ágyazott (FFPE) vastagbéliszöveti mintát, illetve 123 vérmintát vontunk be. A perifériás vérmintákat hagyományos K3EDTA (Greiner Bio-One GmbH), valamint skDNS-t tartósító (Cell-free DNA Collection tube, Roche) vérvételi csövekbe gyűjtöttük.

#### 3.2. A globális DNS-metilációs szint elemzése vastagbéliszövet és vérplazma-mintákból

A globális DNS-metiláció vizsgálatát LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással 45 egészséges (N), 23 adenóma melletti ép (AD-NAT), 25 karcinóma melletti ép (CRC-NAT), 37 adenóma (AD), 38 CRC, és 15 IBD-s FF mintán végeztük. AD minták esetén vizsgáltunk különböző szövettani altípusokat (tubuláris, TA; tubulovillózus, TVA), valamint a CRC csoportban korai (Dukes A és B) és kései (Dukes C és D) stádiumú alcsoportokat alkottunk. Továbbá elemeztük a vérplazmában megjelenő globális DNS-metilációs szintet 10 egészséges, 14 AD-s, 13 CRC-s, és 11 IBD-s betegől gyűjtött vérmintákban. A globális DNS-metiláció és az *MTHFR* gén mutációs státusza közötti összefüggés analízisét FF N, AD és CRC mintákon végeztük.

Az izolált DNS-mintákat biszulfidkonvertáltuk, amely kémiai reakció során a nem metilált citozinok uracillá konvertálódnak, majd a PCR során timinnel helyettesítődnek, míg az 5-metilcitozinok citozinként maradnak a szekvenciában. A LINE-1 piroszekvenálás során a vizsgált CpG-helyekre beépülő timinek és citozinok arányából számoltuk a metilációs százalékot Pyromark Q24 v2.0.6 szoftver segítségével.

#### 3.3. A globális DNS-metilációs mintázat kialakulásának háttérében álló lehetséges okok analízise transzkriptomikai és anyagcsereszinten

A globális DNS-metilációs mintázat lehetséges kialakulási okait transzkriptomikai szinten a Kalmár és mtsai. által készített Human Transcriptome Array (HTA) 2.0 (Affymetrix) eredményei alapján vizsgáltuk. A DNS-metiláció folyamatához köthető enzimrendszereket kódoló gének expressziójának *in silico* újraelemzését végeztük a következő kritériumok mentén: korrigált  $p$ -érték  $\leq 0,05$ ; expressziós intenzitáskülönbség (fold change, FC)  $\geq |1,4|$ .

Immunhisztokémiai vizsgálatokkal ellenőriztük a DNS-metiltranszferáz enzimek, valamint folátreceptor-2 (*FOLR2*) gén microarray eredményeit, illetve elemeztük a globális DNS-metilációs mintázat kialakulásának lehetséges okait anyagcsereszinten a metildonor (folsav és SAM) molekulák festésével. Analízisünkbe olyan 20 AD-s és 20 CRC-s FFPE biopsziát vontunk be, amelyekben a tumor-NAT tranzíciós zóna is megfigyelhető volt. Deparaffinálást és feltárást követően az endogén peroxidázok gátlását, valamint az aspecifikus jelek blokkolását végeztük. A vizsgált epitópok tehát a DNMT1, DNMT3a és 3b enzimek, a *FOLR2* gén által kódolt folátreceptor  $\beta$ , továbbá a folsav és SAM metildonorok, valamint az 5-metilcitozin voltak. A festéseket Panoramic Confocal műszerrel digitalizáltuk és Panoramic Viewer (v: 1.15.3, 3DHISTECH) szoftver használatával értékeltük ki szemikvantitatív módon Quick-score (Q-score) módszer használatával.

### **3.4. A LINE-1 biszulfid-piroszekvenálást befolyásoló metodikai faktorok hatásának elemzése**

A piroszekvenálás során analizált 3 CpG-hely metilációs szintjét egymástól elkülönítve, illetve átlagolva egyaránt vizsgáltuk 45 N, 23 AD-NAT, 24 CRC-NAT, 37 AD, 36 CRC, és 15 IBD-s frissfagyasztott szövetbiopszián, valamint 19 N, 3 IBD-s, 10 AD-s, 10 CRC-s páciens-től gyűjtött vérmintákból szeparált buffy coat frakción is elemeztük.

A kolorektális szövetminta-gyűjtés módjának vizsgálatához 24 CRC-NAT és 36 CRC endoszkóposan vett, valamint 21 CRC-NAT és 21 CRC műtéileg eltávolított biopsziát elemeztünk. A minták fixálásának LINE-1 metilációra gyakorolt hatását FF-hez párosított FFPE minták vizsgálatával analizáltunk 9 N és 12 AD-s biopszia esetében. A DNS-minták fagyasztva történő tárolásának LINE-1 metilációra kifejtett hatását párhuzamos mintákon elemeztük. A rövid távú tárolás (2 nap) esetén 27, míg a hosszú távú tárolás (2 év) során 48 minta LINE-1 metilációját hasonlítottuk az első mérések eredményeihez. Továbbá, kontrollvizsgálatként gyárilag biszulfidkonvertált, nem metilált és metilált DNS-standardokat is bevontunk.

Vérminták analízisében a Roche vérvételi csövekben található tartósítószer LINE-1 metilációra gyakorolt hatását a konvencionális K3EDTA csövekhez hasonlítva 4 egészséges személy vérmintáiban vizsgáltuk. Elemeztük továbbá a teljes vérminták plazma és buffy coat szeparálásáig eltelt eltérő tárolási időtartamának és hőmérsékletének hatását a globális DNS-metilációs szintre. Roche csövekbe gyűjtött vérminták esetén a buffy coat frakciókból történő DNS-izolálás során a sejtek különböző ideig történő Proteináz K emésztése által előidézett DNS-metilációs eltéréseket is elemeztük.

### 3.5. Statisztikai vizsgálatok

A statisztikai szignifikancia ( $p \leq 0,05$ ) megállapítását és a ROC (receiver operating characteristic, vevő működési karakterisztika) analízist Prism8 szoftver (GraphPad) használatával végeztük. Többszörös összehasonlítás és nem normális eloszlás esetén Kruskal-Wallis és Dunn többszörös összehasonlítás teszteket végeztünk, míg normális eloszlást mutató adatainkon ANOVA, majd Brown Forsythe, valamint Welch-féle ANOVA próbákat használtunk. Páros összehasonlítások során párosított t-tesztet vagy Wilcoxon tesztet alkalmaztunk annak függvényében, hogy parametrikus vagy nem parametrikus eloszlást tapasztaltunk. Független mintacsoportok páros összehasonlítására normális eloszlás esetén párosítatlan t-próbát, nem normális eloszlást mutató adatok esetén Mann-Whitney tesztet használtunk. Az életkor és LINE-1 metiláció közötti korreláció vizsgálatát Spearman tesztel végeztük.

## 4. Eredmények

### 4.1. A globális DNS-metiláció változásának vizsgálata és kialakulásának hátterében álló lehetséges okok feltérképezése

#### 4.1.1. Szövetminták globális DNS-metilációjának vizsgálata LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással

Szövetminták globális DNS-metilációjának tanulmányozása során átfogó analízist végeztünk LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás alkalmazásával kolorektális N, AD-NAT, CRC-NAT, AD, CRC és IBD biopsziákon. Szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt tapasztaltunk AD ( $72,7\pm 4,8\%$ ) és CRC ( $69,7\pm 7,6\%$ ) szövetmintákban az N ( $77,5\pm 1,7\%$ ) és IBD ( $77,1\pm 1,9\%$ ) biopsziákhoz képest ( $p\leq 0,01$ ), míg IBD esetén nem figyeltünk meg szignifikáns metilációs változást az N mintákhoz viszonyítva. Szintén szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt detektáltunk a TA ( $73,8\pm 4,1\%$ ) és TVA ( $69,8\pm 4,5\%$ ) mintákban az egészséges mintákhoz ( $77,5\pm 1,7\%$ ) képest ( $p\leq 0,05$ ), valamint a TVA mintákban ( $69,8\pm 4,5\%$ ) a TA ( $73,8\pm 4,1\%$ ) alcsoporthoz viszonyítva ( $p\leq 0,05$ ). Korai ( $71,5\pm 4,9\%$ ) és kései ( $68,5\pm 8,7\%$ ) stádiumú CRC-s betegektől gyűjtött mintákhoz viszonyítva szignifikánsan magasabb metilációt mértünk az ép biopsziákban ( $77,5\pm 1,7\%$ ,  $p\leq 0,05$ ), valamint a CRC stádiumok összevetése során csökkenő LINE-1 metilációt tapasztaltunk a rák progressziója mentén. Az AD-NAT ( $76,0\pm 2,1\%$ ) és CRC-NAT ( $76,4\pm 2,0\%$ ) biopsziák szignifikánsan alacsonyabb metilációs szintet mutattak az N mintákhoz képest ( $77,5\pm 1,7\%$ ) ( $p\leq 0,05$ ). Továbbá, az AD ( $72,8\pm 4,4\%$ ) és a CRC ( $71,2\pm 6,8\%$ ) minták szignifikánsan kisebb metilációs értékekkel rendelkeztek a párosított AD-NAT ( $76,0\pm 2,1\%$ ) és CRC-NAT ( $76,4\pm 2,0\%$ ) csoportokhoz hasonlítva ( $p\leq 0,05$ ).

#### 4.1.2. Plazmaminták globális DNS-metilációjának vizsgálata LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással

A vastagbéliszöveti globális DNS-hipometiláció megfigyelését követően egészséges, AD-s, CRC-s és IBD-s páciensektől gyűjtött plazmaminták skDNS frakciójának genomszintű metilációs mintázatát határoztuk meg. Szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációs szintet tapasztaltunk AD ( $80,0\pm 1,7\%$ ) és CRC ( $79,8\pm 1,3\%$ ) plazmákból izolált skDNS mintákban az N mintákhoz ( $82,0\pm 2,0\%$ ) képest ( $p\leq 0,01$ ), míg IBD-s ( $81,1\pm 0,8\%$ ) betegektől gyűjtött plazmák esetén nem figyeltünk meg jelentős eltérést a többi csoporthoz viszonyítva. ROC analízis alapján a LINE-1 metiláció 66,7%-os szenzitivitás és 90,0%-os specificitás értékekkel különítette el az adenómás mintákat az egészségesektől 80,0% metilációs határérték esetén (AUC: 0,8;  $p<0,05$ ; 95% CI 0,6-1,0).



#### 4.1.3. A DNS-metiláció folyamatához kapcsolódó enzimek *in silico* génexpressziós vizsgálata

Munkacsoportunk által korábban elvégzett teljes transzkriptom-analízis (GeneChip™ HTA 2.0) eredményeit elemeztük újra *in silico* a metilációs és demetilációs folyamatokhoz kapcsolódó enzimek, az 1C ciklus enzimrendszereinek tagjai, illetve a folátreceptorok esetén. A vizsgálati kritériumainknak (korrigált  $p \leq 0,05$ ;  $FC \geq |1,4|$ ) megfelelő expresszióváltozások közül az 1C ciklushoz tartozó *GART*, *MTHFD1*, *MTHFD2*, *ATIC* és *SHMT2* gének szignifikánsan magasabb mRNS-expressziót mutattak AD és CRC mintákban az egészségesekhez képest. A folátreceptor  $\beta$  (FR $\beta$ ) fehérjét kódoló *FOLR2* gén kifejeződése szignifikánsan alacsonyabbnak adódott a tumoros mintákban az épekhez viszonyítva. A *DNMT1* szignifikánsan emelkedett génkifejeződést mutatott CRC biopsziákban az N mintákhoz képest, továbbá az *APOBEC1* szignifikánsan felülexpresszáldott, illetve az *APOBEC3B* szignifikánsan csökkenő átíródást mutatott AD biopsziákban az ép mintákhoz hasonlítva.

#### 4.1.4. A *DNMT* és *FOLR2* gének mRNS-expressziójának validálása immunhisztokémiával

A *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* és *FOLR2* gének expressziós eredményeit immunhisztokémiai festésekkel validáltuk tranzíciós zónát tartalmazó vastagbéliszöveti metszeteken. Mind a *DNMT1*, 3A és 3B, valamint mind a *FOLR2* által kódolt FR $\beta$  festődése tükrözte a microarray analízisünk eredményeit. A *DNMT1* enzimek nukleáris jelölődése hámsejtekben szignifikánsan nagyobb intenzitást mutatott a rákos területeken ( $191,7 \pm 18,9$ ) az ép régiókhöz ( $131,7 \pm 12,6$ ) viszonyítva ( $p \leq 0,05$ ), míg nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a strómasejtek festése során (NAT st:  $100,0 \pm 50,0$ ; CRC st:  $106,7 \pm 20,8$ ). A *DNMT3A* és 3B fehérjék elemzésekor nem figyeltünk meg változást a sejtmagok festődésének mértékében tumoros, illetve ép területek összehasonlításakor sem a hám-, sem a strómasejtek esetén. Az FR $\beta$  jelölődése a receptorfehérje kifejeződésében szignifikáns csökkenést mutatott az AD-s minták epitáliális ( $76,5 \pm 33,3$ ), és strómális sejteiben ( $63,3 \pm 26,2$ ) is, valamint a CRC-s régiók hámsejtjeiben ( $104,8 \pm 26,5$ ) a párosított NAT területekhez (AD-NAT ep:  $128,5 \pm 51,9$ ; AD-NAT st:  $96,5 \pm 52,5$ ; CRC-NAT ep:  $142,8 \pm 44,6$ ) képest ( $p \leq 0,01$ ). A rákos területek strómasejtjeiben enyhe intenzitáscsökkenést tapasztaltunk ( $72,7 \pm 35,7$ ) a NAT zónákhoz viszonyítva ( $83,5 \pm 36,9$ ).

#### 4.1.5. Az *MTHFR* gén mutációs státusza és a globális DNS-metilációs szint közötti összefüggés elemzése

A globális DNS-hipometiláció kialakulásában szerepet játszó okok analízise során megvizsgáltuk a metiláció és az *MTHFR* gén mutációs státusza közötti összefüggést is. Az elemzés

során a két leggyakoribb mutációjának (C677T, A1298C) heterozigóta formáival (HE) jellemezhető vastagbéliszöveti minták LINE-1 metilációs szintjét határoztuk meg kolorektális egészséges, adenómás, illetve karcinómás biopsziákban. Ép minták esetén nem találtunk szignifikáns LINE-1 metilációs eltérést a HE vs. vad típus (WT) összehasonlításban. Ezzel szemben szignifikánsan alacsonyabb metilációt figyeltünk meg mindkét vizsgált mutáció esetén AD HE mintákban (677CT:  $70,5 \pm 4,3\%$ , 1298AC:  $69,2 \pm 4,3\%$ ) a WT biopsziákhoz (677CC:  $73,8 \pm 4,3\%$ ,  $p \leq 0,05$ ; 1298AA:  $74,4 \pm 4,0\%$ ,  $p \leq 0,01$ ) hasonlítva. CRC-s biopsziákban érdekes módon enyhe, nem szignifikáns metilációnövekedést detektáltunk HE mintákban a WT biopsziákhoz képest mindkét mutáció esetén.

#### **4.1.6. A metildonor molekulák mennyiségének vizsgálata vastagbéliszövetben immunhisztokémiával**

A metildonor- (folsav, SAM) tartalom és az 5mC-festődés közötti összefüggés *in situ* tanulmányozására immunhisztokémiai festést alkalmaztunk. A folsav- (AD ep:  $100,7 \pm 28,6$ ; CRC ep:  $100,5 \pm 33,8$ ), SAM- (AD ep:  $92,9 \pm 26,9$ ; CRC ep:  $95,0 \pm 32,0$ ), valamint 5mC-festődés (AD ep:  $128,3 \pm 35,2$ ; CRC ep:  $103,3 \pm 33,4$ ) intenzitása szignifikánsan alacsonyabb volt mind az AD, mind a CRC minták hámsajtjeiben a párosított NAT területekhez képest (folsav AD-NAT ep:  $142,1 \pm 40,8$ ; CRC-NAT ep:  $140,8 \pm 41,3$ ; SAM AD-NAT ep:  $123,1 \pm 26,3$ ; CRC-NAT ep:  $147,2 \pm 42,3$ ; 5mC AD-NAT ep:  $191,4 \pm 49,0$ ; CRC-NAT ep:  $177,5 \pm 44,9$ ) ( $p \leq 0,01$ ). A strómasejtekben is enyhe intenzitáscsökkenést tapasztaltunk, amely szignifikáns volt az 5mC jelölés során AD (AD-NAT st:  $130,3 \pm 59,3$ ; AD st:  $96,6 \pm 31,3$ ) ( $p \leq 0,01$ ) és CRC (CRC-NAT st:  $122,8 \pm 42,4$ ; CRC st:  $90,6 \pm 38,5$ ) ( $p \leq 0,01$ ) mintákban, valamint folsav jelölés esetén a CRC biopsziákban (CRC-NAT st:  $100,2 \pm 51,0$ ; CRC st:  $78,8 \pm 38,7$ ) ( $p \leq 0,05$ ).

## **4.2. Különböző metodikai faktorok globális DNS-metilációs mintázatra gyakorolt hatásának vizsgálata**

### **4.2.1. A LINE-1 szakaszok promóter régiójában található CpG-pozíciók metilációja**

Ezen vizsgálatunk során azt tanulmányoztuk, hogy a Pyromark Q24 CpG LINE-1 Kit által analizált három CpG-pozíció metilációjának különálló elemzése hordoz-e magában új információt az átlagolt metilációs értékek változásához képest. Elemzésünk során szignifikánsan magasabb metilációs szintet tapasztaltunk a CpG 1-es pozíció ( $79,7 \pm 3,2\%$ ) esetén a CpG 2 ( $75,9 \pm 2,3\%$ ), a CpG 3 ( $74,9 \pm 2,6\%$ ), illetve a három CpG-dinukleotid átlagmetilációs értékéhez ( $76,8 \pm 1,9\%$ ) képest a nem tumoros vastagbéliszöveti mintákban ( $p \leq 0,01$ ). Azonban érdekes módon a tumoros minták CpG-

pozíciói között nem detektáltunk szignifikáns különbséget. Az analizált buffy coat frakciók esetén mind a nem tumoros, mind az adenómás és vastagbélrákos betegektől gyűjtött mintákban szignifikánsan nagyobb metilációs értékeket figyeltünk meg a CpG 1-es pozícióban (nem tumoros:  $84,4 \pm 2,9\%$ , tumoros:  $84,2 \pm 2,8\%$ ) a CpG 2 (nem tumoros:  $77,6 \pm 1,9\%$ , tumoros:  $76,0 \pm 1,2\%$ ), a CpG 3 (nem tumoros:  $76,4 \pm 2,4\%$ , tumoros:  $75,6 \pm 2,1\%$ ), valamint az átlagolt metilációs értékekhez (nem tumoros:  $79,5 \pm 1,8\%$ , tumoros:  $78,6 \pm 1,5\%$ ) viszonyítva.

#### **4.2.2. A kolorektális szövetbiopsziák gyűjtési technikái, illetve a szövetfixálásra alkalmazott metodikák LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának analízise**

A különböző mintagyűjtési technikák hatásának elemzése során endoszkópia során nyert, valamint műtéti vastagbél tumoros és nem tumoros mintákat analizáltunk. Ezen biopsziák közül 25 darab mintát friss-fagyasztás (FF), illetve formalin (FFPE) alkalmazásával is fixáltunk. Mérsékelt magasabb LINE-1 metilációs szintet tapasztaltunk az endoszkóposan gyűjtött biopsziákban ( $72,1 \pm 6,9\%$ ) a műtéti mintákhoz ( $71,4 \pm 6,5\%$ ) hasonlítva, míg szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt figyeltünk meg FFPE ( $72,9 \pm 5,1\%$ ) esetén FF biopsziákhoz ( $75,5 \pm 2,7\%$ ) képest ( $p \leq 0,05$ ). Mindkét mintagyűjtési technika esetén szignifikánsan kisebb LINE-1 metilációt találtunk tumoros biopsziákban a nem tumoros mintákhoz hasonlítva ( $p \leq 0,01$ ). Azonban a szövetfixálás analízisében, csak a friss-fagyasztással fixált mintákban tapasztaltunk szignifikánsan csökkenő LINE-1 metilációt a tumoros biopsziákban a nem tumoros mintákhoz viszonyítva ( $p \leq 0,01$ ), míg FFPE tumoros és nem tumoros csoportok között nem detektáltunk szignifikáns eltérést.

#### **4.2.3. Különböző tárolási kondíciók hatása a LINE-1 metilációra**

A kolorektális szövetbiopsziákból izolált DNS, illetve teljes vérminták eltérő tárolási körülményeinek LINE-1 metilációs eredményekre gyakorolt hatását tanulmányoztuk. A vastagbéliszöveti minták  $-20\text{ °C}$ -on történő két napos tárolása nem okozott különbséget a LINE-1 metilációs értékek között, míg hosszútávú analízisünkben, a két év tárolás után analizált párhuzamos DNS-minták szignifikánsan emelkedett ( $+3,2\%$ ) LINE-1 metilációval rendelkeztek az első mérési időponthoz képest ( $p \leq 0,01$ ). Az skDNS minták tartósítására szolgáló Roche vérvételi csövekbe gyűjtött vérminták elemzése során szignifikánsan magasabb LINE-1 metilációt detektáltunk az skDNS frakció ( $+2,1\%$ ) esetén, míg igen mérsékelt, de szignifikáns metilációs csökkenést tapasztaltunk a buffy coat frakcióban ( $-0,4\%$ ) 1-órás emésztést követően ( $p \leq 0,05$ ) a konvencionális K3EDTA csövekbe gyűjtött vérmintákhoz képest. A K3EDTA és Roche vérvételi csövekbe gyűjtött teljes vérminták tárolása szobahőmérsékleten, illetve  $4\text{ °C}$ -on sem okozott lényeges eltérést a buffy

coat, illetve az skDNS frakció LINE-1 metilációs szintjeiben. Roche csövekbe vett vérmintákból végzett DNS izolálás során 1-, illetve 2-órás sejtemésztést is alkalmaztunk, amely során szintén nem figyeltünk meg metilációs különbséget.

#### **4.2.4. A metilált és nem metilált DNS-standardok LINE-1 metilációja**

Hosszú távú -20 °C-os tárolás LINE-1 metilációra gyakorolt hatását gyárilag biszulfitkonvertált, metilált és nem metilált standard DNS-minták esetén is megvizsgáltuk. Két év tárolás után elvégzett elemzések eredményei nem mutattak szignifikáns eltérést az első mérésekhez képest a metilált, illetve nem metilált kontrollok esetén sem.

#### **4.2.5. Az életkor és a nemek hatása a LINE-1 metilációra**

Az életkor LINE-1 metilációra gyakorolt hatásának vizsgálata során nem tapasztaltunk korrelációt egészséges nő ( $\rho=-0,3$ ;  $p=0,14$ ), illetve férfi ( $\rho=-0,02$ ;  $p=0,94$ ) páciensektől gyűjtött vastagbéliszöveti mintákban, valamint az adatok összevont elemzésekor sem ( $\rho=-0,2$ ;  $p=0,25$ ). Azonban szignifikánsan alacsonyabb LINE-1 metilációt figyeltünk meg 40 évnél idősebb női páciensek ( $76,8\pm 1,7\%$ ) esetén a 40 évnél fiatalabbakhoz ( $78,1\pm 1,0\%$ ) képest ( $p\leq 0,05$ ). Nemek szerinti csoportosítás esetén szignifikáns eltérést nem találtunk.

## 5. Következtetések

PhD-munkám középpontjában a vastagbél-daganatok egy korai molekuláris eseménye, a globális DNS-hipometiláció jelensége áll. Kialakulása többek között mobilis genetikai elemek reaktivációjához és kromoszomális instabilitás létrejöttéhez vezethet. Munkánk során célunk volt a genom szintű DNS-metilációs eltérések vizsgálata egészséges személyek, valamint kolorektális adenómás, karcinómás és gyulladásos bélbetegségben szenvedő betegek vastagbél-szöveti és vérmintáiban LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással. Globális DNS-hipometilációt figyeltünk meg vastagbél-daganatos betegektől gyűjtött szövet- és skDNS-mintákban az ép mintákhoz képest. Az IBD vs. N összehasonlításban nem tapasztaltunk globális DNS-metilációs különbséget. Plazmaminták esetén kiemelendő, hogy már rák megelőző adenóma állapotban is szignifikánsan alacsonyabb globális DNS-metilációs szintet mutattunk ki a nem tumoros mintákhoz hasonlítva. Az AD és CRC esetekre specifikus LINE-1 metilációs határérték definiálását viszont nehezíti, hogy a globális DNS-hipometiláció több ráktípusra is jellemző, továbbá, hogy a tumoros csoportok LINE-1 metilációs értékei relatív nagy szórással rendelkeznek. Azonban egy lineáris vizsgálat során ugyanazon személytől gyűjtött vérmintákban mért LINE-1 metilációváltozás olyan minimálisan invazív monitorozási módszer alapjaként szolgálhat, amely hozzájárulhat az AD, valamint CRC kialakulásának, továbbá a CRC progressziójának vagy remissziójának detektálásához. Ezen analíziseinket követően arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a globális DNS-hipometiláció kialakulásának hátterében milyen molekuláris folyamatok állhatnak. A DNS-metilációhoz köthető gének transzkriptomikai vizsgálatában szignifikáns változást mutató eredményeink főként az 1C ciklus génjeit érintették, amelyek fokozott kifejeződésére az irodalom alapján a folyamatosan osztódó sejtek megnövekedett nukleotidigénye szolgálhat magyarázatul. Ez a jelenség összefüggésben állhat a tumorprogresszió során tapasztalt DNS-hipometilációval, amennyiben a folsavat a daganatos sejtek inkább DNS-szintézisre, mint DNS-metilációra fordítják. Az *MTHFR* gén frekvenciált mutációi és a globális DNS-metilációs változás közötti összefüggés analízisében kapott eredmények egyéb szabályozó mechanizmus jelentőségét vetették fel CRC esetén. Ettől eltérően a heterozigóta AD mintákban megfigyelt hipometiláció összhangban volt az *MTHFR* aktivitáscsökkenésével potenciálisan járó alacsonyabb SAM-szinttel. A metildonor molekulák *in situ* elérhetőségének elemzése során csökkent folsav- és SAM-mennyiséget figyeltünk meg a vastagbél-tumoros mintákban az épekhez képest, összhangban a *FOLR2* alulexpressziójával, valamint a globális DNS-hipometiláció megjelenésével. Eredményeink és az irodalmi adatok alapján a folsav és a SAM nem megfelelő szintű mennyisége hozzájárulhat a globális DNS-hipometiláció létrejöttéhez, ezáltal a daganatok kialakulásához.

Kutatásunk második részében a LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás eredményeit befolyásoló metodikai tényezőket tanulmányoztuk vastagbéliszövet- és vérmintákban. Analíziseinkből, illetve irodalmi adatok alapján arra következtethetünk, hogy a LINE-1 promóterben elhelyezkedő CpG 1-es pozíció metilációja esetleges biológiai funkcióval rendelkezhet a vastagbél-daganatok kialakulása során. Továbbá megfigyeléseink szerint a kísérletek reprodukálhatósága miatt esszenciális a minták azonos módon történő gyűjtése, illetve fixálása, valamint megfontolandó a biopsziák friss-fagyasztására való törekvés formalinfixálás helyett, ugyanis a formalin használata szignifikáns mértékben módosíthatja a LINE-1 biszulfid-piroszekvenálással mért metilációs eredményeket. Mindezek mellett megállapítottuk, hogy kritikus jelentőséggel bírhat a kísérletek során használt kitek egy gyártási időszakban való beszerzése, illetve biszulfidkonvertált és nem konvertált DNS-standardok bevonása is a mérési folyamatok monitorozásának céljából. Eredményeink, valamint a szakirodalomban leírtak alapján is elengedhetetlen az egy összehasonlításba tartozó vérminták ugyanolyan típusú vérvételi csőbe történő gyűjtése és azonos protokoll szerinti tárolása. Végezetül, annak ellenére, hogy a vizsgált személyek életkora és a LINE-1 metilációs szint között nem tapasztaltunk korrelációt, és a páciensek nemétől függően nem figyeltünk meg szignifikáns metilációs eltérést, az életkor nők esetén detektált LINE-1 metilációra gyakorolt szignifikáns hatása, illetve az irodalmi adatok kapcsán fontosnak tartjuk ezen befolyásoló faktorok mérlegelését is. Összességében megállapítható, hogy a kritikus szempontok figyelembevételével a LINE-1 biszulfid-piroszekvenálás egy megbízhatóan alkalmazható globális DNS-metiláció becslési módszer.

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### 6.1. Az értekezés témájában megjelent közlemények

**Szigeti KA**, Barták BK, Nagy ZB, Zsigrai S, Papp M, Márkus E, Igaz P, Takács I, Molnár B, Kalmár A. (2022) Methodological and Biological Factors Influencing Global DNA Methylation Results Measured by LINE-1 Pyrosequencing Assay in Colorectal Tissue and Liquid Biopsy Samples. *Int J Mol Sci*, 23(19):11608. doi: 10.3390/ijms23191160. **IF: 6,208\***

**Szigeti KA**, Kalmár A, Galamb O, Valcz G, Barták BK, Nagy ZB, Zsigrai S, Felletár I, V Patai Á, Micsik T, Papp M, Márkus E, Tulassay Z, Igaz P, Takács I, Molnár B. (2022) Global DNA hypomethylation of colorectal tumours detected in tissue and liquid biopsies may be related to decreased methyl-donor content. *BMC Cancer*, 22(1):605. doi: 10.1186/s12885-022-09659-1. **IF: 4,638\***

**Szigeti KA**, Galamb O, Kalmár A, Barták BK, Nagy ZB, Márkus E, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. A DNS metiláció szerepe és megváltozása az öregedés és a daganatos betegségek kialakulása során. *Orv Hetil.* 2018;159:3-15. **IF: 0,349**

### 6.2. Nem az értekezés témájában megjelent közlemények

Zsigrai S, Kalmár A, Barták BK, Nagy ZB, **Szigeti KA**, Valcz G, Kothalawala W, Dankó T, Sebestyén A, Barna G, Pipek O, Csabai I, Tulassay Z, Igaz P, Takács I, Molnár B. (2022) Folic Acid Treatment Directly Influences the Genetic and Epigenetic Regulation along with the Associated Cellular Maintenance Processes of HT-29 and SW480 Colorectal Cancer Cell Lines. *Cancers*, 14(7):1820. doi: 10.3390/cancers14071820. **IF: 6,575\***

Kothalawala WJ, Barták BK, Nagy ZB, Zsigrai S, **Szigeti KA**, Valcz G, Takács I, Kalmár A, Molnár B. (2022) A detailed overview about the single-cell analyses of solid tumors focusing on colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*, 28:1610342. doi: 10.3389/pore.2022.1610342. **IF: 2,874\***

Barták BK, Fodor T, Kalmár A, Nagy ZB, Zsigrai S, **Szigeti KA**, Valcz G, Igaz P, Dankó M, Takács I, Molnár B. (2022) A Liquid Biopsy-Based Approach for Monitoring Treatment Response in Post-Operative Colorectal Cancer Patients. *Int J Mol Sci*, 23(7):3774. doi: 10.3390/ijms23073774. **IF: 6,208\***

**Zsigrai S**, Kalmár A, Nagy ZB, Barták BK, Valcz G, **Szigeti KA**, Galamb O, Dankó T, Sebestyén

A, Barna G, Szabó V, Pipek O, Medgyes-Horváth A, Csabai I, Tulassay Z, Igaz P, Takács I, Molnár B. (2020) S-Adenosylmethionine Treatment of Colorectal Cancer Cell Lines Alters DNA Methylation, DNA Repair and Tumor Progression-Related Gene Expression. *Cells*, 9(8):1864. doi: 10.3390/cells9081864. **IF: 6,600**

Leiszter K, Galamb O, Kalmár A, Zsigrai S, Valcz G, **Szigeti KA**, Barták BK, Nagy ZB, Dank M, Liposits Z, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. (2020) [Potential role of estrogens in colorectal tumour development]. *Az ösztrogének lehetséges szerepe a vastagbél-daganatok kialakulásában. Orv Hetil*, 161(14):532-543. doi: 10.1556/650.2020.31674. **IF: 0,540**

Galamb, Orsolya, Barbara K. Bartak, Alexandra Kalmar, Zsafia B. Nagy, **Krisztina A. Szigeti**, Zsolt Tulassay, Peter Igaz, and Bela Molnar. 2019. "Diagnostic and Prognostic Potential of Tissue and Circulating Long Non-Coding RNAs in Colorectal Tumors. *WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY*, 25 (34): 5026–5048. doi:10.3748/wjg.v25.i34.5026. **IF: 3,665**

Barták BK, Márkus E, Kalmár A, Galamb O, **Szigeti K**, Nagy ZB, Zsigrai S, Tulassay Z, Dank M, Igaz P, Molnár B. (2019) [Characteristics and diagnostic applications of circulating cell-free DNA in colorectal cancer]. *A plazmában keringő szabad DNS jellemzői és diagnosztikai alkalmazási lehetőségei vastagbélrák esetén. Orv Hetil*, 160(30):1167-1177. doi: 10.1556/650.2019.31486. **IF: 0,497**

Zsigrai S, Kalmár A, Valcz G, **Szigeti KA**, Barták BK, Nagy ZB, Igaz P, Tulassay Z, Molnár B. (2019) [Physiological and pathophysiological significance of vitamin B9. Summary on the occasion of the 30-year introduction of folic acid as a dietary supplement]. *A B9-vitamin élettani és kórélettani jelentősége. Összegzés a folsav táplálékkiegészítőként történő alkalmazásának 30. évfordulójára. Orv Hetil*, 160(28):1087-1096. doi: 10.1556/650.2019.31441. **IF: 0,497**

Molnár B, Galamb O, Péterfia B, Wichmann B, Csabai I, Bodor A, Kalmár A, **Szigeti KA**, Barták BK, Nagy ZB, Valcz G, Patai ÁV, Igaz P, Tulassay Z. Gene promoter and exon DNA methylation changes in colon cancer development – mRNA expression and tumor mutation alterations, *BMC Cancer*. 2018;18(1):695. **IF: 2,933**



## 7. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik segítettek PhD-munkám elkészítését:

- programvezetőimnek, Tulassay Zsolt professzor úrnak és Molnár Béla professzor úrnak, továbbá a kutatólaboratóriumunknak helyet adó Semmelweis Egyetem Belgyógyászati és Hematológiai Klinika, valamint Belgyógyászati és Onkológiai Klinika igazgatóinak, Igaz Péter professzor úrnak és Takács István professzor úrnak, hogy lehetővé tették doktori munkám megvalósulását;
- témavezetőmnek, Molnár Béla professzor úrnak, akinek irányítása alatt korszerűen felszerelt laboratóriumban végezhettem a PhD-munkámat, továbbá megteremtette a lehetőséget arra, hogy hazai és nemzetközi konferenciákon bemutathassam eredményeimet. PhD éveim alatt megtanított a kutatói hivatás alapjaira és segítségével elindulhattam a tudományos pályámon;
- Dr. Galamb Orsolyának, aki mentorom volt, amikor a Tudományos Diákkör keretében megkezdtem tudományos munkámat a Molekuláris Gasztroenterológia Laboratóriumban;
- a Molekuláris Gasztroenterológia Laboratórium kutatóinak, Dr. Kalmár-Söpkéz Alexandrának, Dr. Molnár Barbarának, Dr. Nagy Zsófiának, Dr. Valcz Gábornak, Dr. Zsigrai Sárának, Felletár Ildikónak, Dr. Szabó Vanesszának, Dr. Kothalawala Williamnek, Dr. Patai V Árpádnak, akik által számos metodikát, illetve a cikkírás rejtelmeit elsajátíthattam. Végtelen türelmükkel segítettek a kísérletek kivitelezése során, szakmai tanácsaik mellett baráti jelenlétükkel is kitartóan támogattak;
- Dr. Wichmann Barnabásnak, Dr. Papp Mártonnak, Dr. Szabó Gittának, akik a statisztika útvesztőiben energiát nem kímélve segítettek eligazodni;
- a Molekuláris Gasztroenterológia Laboratórium korábbi tagjainak, Szigeti Anikó és Kovács Hajnalka asszisztenseknek a mintagyűjtésben nyújtott segítségükért;
- Berczik Máriának az adminisztratív feladatok megoldásában nyújtott segítségéért;
- a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet kutatóinak, Dr. Micsik Tamásnak és Dr. Krenács Tibornak az immunhisztokémiai vizsgálatok elvégzésében nyújtott segítségükért;
- Dr. Dohán Orsolya, házi bírálómnak, a PhD-dolgozatom alapos áttekintéséért;
- végül, de nem utolsó sorban családomnak, akik doktorandusz éveim alatt végig biztos háttérrel jelentettek, és akik barátaimmal együtt végig támogattak.